THÈSE EN COTUTELLE

Pour obtenir le grade de Docteur délivré par

L'UNIVERSITÉ DU LITTORAL CÔTE D'OPALE

Ecole Doctorale Science de la Matière du Rayonnement et de l'Environnement (ULCO)

ET

L'UNIVERSITÉ LIBANAISE

Ecole Doctorale des Sciences et de Technologie (UL)

Spécialité : **TOXICOLOGIE**

Présentée et soutenue publiquement par

Mireille BORGIE

Le 15 avril 2014

Etude des particules fines et ultrafines en suspension dans l'air au Liban : caractérisation physicochimique et évaluation des effets toxicologiques sur des cellules pulmonaires humaines BEAS-2B

Membres du jury :

Najat SALIBA	Professeur, Université Américaine de Beyrouth	Rapporteur
François SICHEL	Professeur, Université de Caen	Rapporteur
Jalal HALWANI	Professeur, Université Libanaise	Examinateur
Raphaël DELÉPÉE	Professeur, Université de Caen	Examinateur
Anthony VERDIN	Docteur, Université du Littoral Côte d'Opale	Membre invité
Zeina DAGHER	Docteur, Université Libanaise	Encadrant
Frédéric LEDOUX	Docteur, Université du Littoral Côte d'Opale	Encadrant
Hélène GREIGE	Professeur, Université Libanaise	Directeur
Dominique COURCOT	Professeur, Université du Littoral Côte d'Opale	Directeur

Remerciements

Ce manuscrit est le résultat de mon travail de thèse, réalisé dans l'équipe « Chimie et Toxicologie des Emissions Atmosphériques » de l'Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (UCEIV) à l'Université du Littoral Côte d'Opale et dans l'équipe de recherche « Molécules Bioactives » à l'Université Libanaise. Je tiens à exprimer ici toute ma gratitude aux personnes qui ont participé de près ou de loin à la bonne réalisation de ces travaux de recherche.

Tout d'abord, je voudrais exprimer toute ma reconnaissance au Pr Najat SALIBA et au Pr François SICHEL pour avoir accepté d'évaluer mon travail en tant que rapporteurs ainsi que le Pr Raphaël DELÉPÉE et le Pr Jalal HALWANI pour avoir accepté d'être les examinateurs de ma thèse.

Je désire témoigner toute ma gratitude à une personne qui, malheureusement, n'est plus avec nous : Pr Pirouz SHIRALI directeur de l'UCEIV. Il était toujours disponible pour les étudiants malgré son emploi de temps trop chargé, et avait toujours la bonne humeur et la professionnalité dans son travail. C'est grâce à lui que ma convention de cotutelle de thèse entre l'ULCO et l'EDST s'est faite ! J'espère que cette thèse aurait dû être à la hauteur de ses expectations.

J'adresse mes remerciements particulièrement au Pr Dominique COURCOT qui a accepté de diriger ma thèse en France. Les paroles me manquent ! M. COURCOT vous n'étiez pas seulement un directeur de thèse mais aussi un père. Malgré toutes vos occupations vous étiez toujours disponible pour moi, toujours présent pour m'aider à s'affranchir les obstacles que j'ai rencontrés durant la thèse. C'était vraiment un grand plaisir de faire votre connaissance et de travailler avec vous. J'ai beaucoup évolué, notamment sur le plan scientifique, grâce à vous ! Je suis trop chanceuse de vous avoir eu comme directeur de thèse !

Mes remerciements s'adressent aussi à Dr Frédéric LEDOUX pour l'encadrement de cette thèse. Vous étiez toujours présent pour m'apprendre les techniques de chimie, m'aider dans les manipulations, le traitement des résultats et répondre à toutes mes questions. Merci bien pour vos conseils et pour votre façon simple et compréhensive à transmettre les informations.

J'adresse un merci particulier à Dr Anthony VERDIN qui a contribué de proche à la réalisation de ma thèse. Sans ta présence c'était impossible que je termine mon travail à temps ! Merci pour ton aide dans les manipes de toxicologie, les commandes, le traitement et l'analyse de mes résultats. Merci pour ta présence et pour ton support quand le moral était bas. Malgré tout le travail que tu avais, tu étais toujours à côté des étudiants pour les aider et les encourager. C'était un grand plaisir de faire ta connaissance et de travailler ensemble, tu étais pour moi le scientifique, l'ami et le frère !

Je remercie également Pr Hélène GREIGE pour avoir accepté de diriger ma thèse au Liban. J'ai déjà fait votre connaissance depuis ma deuxième année de licence quand vous m'avez enseigné des cours de biochimie et depuis, j'étais impressionnée par la manière dont vous transmettez le message et par la logique de votre explication. Merci pour vos conseils, pour votre aide et pour avoir traité toutes vos étudiantes et moi comme tes filles.

Je souhaite également remercier Dr Zeina DAGHER pour l'encadrement de cette thèse. Je vous remercie pour vos encouragements durant toute la période de cette thèse et pour votre aide, pour m'avoir formée dès le master 2 aux bases de la culture cellulaire et pour m'avoir donné envie à la recherche dans le domaine de la pollution atmosphérique. C'est grâce à vous que j'ai fait la connaissance de cette formidable famille que j'ai eue à Dunkerque, merci !

Je tiens aussi à remercier tous les membres du Centre Commun de Mesure (CCM) à la maison de recherche de Dunkerque (MREID) Dr Fabrice CAZIER, Mme Dorothée DEWEALE, Mr Paul GENEVRAY et Mme Agnès DELBENDE pour votre aide à la réalisation de mes analyses chimiques dans votre laboratoire. C'était très agréable de travailler avec vous.

Je remercie également Mme Lucie COURCOT pour la réalisation des analyses de MEB, Mr Amaury KASPROWIAK pour son aide dans les analyses de chromatographie ionique, Mme Natacha BOUDRON pour son aide avec le speed-vac à Calais et Dr Perrine MARTIN pour son aide dans les analyses des miARNs. Une pensée va aussi à Mr Elie DAGHER qui m'a aidé durant la campagne d'échantillonnage des particules à Sin El-Fil.

Je voudrais remercier les municipalités de Bejje et de Sin El-Fil et la gendarmerie de Sin-El Fil pour leurs coopérations durant les campagnes d'échantillonnage. Merci également à Dr Antoine SAMARANI à l'EDST qui nous a fourni les données météorologiques du site de Sin-

El-Fil et au Ministère des travaux publics et du transport-Direction générale de l'aviation civile-département de la météorologie qui nous a fourni les données météorologiques du site de Bejje.

Merci à tous les doctorants de la MREID 1 et 2 qui ont contribué, chacun à sa manière, à la vie au sein du laboratoire : Mona, Mathilde, Capucine, Boris, Tarek, Lemia, Zohra, Dima et Eric. Merci également à Rémi, Cloé, Chan, Aziz, Sohayb, Eleonore et Alejandro pour les sorties que nous avons réalisées et les bons moments que nous avons partagés.

Un merci spécial à tous mes amis-collègues à Dunkerque : mon cousin Adib, Raya, Sara, Mira NAWFAL, Mira SKAF, Rabih, Doris et Eddy. Merci d'avoir été toujours à côté de moi pour m'aider à surmonter les difficultés et le stress de la thèse, chacun à sa façon. Merci pour les agréables moments que nous avons passés ensemble et pour les sourires que vous m'aviez dessinés sur mon visage. Tout simplement merci d'avoir être des sœurs et des frères.

Merci du fond du cœur à ma cousine Myriam et à mes amies Myriam, Marianne, Reine, Raghda, Rémi, Carla et Céline, qui, malgré les distances, étaient toujours à mes côtés.

Enfin, aucune formule ne serait assez forte pour remercier ma famille, mon père Elias, ma mère Lorraine, ma sœur Mélina et mon frère Georges, pour leur immense soutien moral tout au long de ces années. Merci de m'avoir supportée durant toute cette période. Merci pour vos encouragements inconditionnels ! Sans vous je n'étais pas aujourd'hui là où je suis !

J’adresse mes remerciements :

- à l’Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (UCEIV, EA4492) de l’Université du Littoral Côte d’Opale (ULCO, France), et à l’Equipe Molécules Bioactives de l’Université Libanaise, qui m’ont accueillie au sein de leurs laboratoires respectifs et ont cofinancé mes recherches ;

- au Conseil National de la Recherche Scientifique Libanais, qui a cofinancé ma mobilité et le fonctionnement de ce projet. Titre : Effet des nanoparticules atmosphériques provenant de la ville de Beyrouth sur l'épithélium respiratoire humain (contrat n° 02-07-10) ;

- à l’Agence Universitaire de la Francophonie (AUF), programme Projet de Coopération Scientifique Inter-Universitaire (PCSI), qui a cofinancé mon séjour en France. Titre du projet : Recherche de biomarqueurs d’exposition à des génotoxiques professionnels : application à l’étude de l’exposition de la police de la circulation dans la ville de Beyrouth (convention n°6317PS011) ;

- à l’Institut de Recherche en ENvironnement Industriel (IRENI), auquel se rattache cette étude, et à ses financeurs : la Communauté Urbaine de Dunkerque, la Région Nord-Pas-de-Calais, le Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche Français, le CNRS et le Fond Européen de Développement Régional (FEDER).

Valorisation scientifique

Les travaux présentés dans cette thèse et les autres traveaux auxquels j'ai contribués durant ma thèse ont été valorisés sous la forme de publications et de communications orales ou affichées lors de congrès. La liste détaillée en est présentée ci-dessous.

- **Publications dans des revues scientifiques internationales à comité de lecture :**

1. Borgie, M., Garat, A., Fabrice, C., Delbende, A., Allorge, D., Ledoux, F., Courcot, D., Shirali, P., Dagher, Z. Traffic-related air pollution. A pilot exposure assessment in Beirut, Lebanon. *Chemosphere*, 2014, 96: 122-128.

2. Dagher, Z., Borgie, M., Magdalou, J., Chahine, R., Greige-Gerges, H. *p*-Hydroxybenzoate esters metabolism in MCF7 breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, 2012, 50: 4109-4114.

- **Publications soumises à des revues scientifiques internationales à comité de lecture ou en préparation :**

  - Article soumis

3. Borgie, M., Ledoux, F., Verdin, A., Cazier, F., Greige, H., Shirali, P., Courcot, D., and Dagher, Z. Genotoxicity and epigenotoxicity of fine particulate matter sampled in Lebanon in human bronchial epithelial cells. *Environmental Research*.

  - Articles en préparation

4. Borgie, M., Ledoux, F., Dagher, Z., Dewaele, D., Genevray, P., Cazier, F., Verdin, A., Shirali, P., Greige, H., Courcot, D. Chemical characterization of $PM_{2.5-0.3}$ and $PM_{0.3}$ in urban and rural areas in Lebanon.

5. Borgie, M., Dagher, Z., Ledoux, F., Verdin, A., Cazier, F., Lepers, C., Martin, P., Billet, S., Greige, H., Shirali, P., Courcot, D. Ultrafine and fine particulate matter collected in Lebanon: Chemical characterization, in vitro cytotoxic effects and metabolizing enzymes genes expression in human bronchial epithelial cells BEAS-2B.

- **Communications lors de congrès internationaux :**

  - Communications orales

6. *European Federation of Clean Air and Environmental protection Associations (EFCA) International Symposium Ultrafine particles* - Brussels, Belgium 16-17/05/2013.
« Chemical characterizations and evaluation of toxicological effects of fine and ultrafine airborne particulates collected in Lebanon, on human bronchial epithelial cells BEAS-2B ».

M. Borgie, Z. Dagher, F. Ledoux, A. Verdin, D. Dewaele, F. Cazier, H. Greige, P. Shirali, D. Courcot.

– Communications affichées

7. *Urban Environmental Pollution* - Beijing, China 17-20/11/2013.
« Fine particulate matter: chemical characterization, cytotoxicity, metabolic enzymes gene expression and epigenetic alterations in human bronchial epithelial cells BEAS-2B ».
M. Borgie, Z. Dagher, F. Ledoux, A. Verdin, D. Dewaele, P. Genevray, F. Cazier, H. Greige, P. Shirali, D. Courcot.

- **Communications lors de congrès nationaux :**

– Communications orales

8. *20th LAAS International Scientific Conference* – Hadath, Lebanon 27-29/03/2014.
«Fine particulate matter: chemical characterization, cytotoxicity, metabolic activation, genotoxicity and epigenetic alterations in human bronchial epithelial cells BEAS-2B ».
M. Borgie, Z. Dagher, F. Ledoux, A. Verdin, D. Dewaele, P.Genevray, F. Cazier, H. Greige, P. Shirali, D. Courcot.

9. *Les secondes Journées Franco-Libanaises JFL2* – Dunkerque, France 22-25/10/2013.
« Particules atmosphériques urbaines et rurales : Caractérisation physico-chimique, cytotoxicité, induction des gènes du métabolisme et altérations épi génétiques dans des cellules épithéliales bronchiques humaines ».
M. Borgie, F. Ledoux, A. Verdin, D. Dewaele, P. Genevray, F. Cazier, H. Greige, D. Courcot, P. Shirali, Z. Dagher.

10. *Arab and Mediterranean Regional Conference on Environmental Resources Monitoring and Management (ERML)* – Beirut, Lebanon 15-16/05/2013.
« Biomonitoring of Benzene and 1,3-butadiene exposure in Beirut city traffic policemen ».
M. Borgie, A. Garat, F. Cazier, A. Mercier, C. Richeval, D. Allorge, D. Courcot, P. Shirali, Z. Dagher.

11. *Environnement et gestion durable des écosystèmes naturels au Moyen-Orient* – Beyrouth, Liban 18-20/04/2011.
« Impact toxicologique de La pollution de l'air ».
Z. Dagher, M. Borgie, F. Ledoux, M. Lhermitte, A. Tabet, G. El Dib, N. Frossard, H. Greige, D. Courcot, P. Shirali.

– Communications affichées

12. *Les secondes Journées Franco-Libanaises JFL2* – Dunkerque, France 22-25/10/2013.
« Evaluation de l'exposition au benzène et au 1,3-butadiène liée au trafic automobile ».
M. Borgie, A. Garat, F. Cazier, A, Delbende, C. Richeval, D. Allorge, F. Ledoux, D. Courcot, P. Shirali, Z. Dagher.

13. *21ème congrès de la SFTA – 51ème congrès de la STC* - Saint Malo, France 11-14/06/2013.
« Evaluation de l'exposition au benzène et au 1,3-butadiène liée au trafic automobile ».
M. Borgie, A. Garat, F. Cazier, A, Delbende, C. Richeval, D. Allorge, D. Courcot, P. Shirali, Z. Dagher.

14. *Congrès de la Société de Pharmaco-Toxicologie Cellulair*e - Châtenay-Malabry, France 06-07/06/2013.
« Caractérisation physico-chimique de particules fines et ultrafines collectées au Liban et évaluation de leur impact toxicologique sur des cellules épithéliales bronchiques humaines (BEAS-2B) ».
M. Borgie, Z. Dagher, F. Ledoux, A. Verdin, D. Dewaele, P. Genevray, F. Cazier, H. Greige, P. Shirali, D. Courcot.

- **Journées scientifiques locales :**

  - Communications affichées

15. *Journées scientifiques à l'Ecole Doctorale de Sciences et de Technologie (EDST), 3ème forum doctoral* - Beirut, Liban 25-26/06/2013.
« Particules atmosphériques ($PM_{2.5}$) urbaines et rurales : caractérisation physico-chimique, cytotoxicité et induction des gènes du métabolisme dans des cellules épithéliales bronchiques humaines (BEAS-2B) ».
M. Borgie, Z. Dagher, F. Ledoux, A. Verdin, D. Dewaele, P. Genevray, F. Cazier, H. Greige, P. Shirali, D. Courcot.

16. *Journée Institut de Recherche en Environnement Industriel (IRENI)* - Dunkerque, France 23/11/2012.
« Particules fines et ultrafines collectées au Liban : caractérisations physico-chimiques et évaluation des effets toxicologiques sur les cellules humaines BEAS-2B ».
M. Borgie, Z. Dagher, F. Ledoux, A. Verdin, D. Dewaele, F. Cazier, H. Greige, P. Shirali, D. Courcot.
Prix du meilleur poster

17. *Journées scientifiques à l'Ecole Doctorale de Sciences et de Technologie (EDST), 2ème forum doctoral* - Beirut, Liban 19-20/06/2012.
« Effets épigénétiques des particules fines et ultrafines, collectées au Liban, sur des cellules pulmonaires humaines ».
M. Borgie, Z. Dagher, F. Ledoux, H. Greige, D. Courcot, P. Shirali.

Sommaire

Liste des figures ..... **i**
Liste des tableaux ..... **vi**
Liste des abréviations ..... **ix**
Avant-propos ..... **xv**

I. Chapitre 1 : Synthèse bibliographique **1**

Partie A : La pollution de l'air : les particules atmosphériques **2**
1. La pollution atmosphérique 2
1.1. Définitions 2
1.2. Types de pollutions atmosphériques 2
1.2.1. L'échelle locale 3
1.2.2. L'échelle régionale 3
1.2.3. L'échelle globale ou mondiale 4
1.3. Les principaux polluants atmosphériques 4
1.3.1. Le monoxyde de carbone 4
1.3.2. L'ammoniac 4
1.3.3. Les oxydes d'azote 5
1.3.4. Le dioxyde de soufre 6
1.3.5. L'ozone 6
1.3.6. Les composés organiques volatils (COV) 7
1.3.7. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) 7
1.3.8. Les polychloro dibenzo-*p*-dioxines et -furanes 8
1.3.9. Les polychlorobiphényles 9
1.3.10. Les métaux lourds 10
1.3.11. La matière particulaire 10
2. Les particules atmosphériques 10
2.1. Définition 10
2.2. Classifications 11
2.2.1. Selon le processus de formation 11
2.2.2. Selon la taille 11
2.3. Cycle des particules atmosphériques 14
2.3.1. Sources 14
2.3.2. Evolution des particules dans l'atmosphère 19
2.3.3. Elimination des particules 21
2.4. Composition des particules atmosphériques 23
2.5. Normes internationaux et nationaux des particules atmosphériques 24
3. Contexte local : le Liban 25

3.1. Topographie 26
3.2. Le climat 27
3.2.1. Précipitation 27
3.2.2. Température 28
3.2.3. Vent 29
3.3. Facteurs influençant la qualité de l'air au Liban 30
3.3.1. Cas de Beyrouth 33
3.4. Qualité de l'air au Liban 35
3.4.1. Cas de Chekka et Selaata 39
3.4.2. Cas de Tripoli 40
3.4.3. Cas de Beyrouth 41
Partie B : Particules atmosphériques et pathologies respiratoires 46
1. L'appareil respiratoire : principale cible des particules atmosphériques 46
1.1. Physiologie de l'appareil respiratoire 46
1.1.1. Les épithéliums des voies aériennes inférieures 48
1.2. Interaction des particules atmosphériques avec l'appareil respiratoire 51
1.2.1. Pénétration, dépôt et clairance des particules atmosphériques 51
1.2.2. Translocation extra-pulmonaire des particules ultrafines 53
2. Biotransformation des composés organiques adsorbés sur les particules atmosphériques 55
2.1. Principe et mécanismes de biotransformation 55
2.1.1. Les réactions de phase I ou de fonctionnalisation 55
2.1.2. Les réactions de phase II ou de conjugaison 56
2.1.3. Les réactions de phase III ou de transport 57
2.2. Activation métabolique des composés organiques 57
2.2.1. Mécanismes d'induction des gènes de phase I et de phase II par les composés organiques 57
2.2.2. Biotransformation des HAP 60
2.2.3. Biotransformation des PCB 63
2.2.4. Biotransformation des PCDD et PCDF 63
3. Phosphorylation de H2A-X : réponse cellulaire aux dommages à l'ADN 64
3.1. Les protéines histones 64
3.2. γH2AX : réponse précoce aux cassures double-brin de l'ADN 64
3.2.1. Cassures double-brin de l'ADN 64
3.2.2. Phosphorylation de H2AX (γH2AX) 65
3.3. Effets des PM 67
4. Télomères et télomérases 68
4.1. Les télomères 68
4.1.1. Définition et structure 68
4.1.2. Le problème de la réplication terminale 69

4.2. Les témolmérases 71
4.2.1. Structure de la télomérase 71
4.2.2. Mécanismes de régulation de la télomérase 73
4.2.3. Rôles de la télomérase 74
4.3. Télomères / télomérases et cancer 76
4.4. Effets des PM 77
5. Modifications épigénétiques : cas des microARNs 78
5.1. ARN interférence : les microARNs 79
5.1.1. Biogenèse des miARNs 79
5.1.2. Mécanismes de régulation post-transcritionnels par les miARNs 82
5.1.3. miARNs et cancer 82
5.2. Effets des PM 82

Objectifs du travail de recherche 84

II. Chapitre 2 : Matériels et méthodes 87

Partie A : Méthodologie d'échantillonnage 88
1. Les sites de prélèvements 88
1.1. Site urbain: Sin El-Fil - Beyrouth 89
1.2. Site Rural : Bejje 90
1.3. Stations météorologiques 90
1.3.1. Site urbain 91
1.3.2. Site rural 91
2. Les prélèvements 91
2.1. Matériel 91
2.2. Principe de l'impaction en cascade 92
2.3. Protocole 95
Partie B : Préparation des échantillons de particules destinées aux études toxicologiques 97
1. Particule fines 97
2. Particules ultrafines 97
2.1. Protocoles utilisés dans la littérature 98
2.2. Extraits organiques des composites de PUF 99
2.3. Récupération des PUF retenues sur les filtres d'arrêt 100
Partie C : Caractérisation physico-chimique des particules 103
1. Dosage des éléments inorganiques 105
1.1. Préparation des échantillons 105
1.1.1. Minéralisation des particules 105
1.1.2. Conditionnement du matériel 106
1.2. Dosage par spectrométrie d'émission atomique (ICP-AES) 106

1.2.1. Principe 106
1.2.2. Conditions opératoires 107
1.3. Dosage par spectrométrie de masse (ICP-MS) 108
1.3.1. Principe 108
1.3.2. Conditions opératoires 110
2. Dosage des ions inorganiques 110
2.1. Préparation des échantillons 111
2.1.1. Lixiviation 111
2.2. Dosage par chromatographie ionique 111
2.2.1. Principe 111
2.2.2. Conditions opératoires 112
3. La microanalyse élémentaire CHNS-O 113
3.1. Principe 113
3.2. Conditions opératoires 113
4. Dosage des composés organiques 114
4.1. Préparation des échantillons 115
4.1.1. Extraction des particules pour les analyses des HAP 115
4.1.2. Extraction des particules pour l'analyse des PCDD, PCDF et PCB 116
4.2. Dosage par GC-MS 116
4.2.1. Principe 116
4.2.2. Conditions opératoires 117
5. Mesure de la surface spécifique 118
5.1. La surface spécifique 118
5.2. Principe 118
5.3. Conditions opératoires 119
6. Analyse par MEB - EDX 119
6.1. Principe 119
6.2. Préparation de l'échantillon 120
6.3. Conditions opératoires 120
Partie D : Etude toxicologique des particules atmosphériques 122
1. Matériel biologique et méthode de culture cellulaire 122
1.1. Choix du matériel biologique 122
1.2. Culture des cellules BEAS-2B 123
2. Méthodes d'analyse toxicologique 124
2.1. Détermination de la cytotoxicité globale 124
2.1.1. Particules fines 124
2.1.2. Particules ultrafines 125
2.1.3. Tests de Cytotoxicité 126
2.2. Exposition des cellules aux particules 128
2.2.1. Particules fines 129

2.2.2. Particules ultrafines 129
2.2.3. Récupération des cellules 130
2.3. Activation métabolique de la fraction organique des aérosols atmosphériques ... 130
2.3.1. Principe de la RT-PCR en temps réel (technologie TaqMan®) 130
2.3.2. Protocole expérimental 132
2.4. Expression Génique des miARNs 135
2.4.1. Principe de la RT-PCR en temps réel (technologie SYBR Green I) 135
2.4.2. Protocole expérimental 137
2.5. Activité de la télomérase 140
2.5.1. Principe de la RT-PCR en temps réel (cas des amorces Amplifluor®) 140
2.5.2. Protocole expérimental 143
2.6. Phosphorylation de l'histone H2AX 147
2.6.1. Principe de la cytométrie en flux 147
2.6.2. Protocole Expérimental 149
3. Analyses statistiques 151

III. Chapitre 3 : Caractéristiques physico-chimiques des particules fines et ultrafines collectées en milieux urbain et rural 152

1. Données météorologiques durant les périodes d'échantillonnage 153
1.1. Site Urbain : Sin El-Fil 153
1.2. Site rural : Bejje 156
2. Concentrations en PF et PUF collectées 159
3. Composition chimique des aérosols particulaires 160
3.1. Ions inorganiques, métaux et carbone total 160
3.1.1. Site Urbain 161
3.1.2. Site Rural 167
3.1.3. Comparaison de la composition des particules collectées en milieu urbain et rural…… 171
3.2. Facteur d'enrichissement 173
3.2.1. Site urbain 174
3.2.2. Site Rural 175
3.3. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques 177
3.3.1. Concentrations des HAP dans les PF et les PUF 177
3.3.2. Détermination de l'origine des HAP mesurés 180
4. Comparaison de la composition des particules à l'échelle du bassin méditerranéen 183
4.1. Particules fines 183
4.1.1. Sites de comparaison : localisation et caractéristiques 183
4.1.2. Comparaison des concentrations moyennes des composants des particules fines…… 187
4.2. Particules ultrafines 203

4.2.1. Sites de comparaison : localisation et caractéristiques 203
4.2.2. Comparaison des concentrations moyennes des composants des particules ultrafines 205
5. Conclusion 208

IV. Chapitre 4 : Etudes toxicologiques des particules atmosphériques 210

Partie A : Analyses chimiques des échantillons composites de particules 211
1. Caractéristiques physico-chimiques des échantillons composites 212
1.1. Granulométrie des particules 212
1.2. Surface spécifique 213
1.3. Etude par microscopie électronique à balayage MEB-EDX 214
2. Composition des échantillons composites 217
2.1. Composition en ions inorganiques, métaux et C total 217
2.2. Composition de la fraction organique 220
2.2.1. Hydrocarbures aromatiques polycycliques 220
2.2.2. PCDD, PCDF et PCB 223
2.2.3. Equivalent toxique total des PCDD, PCD et PCB 225
Partie B : Les effets toxicologiques des particules atmosphériques sur les cellules BEAS-2B 227
1. Etude de la cytotoxicité globale 227
1.1. Particules fines 227
1.2. Particules ultrafines 229
2. Activation métabolique de la fraction organique des aérosols atmosphériques 233
2.1. Particules fines 234
2.2. Particules ultrafines 239
2.2.1. Echantillons composites de PUF_{org} 239
2.2.2. Echantillons composites de PUF_{aq} 244
2.3. Discussion 250
3. Expression génique des miARNs 252
3.1. Discussion 254
4. Activité de la télomérase 256
4.1. Discussion 257
5. Phosphorylation de l'histone H2AX 259
5.1. Discussion 262
6. Discussion générale 263

Conclusion et perspectives 267
Références bibliographiques 271

Liste des figures

Figure I-1 : Les types de pollution atmosphérique : pollutions locales, régionales et globales. 3
Figure I-2 : Représentation schématique des trois modes de répartition en taille des particules atmosphériques. 13
Figure I-3 : Composition chimique moyenne annuelle des PM_{10} et $PM_{2,5}$ dans différents sites Européens. 24
Figure I-4 : Topographie du Liban en mettant l'accent sur les différentes altitudes dans le pays. 26
Figure I-5 : Précipitations annuelles moyennes (a) et répartition de la température moyenne annuelle au Liban (b). 28
Figure I-6 : Moyenne annuelle de la direction du vent enregistrée à l'aéroport international Rafic Hariri en 2005. 29
Figure I-7 : Limites administratives de Beyrouth et de la Région Métropolitaine de Beyrouth (RMB). 34
Figure I-8 : Composition moyenne des flux routiers à Beyrouth en 2005. 35
Figure I-9 : Localisations des zones d'étude de la qualité de l'air au Liban 38
Figure I-10 : Système respiratoire. 47
Figure I-11 : Les principaux types de cellules trouvées le long de l'épithélium des voies aériennes inférieures dans le tractus respiratoire humain. 50
Figure I-12 : Profondeur de pénétration des particules atmosphériques dans les voies respiratoires. 51
Figure I-13 : Schéma simplifié de l'induction des gènes de la phase I et II du métabolisme et du répresseur AhRR par les composés organiques. 58
Figure I-14 : Induction des gènes de phase I et de phase II du métabolisme via les voies de signalisation AhR et Nrf2. 59
Figure I-15 : Schéma d'activation métabolique du B[a]P. 62
Figure I-16 : Modèle représentant le mécanisme d'interaction entre MDC1 et le complexe MRN avant et après la cassure double-brin de l'ADN. 67
Figure I-17 : Structure primaire de l'ADN télomérique humain. 69
Figure I-18 : Le problème de la réplication terminale. 70
Figure I-19 : Structure secondaire d'hTR. 71
Figure I-20 : Représentation schématique de la structure de la protéine hTERT. 73
Figure I-21 : Modèle de l'élongation processive des télomères par la télomérase. 75
Figure I-22 : Représentation schématique de l'hypothèse télomérique du vieillissement et de l'immortalisation cellulaire. 77
Figure I-23 : Mécanisme général de biogenèse et d'action des miARNs. 81
Figure I-24 : Méthodologie générale de l'étude. 86
Figure II-1 : Localisation des sites de prélèvement. 88
Figure II-2 : Site de Prélèvement à Sin El-Fil et son environnement. 89

Figure II-3 : Site de Prélèvement à Bejje. 90
Figure II-4 : Photo d'un impacteur en cascade STAPLEX® 236. 92
Figure II-5 : Schéma du principe de l'impaction en cascade. 93
Figure II-6 : Schéma d'un impacteur en cascade de 6 étages. 94
Figure II-7 : Plaques d'impaction et filtre d'arrêt retenant les particules collectées. 96
Figure II-8 : Schéma du protocole de récupération des particules ultrafines à partir du filtre d'arrêt. 101
Figure II-9 : Stratégie de travail 104
Figure II-10 : Schéma récapitulatif des analyses des composés organiques des PF et des PUF. 115
Figure II-11 : Cellules BEAS-2B en culture observées au microscope optique inversé (x100). 123
Figure II-12 : Schéma de microplaque pour l'étude de la cytotoxicité des particules fines. 125
Figure II-13 : Principe du test de l'activité du lactate déshydrogénase. 127
Figure II-14 : Schéma du principe de la PCR en temps réel avec détection par une sonde fluorescente (technologie TaqMan®). 132
Figure II-15 : Schéma du principe de la PCR en temps réel avec détection par des agents se liant à l'ADN double brin (technologie SYBR Green I). 136
Figure II-16 : Schéma du principe de la PCR en temps réel avec détection par les amorces Amplifluor® pour la détermination de l'activité de la télomérase.. 142
Figure II-17 : Principe général de la cytométrie en flux. 147
Figure III-1: Roses des vents (enregistrées à Hadath) pour les différentes périodes d'échantillonnage de particules à Sin El-Fil (site urbain). 154
Figure III-2 : Rétrotrajectoires de masse d'air, représentatives de chaque période d'échantillonnage de la campagne de Sin El-Fil issues du modèle HYSPLIT. 156
Figure III-3 : Roses des vents (enregistrées à Tripoli) pour les différentes périodes d'échantillonnage de particules à Bejje (site rural). 157
Figure III-4 : Rétrotrajectoires de masse d'air, représentatives de chaque période d'échantillonnage de la campagne de Bejje issues du modèle HYSPLIT. 158
Figure III-5 : Répartition des ions inorganiques, du carbone total et des éléments majeurs et traces dans les particules fines (PF) des échantillons du site urbain. 163
Figure III-6 : Répartition des ions inorganiques, du carbone total et des éléments majeurs et traces dans les particules ultrafines (PUF) des échantillons du site urbain. 164
Figure III-7 : Répartition des ions inorganiques, du carbone total et des éléments majeurs et traces dans les particules fines (PF) des échantillons du site rural. 169
Figure III-8 : Répartition des ions inorganiques, du carbone total et des éléments majeurs et traces dans les particules ultrafines (PUF) des échantillons du site rural. 170
Figure III-9 : Facteurs d'enrichissement pour les éléments traces présents dans les échantillons de particules fines, de particules ultrafines et l'échantillon de sable (retombée sèche) collectés à Sin El-Fil (site urbain). 175
Figure III-10 : Facteurs d'enrichissement pour les éléments traces présents dans les échantillons des particules fines et des particules ultrafines collectés à Bejje (site rural). 176

Figure III-11 : Profils des hydrocarbures aromatiques polycycliques pour les particules fines collectées à Sin El-Fil. 179
Figure III-12 : Profils des hydrocarbures aromatiques polycycliques pour les particules ultrafines collectées à Sin El-Fil. 179
Figure IV-1 : Distribution granulométrique par MEB-EDX de l'échantillon composite de particules fines urbaines sous forme de pourcentages relatif et cumulé. 212
Figure IV-2 : Distribution granulométrique par MEB-EDX de l'échantillon composite de particules fines rurales sous forme de pourcentages relatif et cumulé. 213
Figure IV-3 : Clichés MEB et composition EDX de particules fines rurales. 215
Figure IV-4 : Clichés MEB et composition EDX de particules fines urbaines. 216
Figure IV-5 : Répartition des ions inorganiques, du carbone total et des éléments majeurs et traces dans les échantillons composites de particules fines PF-U et PF-R. 217
Figure IV-6 : Répartition des ions inorganiques, du carbone total et des éléments majeurs et traces dans les échantillons composites de particules ultrafines PUF-U et PUF-R. 218
Figure IV-7 : Concentrations en HAP associés aux aérosols particulaires des échantillons composites de PF-U et PF-R. 220
Figure IV-8 : Concentrations en HAP associés aux aérosols particulaires des échantillons composites de PUF-U et PUF-R. 221
Figure IV-9 : Activité de la Lactate DésHydrogénase (LDH) extracellulaire dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 24, 48 et 72 h à des concentrations croissantes des échantillons composites de particules fines collectées en milieux urbain et rural. 227
Figure IV-10 : Activité de la DésHydrogénase mitochondriale (DHm) dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 24, 48 et 72 h à des concentrations croissantes des échantillons composites de particules fines collectées en milieux urbain et rural. 228
Figure IV-11 : Activité de la Lactate DésHydrogénase (LDH) extracellulaire dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 24, 48 et 72 h à des concentrations croissantes des échantillons composites de particules ultrafines (PUF_{aq} et PUF_{org}) collectées en milieux urbain et rural et pendant 48 h à des concentrations croissantes équivalentes de filtre blanc (Filtre $Blanc_{aq}$ et Filtre $Blanc_{org}$). 230
Figure IV-12 : Activité de la DésHydrogénase mitochondriale (DHm) dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 24, 48 et 72 h à des concentrations croissantes des échantillons composites de particules ultrafines (PUF_{aq} et PUF_{org}) collectées en milieux urbain et rural et pendant 48 h à des concentrations croissantes équivalentes de filtre blanc (Filtre $Blanc_{aq}$ et Filtre $Blanc_{org}$). 231
Figure IV-13 : Expression génique des enzymes du métabolisme des composés organiques (*CYP1A1*, *CYP1B1* et NQO1), de leur récepteur et leur translocateur cellulaires (AhR et ARNT) et du répresseur d'AhR (AhRR) dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 24 h aux échantillons composites de PF collectées en milieux urbain et rural (C1 = 3 $\mu g/cm^2$ et C2 = 12 $\mu g/cm^2$), au TiO_2 (12 $\mu g/cm^2$) et au témoin positif (B[a]P, 1 µM). 236

Figure IV-14 : Expression génique des enzymes du métabolisme des composés organiques (*CYP1A1*, *CYP1B1* et NQO1), de leur récepteur et leur translocateur cellulaires (AhR et ARNT) et du répresseur d'AhR (AhRR) dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 48 h aux échantillons composites de PF collectées en milieux urbain et rural (C1 = 3 µg/cm^2 et C2 = 12 µg/cm^2), au TiO_2 (12 µg/cm^2) et au témoin positif (B[a]P, 1 µM). . 237
Figure IV-15 : Expression génique des enzymes du métabolisme des composés organiques (*CYP1A1*, *CYP1B1* et NQO1), de leur récepteur et leur translocateur cellulaires (AhR et ARNT) et du répresseur d'AhR (AhRR) dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 72 h aux composites de PF collectées en milieux urbain et rural (C1 = 3 µg/cm^2 et C2 = 12 µg/cm^2), au TiO_2 (12 µg/cm^2) et au témoin positif (B[a]P, 1 µM). 238
Figure IV-16 : Expression génique des enzymes du métabolisme des composés organiques (*CYP1A1*, *CYP1B1* et NQO1), de leur récepteur et leur translocateur cellulaires (AhR et ARNT) et du répresseur d'AhR (AhRR) dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 3 h aux extraits organiques de PUF (PUF_{org}) collectées en milieux urbain (C1 = 0,23 ng/cm^2 et C2 = 0,9 ng/cm^2) et rural (C1 = 0,1 ng/cm^2 et C2 = 0,4 ng/cm^2), au filtre blanc (FB_{org} ; 0,4 ng/cm^2) et au témoin positif (B[a]P, 1 µM). 242
Figure IV-17 : Expression génique des enzymes du métabolisme des composés organiques (*CYP1A1*, *CYP1B1* et NQO1), de leur récepteur et leur translocateur cellulaires (AhR et ARNT) et du répresseur d'AhR (AhRR) dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 6 h aux extraits organiques de PUF (PUF_{org}) collectées en milieux urbain (C1 = 0,23 ng/cm^2 et C2 = 0,9 ng/cm^2) et rural (C1 = 0,1 ng/cm^2 et C2 = 0,4 ng/cm^2), au filtre blanc (FB_{org} ; 0,4 ng/cm^2) et au témoin positif (B[a]P, 1 µM). 243
Figure IV-18 : Expression génique des enzymes du métabolisme des composés organiques (*CYP1A1*, *CYP1B1* et NQO1), de leur récepteur et leur translocateur cellulaires (AhR et ARNT) et du répresseur d'AhR (AhRR) dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 12 h aux extraits organiques de PUF (PUF_{org}) collectées en milieux urbain (C1 = 0,23 ng/cm^2 et C2 = 0,9 ng/cm^2) et rural (C1 = 0,1 ng/cm^2 et C2 = 0,4 ng/cm^2), au filtre blanc (FB_{org} ; 0,4 ng/cm^2) et au témoin positif (B[a]P, 1 µM). 244
Figure IV-19 : Expression génique des enzymes du métabolisme des composés organiques (*CYP1A1*, *CYP1B1* et NQO1), de leur récepteur et leur translocateur cellulaires (AhR et ARNT) et du répresseur d'AhR (AhRR) dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 24 h aux échantillons composites de PUF récupérées dans l'eau (PUF-aq ; C1 = 3 µg/cm^2 et C2 = 12 µg/cm^2), aux extraits organiques de PUF (PUF_{org}) collectées en milieux urbain (C1 = 0,23 ng/cm^2 et C2 = 0,9 ng/cm^2) et rural (C1 = 0,1 ng/cm^2 et C2 = 0,4 ng/cm^2), aux filtres blancs (FB_{aq} ; 12 µg/cm^2 et FB_{org} ; 0,4 ng/cm^2) et au témoin positif (B[a]P, 1 µM). 246
Figure IV-20 : Expression génique des enzymes du métabolisme des composés organiques (*CYP1A1*, *CYP1B1* et NQO1), de leur récepteur et leur translocateur cellulaires (AhR et ARNT) et du répresseur d'AhR (AhRR) dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 48 h aux échantillons composites de PUF récupérées dans l'eau (PUF-aq ; C1 = 3 µg/cm^2 et

C2 = 12 µg/cm^2), aux extraits organiques de PUF (PUF_{org}) collectées en milieux urbain (C1 = 0,23 ng/cm^2 et C2 = 0,9 ng/cm^2) et rural (C1 = 0,1 ng/cm^2 et C2 = 0,4 ng/cm^2), aux filtres blancs (FB_{aq} ; 12 µg/cm^2 et FB_{org} ; 0,4 ng/cm^2) et au témoin positif (B[a]P, 1 µM). 247

Figure IV-21 : Expression génique des enzymes du métabolisme des composés organiques (*CYP1A1*, *CYP1B1* et NQO1), de leur récepteur et leur translocateur cellulaires (AhR et ARNT) et du répresseur d'AhR (AhRR) dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 72 h aux échantillons composites de PUF récupérées dans l'eau (PUF-aq ; C1 = 3 µg/cm^2 et C2 = 12 µg/cm^2), aux extraits organiques de PUF (PUF_{org}) collectées en milieux urbain (C1 = 0,23 ng/cm^2 et C2 = 0,9 ng/cm^2) et rural (C1 = 0,1 ng/cm^2 et C2 = 0,4 ng/cm^2), aux filtres blancs (FB_{aq} ; 12 µg/cm^2 et FB_{org} ; 0,4 ng/cm^2)et au témoin positif (B[a]P, 1 µM). 248

Figure IV-22 : Expression génique des miARNs (miR-21, miR-26b et miR-27a) dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 24, 48 et 72 h aux échantillons composites de particules fines collectées en milieux urbain et rural (C1 = 3 µg/cm^2 et C2 = 12 µg/cm^2) et au TiO_2 (12 µg/cm^2). 253

Figure IV-23 : Activité de la télomérase rapportée à celle du témoin dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 24, 48 et 72 h aux échantillons composites de particules fines collectées en milieux urbain et rural (C1 = 3 µg/cm^2 et C2 = 12 µg/cm^2) et au TiO_2 (12 µg/cm^2). 257

Figure IV-24 : Niveaux de H2AX phosphorylés (γH2AX) normalisés par rapport à la quantité d'ADN et rapportés à ceux du témoin dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 24, 48 et 72 h aux échantillons composites de particules collectées en milieu urbain (PF-U) et rural (PF-R) (C1 = 3 µg/cm^2 et C2 = 12 µg/cm^2) et au TiO_2 (12 µg/cm^2) pour chaque phase du cycle cellulaire (G0/G1, S et G2 /M). 261

Liste des tableaux

Tableau I-1 : Classification des particules atmosphériques selon leur taille : dénominations et définitions correspondantes. 14
Tableau I-2 : Estimation des émissions de particule..... 15
Tableau I-3 : Valeurs recommandées par le Ministère de l'environnement libanais (1996 et 2003), l'OMS (2006) et l'US-EPA pour les particules atmosphériques..... 25
Tableau I-4 : Résumé des études sur la qualité de l'air réalisées au Liban et polluant ciblé..... 37
Tableau I-5 : Zones conductrice et respiratoire des voies aériennes inférieures chez l'Homme.. 48
Tableau I-6 : Principales réactions de la phase II du métabolisme..... 56
Tableau II-1: Diamètres aérodynamiques équivalents pour des particules de masse volumique 2 g/cm^3 (Impacteur STAPLEX® modèle 236 ; 34m^3/h)..... 94
Tableau II-2 : Echantillons de Particules Fines (PF) et de Particules UltraFines (PUF) collectés dans les sites urbain et rural. 96
Tableau II-3 : Caractéristiques de la méthode de dosage des éléments par ICP-AES..... 108
Tableau II-4 : Caractéristiques de la méthode de dosage des éléments par ICP-MS. 110
Tableau II-5 : Limites de détection (ppm) des ions analysés..... 113
Tableau II-6 : Les gammes d'étalonnage pour l'analyse du C total 114
Tableau II-7 : Tableau récapitulatif des analyses chimiques réalisés sur les échantillons individuels et les échantillons composites de PF et de PUF urbains et rurals. 121
Tableau II-8 : Programme d'amplification à cycle rapide de la PCR en temps réel utilisé dans l'étude de l'expression génique des miARNs. 140
Tableau II-9 : Programme d'amplification de la RT-PCR en temps réel utilisé pour l'évaluation de l'activité des télomérases. 146
Tableau III-1: Classification des vitesses du vent rencontrées lors de nos campagnes de prélèvement. 153
Tableau III-2 : Concentrations (µg/m^3) de PF et de PUF des échantillons collectés à Sin El-Fil (site urbain) et à Bejje (site rural). 159
Tableau III-3 : Concentrations (ng/m^3) en ions inorganiques, éléments majeurs, éléments traces et carbone total dans les échantillons de particules fines et ultrafines collectées à Sin El-Fil (site urbain)..... 162
Tableau III-4 : Concentrations (µg/g) des métaux et des ions inorganiques dans l'échantillon de sable (retombée sèche) collecté à Sin El-Fil le 18 mai 2011. 166
Tableau III-5 : Concentrations (ng/m^3) en ions inorganiques, éléments majeurs, éléments traces et carbone total dans les échantillons de particules fines et ultrafines collectées à Bejje (site rural)..... 168
Tableau III-6 : Structures chimiques des HAP analysés..... 178
Tableau III-7 : Valeurs des rapports des HAP utilisés comme indicateur de source..... 180

Tableau III-8 : Rapports entre concentrations en HAP pour les échantillons de particules fines et de particules ultrafines collectées en milieu urbain 181
Tableau III-9 : Caractéristiques des sites de comparaison choisis dans le bassin méditerranéen (cas des EM, IIS et C total) 184
Tableau III-10 : Caractéristiques des sites de comparaison choisis dans le bassin méditerranéen (cas des éléments traces) 185
Tableau III-11 : Caractéristiques des sites de comparaison choisis dans le bassin méditerranéen (cas des HAP) 186
Tableau III-12 : Comparaison de la moyenne arithmétique des concentrations des EM, ions secondaires et marins et C total (ng/m^3). 189
Tableau III-13 : Comparaison de la moyenne arithmétique des concentrations des éléments traces avec celles rencontrées dans d'autres sites du bassin méditerranéen (ng/m^3) 195
Tableau III-14 : Comparaison de la moyenne arithmétique des concentrations des HAP avec celles rencontrées dans d'autres sites du bassin méditerranéen (ng/m^3)..... 201
Tableau III-15: Caractéristiques des sites de comparaison pour les PUF (cas des EM, IIS et C total) 204
Tableau III-16: Caractéristiques des sites de comparaison pour les PUF (cas des HAP)..... 204
Tableau III-17 : Comparaison de la moyenne arithmétique des concentrations des EM, ions secondaires et C total (ng/m^3) 207
Tableau III-18 : Comparaison de la moyenne arithmétique des concentrations en HAP (ng/m^3) 207
Tableau IV-1 : Concentrations (ng/m^3, µg/g de particules fines et µg/mL d'extrait de particules ultrafines) des ions inorganiques, éléments majeurs, éléments traces et carbone total dans les aérosols particulaires des échantillons composites de PF-U, PF-R, PUF-U et PUF-R. 219
Tableau IV-2 : Concentrations (pg/m^3, ng/g de particules fines et ng/mL d'extrait organique de particules ultrafines) des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les aérosols atmosphériques des échantillons composites de particules fines et ultrafines des sites urbain et rural. 222
Tableau IV-3 : Concentrations (en fg/m^3 et ng/g) des polychlorodibenzo-*p*-dioxines dans les aérosols atmosphériques des composites de particules fines et ultrafines des sites urbain (U) et rural (R). 223
Tableau IV-4 : Concentrations (en fg/m^3 et ng/g) des polychlorodibenzo-furanes dans les aérosols atmosphériques des composites de particules fines et ultrafines des sites urbain et rural. 223
Tableau IV-5 : Concentrations (en fg/m^3 et ng/g) des polychlorobiphényles de type dioxines dans les aérosols atmosphériques des composites de particules fines et ultrafines des sites urbain et rural. 224

Tableau IV-6 : Equivalents toxiques des mélanges de PCDD, PCDF et PCB (dioxines-like) déterminés dans les échantillons composites de PF et de PUF en milieu urbain et rural. 226
Tableau IV-7 : Tableau récapitulatif des concentrations en échatillons composites (particules fines et particules ultrafines) utilisées pour exposer les cellules BEAS-2B et étudier les mécanismes toxicologiques sous-jacents. 233
Tableau IV-8 : Expression génique des enzymes du métabolisme des composés organiques (*CYP1A1*, *CYP1B1* et NQO1), de leur récepteur et leur translocateur cellulaires (AhR et ARNT) et du répresseur d'AhR (AhRR) dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 24, 48 et 72 h aux composites de PF collectées en milieux urbain et rural. 235
Tableau IV-9 : Expression génique des enzymes du métabolisme des composés organiques (*CYP1A1*, *CYP1B1* et NQO1), de leur récepteur et leur translocateur cellulaires (AhR et ARNT) et du répresseur d'AhR (AhRR) dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 3, 6, 12, 24, 48 et 72 h aux extraits organiques des échantillons composites de PUF (sites urbain et rural)..... 240
Tableau IV-10 : Expression génique des enzymes du métabolisme (*CYP1A1*, *CYP1B1* et NQO1), de leur récepteur et leur translocateur cellulaires (AhR et ARNT) et du répresseur d'AhR (AhRR) dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 24, 48 et 72 h aux composites de PUF récupérées dans l'eau (sites urbain et rural). 245
Tableau IV-11 : Expression génique des miARNs (miR-21, miR-26b et miR-27a) dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 24, 48 et 72 h aux échantillons composites de particules fines collectées en milieux urbain et rural (C1 = 3 µg/cm^2 et C2 = 12 µg/cm^2) et au TiO_2 (12 µg/cm^2). 252
Tableau IV-12 : Activité de la télomérase rapportée à celle du témoin dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 24, 48 et 72 h aux échantillons composites de particules fines collectées en milieux urbain et rural (C1 = 3 µg/cm^2 et C2 = 12 µg/cm^2) et au TiO_2 (12 µg/cm^2). 257
Tableau IV-13 : Niveaux de H2AX phosphorylés (γH2AX) normalisés par rapport à la quantité d'ADN et rapportés à ceux du témoin dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 24, 48 et 72 h aux échantillons composites de particules fines collectées en milieu urbain (PF-U) et rural (PF-R) (C1 = 3 µg/cm^2 et C2 = 12 µg/cm^2), au TiO_2 (12 µg/cm^2) et pendant 20 min au H_2O_2 1 µM (témoin positif) pour chaque phase du cycle cellulaire (G0/G1, S et G2 /M). 260

Liste des abréviations

A

Ace :	Acénaphtène
Acy :	Acénaphtylène
ADN:	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc :	ADN complémentaire
Ag :	Argent
Ago :	Argonaute
AhR :	Aryl hydrocarbon Receptor
AhRR :	AhR Repressor
AIP-XAP2 :	immunophilin-like protein hepatitis B virus X-associated protein 2
AKR :	Aldo-Kéto Réductases
Al :	Aluminium
ALT :	Alternative Lengthening of Telomere
Anth :	Anthracène
AOS :	Aérosols Organiques Secondaires
Ar :	Argon
ARE :	Antioxidant Responsive Element
ARN :	Acide RiboNucléique
ARNm :	ARN messager
ARNT :	AhR Nuclear Translocator
As :	Arsenic
ASE :	Accelerated Solvent Extraction
ATM :	Ataxia Telangiectasia Mutated protein
ATP:	Adénosine TriPhosphate
ATR :	ATM and Rad3-related protein

B

Ba :	Baryum
B[a]An :	Benzo[a]anthracène
B[a]P :	Benzo[a]Pyrène
B[b]Fl :	Benzo[b]fluoranthène
BCA :	Bicinchoninic Assay
BEBM :	Bronchial Epithelial cell Basal Medium
BEGM :	Bronchial Epithelial cell Growth Medium
B[e]P :	Benzo([e]Pyrène
BET :	Brunauer Emmet Teller
B[g,h,i]Pe :	Benzo[g,h,i]perylène
Bi :	Bismuth
B[k]Fl :	Benzo[k]fluoranthène
BPCO :	Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive
BPDE :	B[a]P-7,8-Diol-Epoxyde

BTX : Benzène, Toluène, Xylène
BTEX : Benzène, Toluène, Ethylbenzène, Xylène

C

C : Carbone
Ca^{2+} : Ion calcium
Cd : Cadmium
CFC : ChloroFluoroCarbures
CH_4 : Méthane
Chr : Chrysène
CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer
Cl^- : Ions chlorures
Co : Cobalt
CO : Monoxyde de carbone
CO_2 : Dioxyde de carbone
COV : Composés Organiques Volatils
COVM : COV Méthaniques
COVNM : COV Non Méthaniques
Cr : Chrome
CR : Conserved Region
C_T : Cycle Threshold
C total : Carbone total
C-terminale : Carboxy-terminale
Cu : Cuivre
CYP450 : Cytochrome P450

D

d_{ae} : Diamètre aérodynamique équivalent
DD : Dihydrodiol Déshydrogénase
DEPC : DiEthyl PyroCarbonate
DGCR8 : DiGeorge Syndrome Critical Region gene 8
DHm : DésHydrogénase mitochondriale
DiB[a,h]An : Dibenzo[a,h]Anthracène
DMSO : Diméthyl Sulfoxide
DNAPKcs : DNA-dependant Protein Kinase - catalytic subunit
DNase : DésoxyriboNucléase
dNTP : désoxy-Nucléotides-TriPhosphates
$D_{p,50}$: Diamètre de coupure
DSB : Double Strand DNA Breaks
dTTP : désoxy-Thymidine-TriPhosphates

E

EH: Epoxyde Hydrolase
EM : Eléments Majeurs

ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène
ET : Eléments Traces
ETM : Eléments Traces Métalliques

F

FB_{aq} : Fitre blanc-aqueux
FB_{org} : Fitre blanc-organique
Fe : Fer
F.E. : Facteur d'Enrichissement
Fla : Fluoranthène
Flu : Fluorène
FS : Forward Scatter

G

γH2AX : Gamma-H2AX, phosphor-H2AX
GC-MS : Gas Chromatography-Mass Spectrometry
GHG : GreenHouse Gas
GST : Glutathion-S-Transférases

H

H : Hydrogène
HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HCl : Acide chlorhydrique
$HClO_4$: Acide perchlorique
HF : Acide fluorhydrique
HNO_3 : Acide nitrique
H_2O : Vapeur d'eau
H_2O_2 : Peroxyde d'hydrogène
H_2SO_4 : Acide sulfurique
Hsp 90 : Heat shock protein 90
hTERT : human TElomerase Reverse Transcriptase
hTR : human Telomerase RNA
HYSPLIT : HYbrid Single-Particles Lagrangian Integrated Trajectory

I

ICP-AES : Inductively coupled Plasma-Atomic Emission Spectroscopy
ICP-MS : Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry
Ig : Immunoglobuline
IIS : Ions Inorganiques Secondaires
IM : Ions Majeurs
InPy : Indéno[1,2,3-cd]Pyrène
IRIF : Ionizing Radiation Induced Foci
I-TEQ : International Toxic Equivalent Quantity

K

K^+:	Ion potassium
kDa :	KiloDalton

L

LDD :	Limite De Détection
LDH :	Lactate déshydrogénase
LDQ :	Limite De quantification

M

MDC1 :	Mediator of DNA Damage Checkpoint protein 1
MEB-EDX :	Microscopie Electronique à Balayage-Energie Dispersive de rayons X
Mg^{2+}:	Ion magnésium
miARN :	microARN
miRISC :	miRNA- Induced Silencing Complex
Mn:	Manganèse
MRE11 :	Meiotic REcombination protein 11
MRN :	Mre11-Rad50-Nbs1
m/z :	masse/charge

N

N :	Azote
N_2:	Diazote
Na^+ :	Ion sodium
NaCl :	Chlorure de sodium
NAD(P)H :	Nicotinamide Adénine Dinucléotide (Phosphate)
Nap :	Naphtalène
Nb :	Niobium
NBS1 :	Nijmegen Breakage Syndrome protein
ND :	Non Déterminé
NH_3 :	Ammoniac
NH_4^+ :	Ions Ammoniums
Ni :	Nickel
NO :	Monoxyde d'azote
NO_2 :	Dioxyde d'azote
NO_x :	Oxydes d'azote
NO_3^- :	Ions Nitrates
NQO1 :	NAD(P)H-Quinone Oxydoréductase 1
Nrf2 :	NF-E2-related factor 2

O

O :	Oxygène
O_2 :	Dioxygène

O_3 :	Ozone
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
ORF :	Open Reading Frame

P

P:	Phosphore
Pb :	Plomb
PBS :	Phosphate Buffer Saline
PCB :	PolyChloroBiphényles
PCB-DL :	PCB Dioxin-Like
PCDD :	PolyChloro Dibenzo-*p*-Dioxines
PCDF :	PolyChloro DibenzoFuranes
PCR :	Polymerase Chain Reaction
PF :	Particules Fines
PF-R :	Particules Fines Rurales
PF-U :	Particules Fines Urbaines
Phase G :	Growth
Phase M :	Mitose
Phase S :	Synthèse
Phe :	Phénanthrène
PIKK :	Phosphatydil-Inositol-3-Kinase related Kinase
PM :	Particulate Matter, matière particulaire
PMT :	Photomultiplying tube
PO_4^{3-} :	Ions phosphates
pré-miARN :	précurseur du miARN
pri-miARN :	miARN primaire
PSM :	Poste de Sécurité Microbiologique
PTFE :	PolyTétraFluoroEthylène
PUF:	Particules UltraFines
PUF_{aq} :	Particules Ultrafines-aqueuses
PUF_{org} :	Particules Ultrafines-organiques
PUF-R :	Particules Ultrafines Rurales
PUF-U :	Particules Ultrafines Urbaines
Pyr :	Pyrène

R

Rb :	Rubidium
RISC :	RNA-Induced Silencing Complex
RNase :	RiboNucléase
RQ :	Relative Quantitation
RT-PCR :	Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction

S

S :	Soufre
Sb :	Antimoine

Sc :	Scandium
Sn :	Etain
SO_2 :	Dioxyde de soufre
SO_4^{2-} :	Ions Sulfates
Sr :	Strontium
SS :	Side Scatter
ST :	Sulfo-Transférases
SuT :	Substrat de la Télomérase

T

TCDD :	TétraChloro Dibenzo-*p*-Dioxines
Te :	Tellure
TEDO :	Observatoire de l'environnement et de développement de Tripoli
TEF :	Toxic Equivalent Factor
Ti :	Titane
TiO_2 :	Dioxyde de titane
Tl :	Thallium
TSP :	Total Suspended Particulate

U

UGT :	UDP-Glucuronosyl-Transférases
US-EPA :	United States-Environmental Protection Agency
UTR :	UnTranslated RNA

V

V :	Vanadium
vs :	Versus

X

XRE :	Xenobiotic Responsive Element

Z

Zn :	Zinc

Avant-propos

A chacun d'entre nous le droit à respirer un air qui ne nuise pas à sa santé, c'est-à-dire un air dans lequel les concentrations de substances éventuellement nuisibles pour la santé humaine et les autres écosystèmes ne dépassent pas les niveaux de référence définis. Cette notion introduite dans la loi sur l'air du droit français pose de façon concrète le problème de la pollution atmosphérique en termes de Santé Publique. Autrefois limitée aux villes industrialisées et densément peuplées, la pollution atmosphérique est aujourd'hui un problème ubiquitaire et, n'ayant pas de frontière, représente donc une menace sanitaire insidieuse pour l'ensemble des nations.

La pollution atmosphérique est un mélange hétérogène et complexe de polluants souvent présents à des concentrations très variables. L'évaluation des risques liés aux expositions multiples comporte des incertitudes incluant la mauvaise connaissance de la nature et de l'importance des interactions entre les différents constituants de ces mélanges. Toutefois, les preuves d'une relation causale entre les variations quotidiennes des niveaux de pollution atmosphérique et le risque de mortalité et de morbidité se sont accumulées dans la littérature (Dominici *et al.*, 2005 ; Katsouyanni *et al.*, 1997 ; Spix *et al.*, 1998 ; Zeka *et al.*, 2005). En effet, une élévation de 10 $\mu g/m^3$ de la concentration en matière particulaire (PM) ayant un diamètre aérodynamique inférieur à 2,5 µm ($PM_{2,5}$) provoquerait une augmentation de 26% le risque de mortalité par cause cardio-vasculaire (Lepeule *et al.*, 2012), et serait associée à une augmentation de 8% de l'incidence du cancer pulmonaire (ERS, 2010). De plus, de nombreuses études épidémiologiques ont montré que l'exposition aux $PM_{2,5}$ pouvait aboutir à des maladies cardiovasculaires (Puett *et al.*, 2011) et respiratoires telles que l'asthme (Silverman et Ito, 2009), la bronchite et la Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO), (Tsai *et al.*, 2013) ainsi qu'à une augmentation du taux d'hospitalisation pour cause de déficiences respiratoires (Linares et Diaz, 2010).

En raison de la pollution générée par l'urbanisation rapide dans le monde entier ainsi que par l'augmentation de la consommation d'énergies fossiles et des émissions provenant des secteurs industriel et de transport, le tractus respiratoire humain est maintenant exposé non seulement à une plus grande quantité mais surtout à une plus grande diversité de polluants de

l'air ambiant. Il n'est donc probablement pas surprenant d'assister à une augmentation de l'incidence des maladies des voies respiratoires. Ce constat nécessite de parvenir à mieux comprendre les effets des polluants sur cette cible chez l'homme et conduit aujourd'hui la communauté scientifique a concentré d'importants moyens de recherche sur cette problématique (Kelly et Fussell, 2011).

Récemment, les recherches scientifiques ont été orientés vers l'étude des particules ultrafines (particules ayant un diamètre aérodynamique inférieur à 0,1 µm ; $PM_{0,1}$) qui sont devenues une préoccupation majeure en raison de leurs effets nocifs sur la santé. Entrant dans la gamme des nanoparticules et étant présentes en grand nombre dans l'atmosphère, les particules ultrafines ont la capacité d'adsorber plus de composés chimiques de l'air que les particules plus grossières et d'avoir une surface de contact plus importante avec les cellules épithéliales des voies respiratoires. De plus, elles peuvent pénétrer plus profondément dans les poumons et sont suspectées d'atteindre la circulation sanguine et d'être ensuite distribuées à des organes extra-pulmonaires où elles peuvent être déposées, exerçant ainsi une toxicité dans l'ensemble du corps humain.

Malgré l'avancement de la recherche dans le domaine des $PM_{2,5}$ et, dans une moindre mesure sur les $PM_{0,1}$, et de leurs effets sur la santé, le rôle des différents composés qui constituent les particules ainsi que les processus impliqués dans leurs toxicités restent mal connus. Par conséquent, des études supplémentaires sont nécessaires afin de mieux comprendre leurs mécanismes d'action et leur implication dans l'apparition de nombreuses maladies comme le cancer du poumon qui est la principale cause de décès par cancer, et qui concerne plus d'un million de personnes chaque année dans le monde (Jemal *et al.*, 2010).

Le Liban, situé dans le bassin de la méditerranée orientale, est un pays en cours de développement où les niveaux de PM dépassent régulièrement les normes fixées par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (Saliba *et al.*, 2010). Suite à l'absence d'un système de transport efficace (MoE/URC/GEF, 2012), les émissions dues au trafic routier constituent la principale cause de l'élévation du niveau des PM, particulièrement dans les zones urbaines. Les études sur la pollution particulaire réalisées au Liban ont été généralement limitées aux zones urbaines et ont principalement porté sur la détermination de la composition des particules grossières et fines en ions et éléments inorganiques (Kouyoumdjian et Saliba, 2006 ; Massoud *et*

al., 2011 ; Saliba *et al.*, 2010) et seules quelques rares études ont déterminé la composition de ces particules en composés organiques (Daher *et al.*, 2013 ; Shaka et Saliba, 2004) ou se sont intéressées aux particules de plus petites tailles (Daher *et al.*, 2013). De plus, à nos connaissances, aucune étude au Liban n'a évalué les effets toxiques des particules fines ou ultrafines, en comparant leurs origines, sur des cellules pulmonaires humaines.

Dans le présent travail de thèse, deux campagnes de prélèvement de particules fines et ultrafines ont été réalisées au Liban sur un site urbain (Beyrouth) et un second site rural, entre mai et octobre 2011. Une attention particulière a été portée à la caractérisation physico-chimique des particules collectées durant les différentes périodes d'échantillonnage des deux campagnes, puis à la détermination de leur cytotoxicité et leur rôle dans l'induction des mécanismes cellulaires, tels que l'activation métabolique des composés organiques, les cassures de l'ADN, la modification de l'expression des microARNs (miARNs) et l'induction de l'activité de la télomérase, pouvant aboutir au développement tumoral dans des cellules épithéliales bronchiques humaines (BEAS-2B) en culture.

Ce manuscrit se compose de quatre chapitres :

Une synthèse bibliographique des données existantes sur la pollution atmosphérique particulaire, sur la qualité de l'air au Liban ainsi que sur l'impact des particules sur la santé humaine est présentée dans le chapitre 1, et suivie d'une description des objectifs de ce travail.

Dans le deuxième chapitre, nous décrivons les sites et la méthode d'échantillonnage des particules, ainsi que les méthodes et les protocoles d'analyses chimiques et toxicologiques utilisés pour déterminer respectivement les caractéristiques physico-chimiques des particules collectées et leurs effets toxiques sur des cellules pulmonaires humaines.

Dans le chapitre 3, nous présentons et discutons les résultats des analyses physico-chimiques des échantillons de particules fines et ultrafines collectées durant les différentes périodes d'échantillonnage.

Le quatrième et dernier chapitre est consacré aux résultats des analyses physico-chimiques des échantillons composites de particules fines et ultrafines utilisés pour exposer les cellules BEAS-2B ainsi que les résultats et la discussion de l'étude des mécanismes moléculaires induits par ces particules sur les cellules pulmonaires.

Nous clôturerons ce manuscrit par une conclusion générale et proposerons des perspectives en vue d'approfondir notre étude.

I. Chapitre 1 :

Synthèse bibliographique

Le premier chapitre sera subdivisé en deux parties. La partie A est consacrée à la description des particules atmosphériques puis à la présentation des facteurs qui influencent la qualité de l'air au Liban ainsi qu'aux études sur la qualité de l'air déjà réalisées dans le contexte libanais. Ensuite dans la partie B, seront présentées l'anatomie et la physiologie de l'appareil respiratoire ainsi que les interactions des particules atmosphériques avec les voies respiratoires avant de passer à la présentation de certains mécanismes de toxicité pouvant être induits par des particules, et qui pourraient influencer leur potentiel cancérogène tels que l'activation métabolique, la génotoxicité (phosphorylation du variant H2AX de l'histone H2A et activité télomérase) et l'altération épigénétique (microARNs).

Partie A :

La pollution de l'air : les particules atmosphériques

1. La pollution atmosphérique

1.1. Définitions

Le Conseil de l'Europe dans sa déclaration de mars 1968 a proposé une définition pour la pollution de l'air : "il y a pollution atmosphérique lorsque la présence d'une substance étrangère ou une variation importante dans la proportion de ses composants est susceptible de provoquer un effet nocif, compte tenu des connaissances scientifiques du moment, ou de créer ou une nuisance ou une gêne".

Selon l'article 2 de la Loi sur l'Air et l'Utilisation Rationnelle de l'Energie (LAURE) (France, Loi N°96-1236 du 30 décembre 1996), la pollution atmosphérique est définie comme : "l'introduction par l'Homme, directement ou indirectement, dans l'atmosphère et les espaces clos, de substances ayant des conséquences préjudiciables de nature à mettre en danger la santé humaine, à nuire aux ressources biologiques et aux écosystèmes, à influer sur les changements climatiques, à détériorer les biens matériels, à provoquer des nuisances olfactives excessives".

D'après l'OMS, la pollution de l'air est la contamination de l'environnement intérieur ou extérieur par tout agent chimique, physique ou biologique qui modifie les caractéristiques de l'atmosphère (WHO, 2011). Ceci a lieu lorsque divers gaz, gouttelettes et particules se trouvent dans l'atmosphère au-delà de leurs concentrations normales et/ou y sont introduits par des sources anthropiques ou des phénomènes naturels.

1.2. Types de pollutions atmosphériques

La pollution de l'air n'a pas de barrière. Ainsi, certains polluants atmosphériques dont la durée de vie est élevée, peuvent migrer loin de leurs sources d'émission en interférant à différentes échelles spatiales. C'est pour cette raison que lors de la classification des phénomènes de pollution, il faut faire référence à l'échelle d'étude. Souvent dans la littérature, on se limite à

trois niveaux d'échelles : locale, régionale et globale (Figure I-1) (Chang *et al.*, 2000 ; Elichegaray *et al.*, 2010 ; Monks *et al.*, 2009 ; Ramanathan et Feng, 2009).

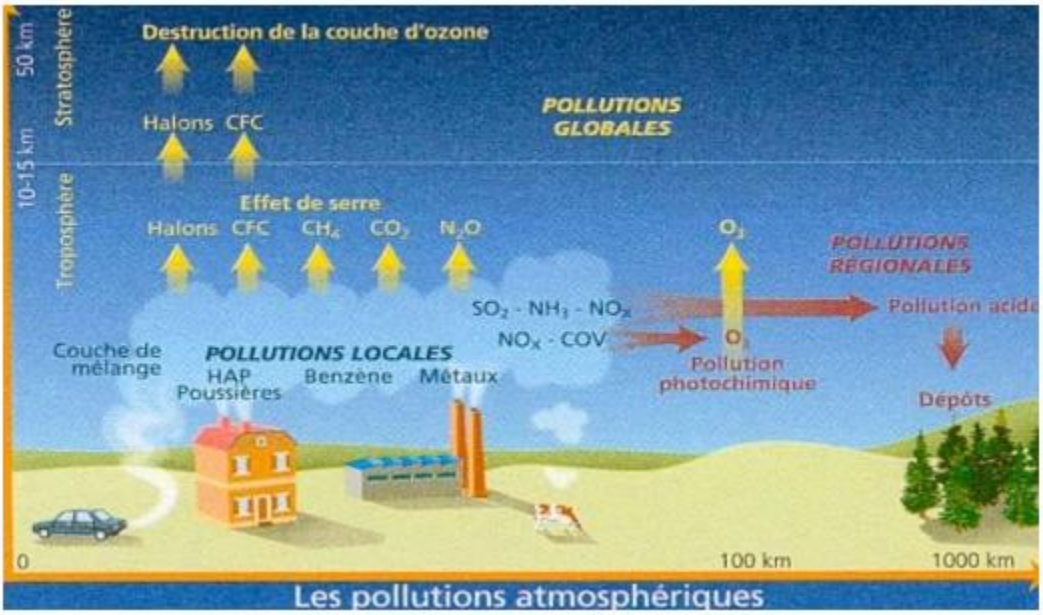


Figure I-1 : Les types de pollution atmosphérique : pollutions locales, régionales et globales.

1.2.1. L'échelle locale

Il s'agit des pollutions rencontrées au voisinage direct des sources d'émissions comme les foyers industriels de combustion, les axes de circulation, le chauffage domestique, l'incinération des déchets, etc. Ces sources engendrent des pollutions de proximité et/ou des nuisances olfactives à des distances inférieures à quelques kilomètres. En effet, la matière particulaire en suspension (Particulate Matter, PM), les oxydes d'azote (NO_x), le dioxyde de soufre (SO_2), le monoxyde de carbone (CO), les Composés Organiques Volatils (COV), les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) et les métaux constituent les polluants les plus caractéristiques de ce type de pollution.

1.2.2. L'échelle régionale

La pollution régionale touche les zones distantes de quelques kilomètres à quelques centaines de kilomètres des sources d'émission de polluants. Cette pollution résulte des phénomènes physico-chimiques plus ou moins complexes à l'origine de la formation dans l'atmosphère de polluants dits « secondaires » à partir de polluants dits « primaires » rejetés par

des sources émettrices. Notamment l'ozone (O_3), dont la formation dépend de la présence des NOx et des COV, est le principal représentant de la pollution photochimique ainsi que les acides nitriques et sulfuriques, à partir des NO_x et du SO_2, sont responsables de la formation des pluies acides.

1.2.3. L'échelle globale ou mondiale

Elle correspond à une pollution à l'échelle de la planète, susceptible d'affecter l'équilibre de l'écosystème. Elle se caractérise par les substances impliquées dans le phénomène de changement climatique, notamment les gaz à effet de serre et en particulier le dioxyde de carbone (CO_2) et par les substances responsables de la diminution de la couche d'ozone stratosphérique, principalement les émissions de ChloroFluoroCarbures (CFC).

1.3. Les principaux polluants atmosphériques

Plusieurs éléments sont considérés comme des polluants de l'air parce qu'ils n'existent pas naturellement dans l'air ou ne s'y trouvent qu'à de très faibles niveaux de concentration, et qu'ils sont nocifs pour la santé et pour l'environnement. Ces polluants se divisent en deux catégories : gaz et particules.

1.3.1. Le monoxyde de carbone

Le monoxyde de carbone (CO) est formé par la combustion incomplète du carbone et provient essentiellement des moteurs des véhicules et des installations de combustion mal réglées. Il se fixe sur l'hémoglobine et peut entraîner des troubles respiratoires, des effets asphyxiants, des maux de tête et des troubles cardiaques.

1.3.2. L'ammoniac

L'ammoniac (NH_3) est un dérivé courant des déjections animales. Le bétail et la volaille sont souvent alimentés à l'aide d'une nourriture riche en protéines contenant un excédent d'azote dont la partie non métabolisée en protéines animales est rejetée dans les urines et les excréments puis transformée en ammoniac par une action microbienne. La fertilisation avec des engrais à base d'ammonium conduit aussi à des pertes de NH_3 gazeux dans l'atmosphère. D'autre part, la

combustion de la biomasse est une source non négligeable d'ammoniac, ce composé réduit est émis lors des phénomènes de pyrolyse de la matière végétale qui précèdent la combustion. Dans l'air, il contribue à la formation de fines particules de nitrate d'ammonium et de sulfate d'ammonium, et contribue aux phénomènes d'acidification et d'eutrophisation des milieux naturels par dépôt de matière azotée (Anderson *et al.*, 2003 ; Sutton *et al.*, 2000 ; Webb *et al.*, 2014). C'est un gaz odorant et irritant à forte concentration (Bhalla *et al.*, 2011).

1.3.3. Les oxydes d'azote

Les oxydes d'azotes (NO_x) comprennent le monoxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO_2). Ces composés sont essentiellement émis lors des phénomènes de combustion notamment, par le secteur des transports (véhicules) et les installations de combustion (chauffage, centrales thermiques, etc.) (OMS, 2011).

Le NO est issu des phénomènes de combustion à haute température par oxydation de l'azote de l'air, soit la réaction R1 :

$$N_2 + O_2 + \text{chaleur} \rightarrow 2NO \qquad (R1)$$

A température ambiante, le NO est instable et réagit avec l'oxygène (ou l'ozone) pour former du NO_2, soit les réactions R2 ou R3:

$$2NO + O_2 \rightarrow 2NO_2 \qquad (R2) \qquad \text{ou} \qquad NO + O_3 \rightarrow NO_2 + O_2 \qquad (R3)$$

Les oxydes d'azote participent à la formation de polluants photochimiques comme l'ozone, néfastes pour la santé, et à la formation de l'acide nitrique qui contribue d'une part au phénomène de pluies acides et d'autre part à la formation des particules secondaires de nitrate d'ammonium et de nitrate de sodium par conversion gaz-particule.

Parmi les NO_x, le NO_2 est le plus nocif pour la santé humaine (Brunekreef et Holgate, 2002). C'est un gaz irritant pour l'appareil respiratoire et il favorise l'hyperréactivité bronchique. Les populations asthmatiques semblent être plus sensibles également à ce polluant, et chez l'enfant il peut favoriser des infections pulmonaires (OMS, 2011). Sa valeur moyenne d'exposition annuelle recommandée par l'OMS est de 40 $\mu g/m^3$ (WHO, 2005).

1.3.4. Le dioxyde de soufre

Le dioxyde de soufre (SO_2) a pour origine principale la combustion des énergies fossiles (diesel, charbon) riches en soufre. Les principales sources de SO_2 sont donc les installations de chauffage industriel et domestique, la production d'électricité et les véhicules à moteur (OMS 2011). Certains procédés industriels produisent également des effluents soufrés tels que les raffineries de pétrole ainsi que certains procédés de fabrication. Le SO_2 peut avoir aussi des sources naturelles dont les plus importantes sont les feux de forêts et les éruptions volcaniques (INERIS, 2011). Ce gaz peut s'oxyder puis se transformer en acide sulfurique qui contribue au phénomène de pluies acides et à la formation de particules secondaires par sa neutralisation avec l'ammonium (OMS, 2011).

Le SO_2 est un gaz irritant pour l'appareil respiratoire et engendre une exacerbation de l'asthme, des bronchites chroniques et une sensibilisation aux infections respiratoires. La valeur guide préconisée par l'OMS est de 20 µg/m^3 comme moyenne journalière (WHO, 2005).

1.3.5. L'ozone

La production d'O_3 troposphérique directement par des sources anthropiques ou naturelles est pratiquement nulle. Il se forme dans l'atmosphère à partir d'autres précurseurs chimiques et son processus de formation peut être résumé comme suit :

Le NO émis dans l'atmosphère réagit rapidement avec l'O_3 pour former le NO_2, comme présenté dans la réaction R3 (paragraphe 1.3.3). Le NO_2 formé absorbe efficacement l'énergie du rayonnement solaire pour se dissocier en atomes d'oxygène et en NO, soit la réaction R4 :

$$NO_2 + hv \rightarrow NO + O \qquad (R4)$$

Ces atomes d'oxygène réagissent rapidement à leur tour avec le dioxygène (O_2) pour reformer de l'ozone, soit la réaction R5 :

$$O_2 + O + M \rightarrow O_3 + M \quad (M = O_2 \text{ ou bien } N_2) \qquad (R5)$$

M représente une troisième molécule qui absorbe l'énergie excédentaire libérée au cours de cette réaction, stabilisant ainsi la molécule d'ozone nouvellement formée. Ces réactions (R3, R4 et R5) décrivent un état d'équilibre photochimique qui s'établirait dans l'atmosphère.

Dans une atmosphère polluée, les COV participent à la formation de l'ozone. En effet, les rayonnements solaires transforment les COV en radicaux peroxydes qui réagissent avec le NO pour former le NO_2. Ensuite, ce NO_2 formé participe à la réaction R4 qui, suivie par la réaction R5, donne naissance à une nouvelle molécule d'ozone. L'O_3 est un gaz agressif provoquant une diminution de la fonction pulmonaire et un déclenchement des crises d'asthme (OMS, 2011). La concentration limite recommandée par l'OMS est de 100 µg/m^3 moyenne sur 8 heures (WHO, 2005).

1.3.6. Les composés organiques volatils (COV)

Les COV regroupent une multitude de substances appartenant à différentes familles chimiques (hydrocarbures aromatiques, cétones, alcools, alcanes, aldéhydes, etc.) (ORS, 2007). Il est fréquent de distinguer le méthane (CH_4) qui est un COV particulier, car naturellement présent dans l'air. On parle alors de COV méthaniques (COVM) et de COV non méthaniques (COVNM). De manière simplifiée, les COVNM sont des gaz émis par la combustion de carburants (transport, industrie, élimination des déchets, etc.) ou par évaporation de solvants contenus dans certains matériaux et produits lors de leur fabrication, leur stockage et leur utilisation (peintures, cartouches des imprimantes, caoutchouc, colles, etc.) (Bernstein *et al.*, 2008 ; Vardoulakis *et al.*, 2011). De plus, les COV peuvent avoir des sources naturelles comme notamment les forêts et les prairies ; on parle alors de COV biogéniques. Les COV peuvent être classés selon leur température d'ébullition qui est liée au caractère volatil de la substance : les COV très volatils, volatils ou semi-volatils (Popescu *et al.*, 1998). Les BTEX (Benzène, Toluène, Ethylbenzène et Xylènes) sont des COV considérés comme étant de bons indicateurs de la pollution urbaine, précisément induite par le trafic routier (ORS, 2007). Les effets sanitaires des COV sont divers et variables selon la nature du polluant envisagé. Ils vont d'une gêne olfactive légère jusqu'à des effets mutagènes et cancérogènes (benzène, formaldéhyde) (Carazo Fernández *et al.*, 2013 ; Duong *et al.*, 2011 ; Sax *et al.*, 2006 ; Venn *et al.*, 2003).

1.3.7. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)

Les HAP sont des composés organiques hydrocarbonés constitués de deux ou plusieurs cycles benzéniques. Ces noyaux aromatiques sont accolés soit de façon linéaire, soit angulaire ou en grappe. La formation des HAP peut résulter de processus naturels, mais l'activité anthropique

est généralement considérée comme la source majeure d'introduction d'HAP dans l'environnement. En ce qui concerne les sources naturelles, des HAP peuvent être générés par des feux de forêt ou de prairie ou lors des éruptions volcaniques. De plus, des fuites de réservoirs naturels de pétrole peuvent introduire des HAP pétroliers dans la mer. En ce qui concerne la pollution liée à l'activité anthropique, les HAP sont principalement générés par combustion incomplète de la matière organique à haute température tels que la combustion de carburant diesel ou essence (transports, industries), l'incinération des déchets et la combustion de bois et de charbon (domestique : cuisine et chauffage) (Marr *et al.,* 2006 ; Ravindra *et al.,* 2008 ; Ravindra *et al.,* 2006a).

Les HAP peuvent se trouver dans l'air ambiant sous forme gazeuse ou particulaire. Il en découle trois catégories d'HAP : les HAP volatils (constitués de deux cycles aromatiques) qui se retrouvent dans la phase gazeuse, les HAP semi-volatils (constitués de 3 et 4 cycles aromatiques) qui sont répartis entre les phases gazeuse et particulaire et les HAP lourds (constitués de 5 cycles ou plus) qui sont majoritairement adsorbés à la surface des particules.

Certains HAP sont classés cancérogènes de la classe 1 (cancérogène pour l'homme), de la classe 2A (cancérogène probable) et de la classe 2B (cancérogène possible) par le Centre International de la Recherche sur le Cancer (CIRC) (IARC, 2010 ; IARC 2012) et possédent des pouvoirs génotoxiques et mutagènes.

1.3.8. Les polychloro dibenzo-*p*-dioxines et -furanes

Les PolyChloro Dibenzo-*p*-Dioxines (PCDD) et PolyChloro DibenzoFuranes (PCDF) sont des composés aromatiques tricycliques comportant 1 à 8 atomes de chlore. Ils sont plus généralement appelés dioxines, bien que cette appellation désigne une famille bien plus large de molécules. Ils sont constitués de deux noyaux de benzène entourant un 3ème noyau qui comporte 2 atomes d'oxygènes en position « para » pour les PCDD contre un seul atome d'oxygène pour les PCDF.

En effet, les émissions de PCDD et PCDF résultent principalement des activités industrielles, notamment de procédés faisant intervenir la combustion de la matière organique en présence de chlore à hautes températures : l'incinération de déchets (ménagers, industriels ou médicaux), la production de chaleur, les procédés métallurgiques, notamment ceux concernant les métaux ferreux et non ferreux et la réactivation du charbon actif. A une échelle beaucoup

plus petite, les combustions naturelles (feux de forêts, activité volcanique) constituent aussi des sources d'émission (INRS, 2006).

La principale source d'exposition humaine aux PCDD et PCDF est l'alimentation (90 %). Dans l'atmosphère, ils se retrouvent essentiellement associés aux particules plutôt que sous forme gazeuse à cause de leur faible pression de vapeur. Les congénères faiblement chlorés (congénères tétra et penta chlorés) se retrouvent à l'état gazeux en plus forte proportion que les congénères fortement chlorés (congénères hexa à octa chlorés), qui se retrouvent associés aux particules (INERIS, 2005).

Seuls 17 congénères sont considérés comme ayant une toxicité importante, et la 2,3,7,8-TCDD (dioxine de Seveso) est la plus toxique et est la seule reconnue cancérigène pour l'Homme, d'après le CIRC. Ces composés sont lipophiles et la majorité est très résistante au métabolisme chez l'Homme et ils peuvent être bioaccumulés (Bodin *et al.*, 2007b). Ce sont des molécules très stables et elles sont d'autant plus stables que le nombre d'atomes de chlore est important. Cette stabilité explique leur degré de persistance dans l'environnement (INERIS, 2005).

1.3.9. Les polychlorobiphényles

Les PolyChloroBiphényles (PCB) sont des composés chimiques synthétiques extrêmement persistants, également connus en France sous le nom de pyralènes. La famille des PCB regroupe 209 molécules également appelées congénères. Ce sont des composés constitués de deux cycles benzéniques reliés entre eux, et possédant plusieurs atomes de chlore.

Les PCB n'existent pas à l'état naturel et ont été fabriqués par l'Homme pour la première fois en 1929 et ont été largement utilisés pendant des décennies comme isolants dans les transformateurs électriques et les condensateurs, comme lubrifiants dans les turbines et les pompes ou comme composants d'huiles, de soudures, d'adhésifs, de peintures et de papiers autocopiants. Leur présence dans l'environnement est principalement due à des contaminations «accidentelles» (déversements de quantités importantes par suite de fuites, d'explosions, d'incendies ou de rejets fortuits) et à des procédures inadéquates d'élimination qui ont eu cours dans le passé (décharges non contrôlées ou inappropriées, épandage des boues d'épuration). La production et la commercialisation des PCB sont interdites en France depuis 1987 (CIRE-Rhône-Alpes, 2010).

Les dosages des PCB dans l'environnement, les aliments ou chez l'Homme concernent généralement les 12 PCB « dioxin-like » ou PCB-DL (appelés comme cela puisqu'ils ont le même mécanisme de toxicité que les PCDD et PCDF), et les 7 PCB « indicateurs » ou PCBi les plus présents dans l'environnement et les aliments. Ces derniers représentent environ 50 % de l'ensemble des congénères et sont dosés pour estimer la contamination par les PCB totaux (CIRE-Rhône-Alpes, 2010). La principale voie d'exposition professionnelle est l'inhalation (Wolff, 1985). En outre, pour la population générale, la voie principale d'exposition est la nourriture contaminée (ATSDR, 2000).

1.3.10. Les métaux lourds

Ce sont des métaux de densité élevée comme le plomb (Pb), le Mercure (Hg), l'Arsenic (As), le Cadmium (Cd) et le Nickel (Ni). Cette appellation est de moins en moins utilisée, et celle d'éléments trace métalliques (ETM) est de plus en plus retenue et englobe un grand nombre d'éléments présents en très faible teneur dans l'environnement. Dans l'air, les métaux lourds se retrouvent majoritairement sous forme particulaire à l'exception du mercure qui est principalement gazeux. Ils proviennent de la combustion des combustibles fossiles et du bois, des cimenteries, de l'agriculture, de certains procédés industriels et de l'incinération des déchets. Ils peuvent s'accumuler dans l'organisme et avoir des effets variables selon les métaux : atteintes du système nerveux, des fonctions rénales ou hépatiques, etc. (Poey et Philibert, 2000).

1.3.11. La matière particulaire

La matière particulaire est détaillée dans le paragraphe suivant.

2. Les particules atmosphériques

2.1. Définition

Les particules microscopiques sont omniprésentes dans notre environnement. Elles sont produites aussi bien par les processus naturels que par l'Homme et sont appelées aérosols. La définition scientifique du terme « aérosol » fait référence à des particules liquides ou solides en suspension dans un gaz porteur ou un mélange de gaz (Seinfeld et Pandis, 2006 ; Vincent, 1989).

Cependant, les termes « particules » et « aérosols » sont sensiblement différents. La notion d'aérosol inclut à la fois les particules et le gaz dans lequel elles se trouvent en suspension (Fontan, 2003). Dans la littérature, on emploie bien souvent ces deux termes indistinctement. Cependant, le terme « aérosol » faisant référence aux particules atmosphériques et à leur environnement gazeux, est plutôt utilisé par la communauté des chercheurs qui s'intéressent au climat et aux phénomènes dynamiques dans l'atmosphère. Les chercheurs qui étudient les niveaux de pollution et leur impact sur la santé, emploient plus souvent le terme « particules ». Cela s'explique essentiellement du fait que l'air associé aux particules, formant l'aérosol, est expiré par et n'est donc que le vecteur de transport des particules au sein de l'appareil respiratoire (Villenave *et al.,* 2012).

2.2. Classifications

Les particules atmosphériques, dont la taille peut varier de quelques nanomètres à quelques micromètres, peuvent être classées en différentes catégories, selon leurs processus de formation ou leurs tailles.

2.2.1. Selon le processus de formation

Les particules atmosphériques peuvent être classées en aérosols primaires ou secondaires (d'Almeida *et al.,* 1991). Les aérosols primaires sont émis directement dans l'atmosphère sous forme particulaire depuis les sources d'émission. La plupart du temps, ceux-ci sont d'origine naturelle telle que les sels marins, les débris volcaniques et également résultant de l'érosion des sols. Tandis que, les aérosols secondaires désignent les particules générées au sein même de l'atmosphère soit par le mode de conversion gaz-particules dû à la condensation des vapeurs d'origine naturelle ou anthropique, soit par l'évolution d'une particule primaire.

2.2.2. Selon la taille

Une autre classification fréquemment utilisée s'appuie sur la distribution granulométrique des particules et donc sur leur diamètre (Whitby, 1977). Ce paramètre est important pour caractériser le pouvoir de pénétration des particules dans l'appareil respiratoire.

On ne peut pas aisément attribuer un diamètre géométrique aux particules car elles ont des formes et des densités variées. C'est la raison du concept de la forme sphérique équivalente. Cependant, le diamètre aérodynamique équivalent (d_{ae}) des particules, le plus utilisé dans les études environnementales, correspond au diamètre d'une particule sphérique et de densité 1 g/cm^3, ayant la même vitesse de chute dans l'air que la particule concernée. C'est la taille des particules qui gouverne leur transport dans l'air, leur élimination de l'atmosphère ainsi que leur déposition dans les voies respiratoires.

Selon leur granulométrie, Whitby (1977) a réparti les particules en deux groupes (Figure I-2) :

- **les grosses particules** (d_{ae} > 2,5 µm) : ce sont des particules générées par des procédés mécaniques. Elles proviennent de façon naturelle de l'érosion des sols, du pétillement de la mer, des volcans ou sont introduites dans l'atmosphère de façon artificielle lors par exemple de la manipulation des matières premières (tas de minerais) sur les sites industriels.
- **les particules fines** (d_{ae} < 2,5 µm) : elles sont constituées de particules générées par l'activité industrielle et urbaine mais aussi de particules biogéniques. Cette classe de particules peut être divisée en un **mode d'accumulation** (0,1 < d_{ae} < 2,5 µm) et un **mode de nucléation** (d_{ae} < 0,1 µm), qualifiés respectivement de grandes particules et de noyaux d'Aitken (particules ultrafines). Les particules relatives au mode de nucléation proviennent des processus de condensation de vapeurs chaudes dans l'atmosphère. Ces particules représentent la part la plus importante en nombre d'aérosols, mais aussi une masse peu importante en raison de leur taille extrêmement faible. Quant aux particules du mode d'accumulation, elles proviennent des conversions gaz-particules ainsi que de la croissance des particules précédentes sous l'effet de la coagulation ou de la condensation de vapeurs sur les particules existantes. Ce terme de mode d'accumulation est dû au fait que les procédés d'élimination sont les moins efficaces dans cette catégorie de taille d'aérosols, conduisant à l'accumulation des particules. Ces dernières représentent une part substantielle de la masse des particules.

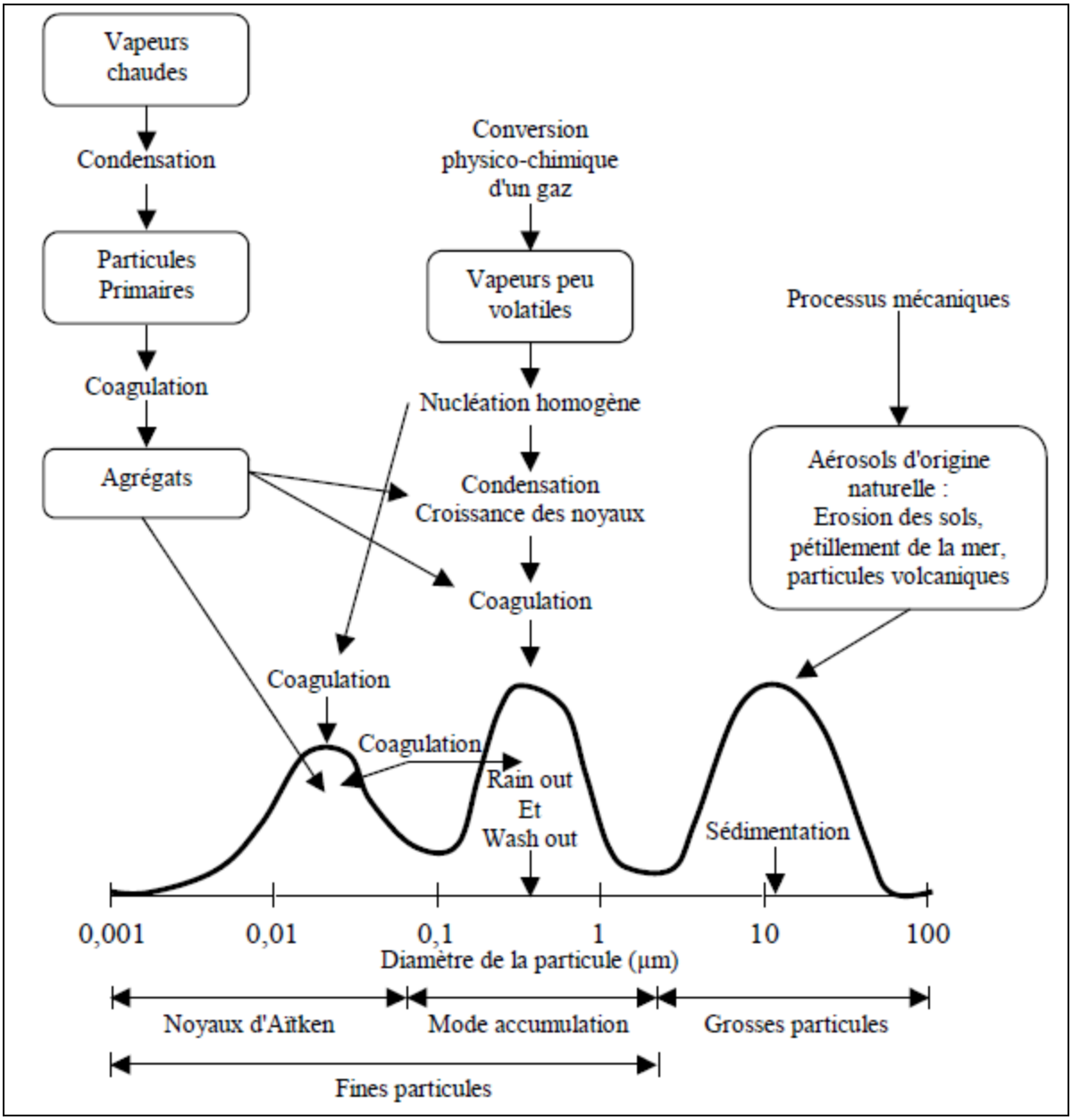


Figure I-2 : Représentation schématique des trois modes de répartition en taille des particules atmosphériques (D'après Whitby, 1977).

Le Tableau I-1 regroupe les dénominations des particules atmosphériques (selon leurs tailles) les plus fréquemment utilisées ainsi que leurs définitions correspondantes.

Tableau I-1 : Classification des particules atmosphériques selon leur taille : dénominations et définitions correspondantes.

Dénominations	Définitions
TSP	Total Suspended Particulate ou particules totales en suspension = particules ayant un diamètre aérodynamique inférieur à 100 µm
PM_{10}	Grosses particules = particules atmosphériques ayant un diamètre aérodynamique inférieur ou égal à 10 µm
$PM_{10-2,5}$	Particules atmosphériques ayant un diamètre aérodynamique inférieur ou égal à 10 µm et supérieur à 2,5 µm
$PM_{2,5}$	Particules fines = particules atmosphériques ayant un diamètre aérodynamique inférieur ou égal à 2,5 µm
$PM_{2,5-0,1}$	Particules atmosphériques ayant un diamètre aérodynamique inférieur ou égal à 2,5 µm et supérieur à 0,1 µm
$PM_{0,1}$	Particules ultrafines = particules atmosphériques ayant un diamètre aérodynamique inférieur ou égal à 0,1 µm

2.3. Cycle des particules atmosphériques

2.3.1. Sources

Les particules atmosphériques trouvent leur origine aussi bien dans les sources naturelles que dans les sources anthropiques. A grande échelle, les sources naturelles dominent largement la formation de particules, depuis les océans notamment qui couvrent 70% du globe. A l'échelle locale, étant donné la présence de nombreuses sources d'émissions, les sources anthropiques sont effectivement plus importantes que les sources naturelles ; c'est le cas notamment dans les zones urbaines et les sites fortement industrialisés. Les sources de production déterminent la composition chimique des aérosols, tandis que les mécanismes de production sont responsables de leur spectre granulométrique ainsi que leur forme (d'Almeida *et al.*, 1991). Le Tableau I-2 donne une vision quantitative sur l'origine des émissions.

Tableau I-2 : Estimation des émissions de particule (d'après Delmas *et al.*, 2007).

Origine de la source	Sources	Flux ($Mt.an^{-1}$)*	
		Estimation moyenne	**Estimation Min. et Max.**
Naturelles	**Primaires**		
	Poussières minérales	1500	1000-3000
	Sels de mer	1300	1000-10000
	Cendres volcaniques	33	4-10000
	Débris biogéniques	50	26-80
	Secondaires		
	Sulfates biogéniques	90	80-150
	Sulfates volcaniques	12	5-60
	aérosols organiques secondaires	55	40-200
	Nitrates	22	15-50
	Total	3060	2170-23540
Anthropiques	**Primaires**		
	Suies	20	5-20
	Poussières industrielles	100	40-130
	Secondaires		
	Feux de végétations	80	60-160
	Sulfates anthropiques	140	170-250
	Nitrates anthropiques	36	25-65
	Aérosols organiques	10	0,5-25
	Total	390	300-710

*($Mt=10^6$ tonnes)

2.3.1.a. Les particules naturelles primaires

L'origine de ce type d'aérosols peut être crustale due à l'érosion des sols, marine par le pétillement de la mer, volcanique et plus localement liée aux feux naturels.

Les poussières crustales : cette catégorie de poussières résulte de l'action du vent sur les sols dépourvus de végétation ainsi que de l'abrasion des roches. Ce phénomène se produit

généralement dans les déserts et les régions arides et il est très important dans la mesure où ces zones couvrent environ le tiers de la surface des continents (Usher *et al.*, 2003). Les particules peuvent être mises en suspension dans l'air si la vitesse du vent dépasse 3 m/s (Masclet et Cachier, 1998) et les particules de taille comprise entre 0,1 et 5 µm peuvent parcourir des distances supérieures à 5000 km (Dall'Osto *et al.*, 2010 ; d'Almeida *et al.*, 1991). La composition chimique des aérosols atmosphériques provenant de l'érosion des sols indique qu'ils sont dans l'ensemble, constitués d'éléments caractéristiques de la croûte terrestre, à savoir Al, Si, Fe, Ti, Ca, Na, Mg et K (Usher *et al.*, 2003).

Les sels marins : les particules de sels marins prennent naissance lors de l'éclatement des bulles d'air à la surface de l'eau : suite au mouvement des vagues, des bulles d'air se forment et atteignent la surface d'eau. L'éclatement de ces bulles aboutit à la formation de très petites gouttelettes en suspension dans l'air. Pendant leur transport dans l'atmosphère, ces gouttelettes s'évaporent et forment des solutions saturées en sels. Lorsque l'humidité relative est suffisamment basse, un changement de phase intervient et des particules solides sont obtenues (MacIntyre, 1974). Les éléments les plus caractéristiques dans l'eau de mer sont Cl, Na, les ions sulfates, Mg, Ca et K. A partir de ceux-ci, plusieurs composés sont formés par recristallisation lors de l'évaporation des gouttelettes dans l'atmosphère, avec NaCl comme composé principal, accompagné de KCl, $CaSO_4$, $(NH_4)_2SO_4$ et de nombreux autres sels comme les carbonates. Les propriétés hygroscopiques de ces composés déterminent la taille des particules (Jaenicke, 1993).

Les éruptions volcaniques : les éruptions volcaniques sont à l'origine de la formation de deux types de particules solides, les poussières et les cendres volantes, ainsi que d'émissions gazeuses constituées essentiellement de SO_2, CO_2, H_2O, H_2S, etc., qui peuvent jouer le rôle de gaz précurseurs lors de la conversion gaz-particules. Les particules sont prédominantes lors des éruptions des volcans en activité, et ces derniers même en absence d'éruptions, émettent des quantités importantes de SO_2 (Andreae, 1995). Les particules primaires émises dans la troposphère sont de taille plutôt importante et par conséquent, leur temps de résidence dans l'atmosphère est relativement court. Cependant, lors d'éruptions intenses, elles peuvent atteindre la couche supérieure de la troposphère et accéder à la stratosphère. Les temps de résidence deviennent alors beaucoup plus longs, ce qui leur permet d'être transportées sur de très longues distances, avant de réintégrer la troposphère par simple phénomène de sédimentation (Hidy, 1984).

La combustion de la biomasse : la combustion de la biomasse sur de grands espaces dans le monde se manifeste par les feux de forêts et de savanes. La différence entre les aérosols naturels et anthropiques produits dans ces conditions est difficile à établir dans la mesure où certains incendies proviennent de catastrophes naturelles alors que d'autres sont causés soit volontairement, soit involontairement par l'Homme. La composition de la fumée provenant des feux de forêts varie énormément et est constituée de particules primaires sous forme de cendres et de suies auxquelles s'ajoutent des gaz. Ces gaz ainsi obtenus peuvent conduire à la formation de particules secondaires par conversion gaz-particules. La quantité des particules produites et leur composition dépendent des caractéristiques des bois et végétaux brûlés.

Les particules biogéniques : les particules biogéniques, sont d'origine biologique variable tels que les pollens, les spores, les fragments d'animaux et de plantes, de l'ordre du micromètre, ainsi que les bactéries, les algues, les protozoaires, les moisissures et les virus de taille beaucoup plus petite. Les quantités les plus importantes de ces particules sont observées en plein air entre le printemps et l'automne.

2.3.1.b. Les particules naturelles secondaires

Les particulaires naturelles secondaires se forment, à partir des gaz émis naturellement et impliqués dans les conversions gaz-particules. Ces gaz sont composés essentiellement de soufre, d'azote et d'hydrocarbures (Pueschel, 1994).

Les émissions naturelles de soufre : Les origines de la production naturelle de gaz à base de soufre sont la flore marine, la faune et la flore terrestres, ainsi que les éruptions volcaniques et la combustion de la biomasse. Ces composés soufrés réagissent dans l'atmosphère pour former le dioxyde de soufre (SO_2), lequel après oxydation conduira à la formation de sulfates particulaires.

Les émissions naturelles d'azote : Les continents sont des sources efficaces d'oxyde de diazote (N_2O), qui se forme au cours de la lente décomposition de la végétation et des engrais. D'autre part, le NO_2 se forme au cours des phénomènes électriques dans l'atmosphère, particulièrement au moment des orages, et est produit également par l'oxydation de l'ammoniac naturel (NH_3) et de l'oxyde d'azote (NO) provenant des émissions de la croûte terrestre (Middleton, 1995). NH_3 considéré comme précurseur des aérosols à base d'ammonium, provient des sols et des océans ainsi que de la décomposition de matériaux organiques (d'Almeida *et al.*, 1991 ; Möller, 1995).

Les émissions naturelles de composés organiques : des aérosols organiques secondaires (AOS) d'origine naturelle peuvent se former suite à l'oxydation des composés organiques émis par les forêts et les prairies, les éruptions volcaniques, la combustion de la biomasse (feux des forets) ainsi que ceux trouvés dans les débris biologiques.

2.3.1.c. Les particules anthropiques primaires

Les émissions de particules anthropiques primaires résultent de la consommation de produits pétroliers (habitations, industries, commerces), des rejets industriels (métallurgies, fonderies, raffineries, exploitations minières, etc.), des sites d'incinération, des transports (automobiles, trains, navires, avions), des activités agricoles et de plusieurs autres sources telles que les incendies, les tas de minerais et d'ordures. Les transports routiers contribuent aux émissions de particules non seulement par l'intermédiaire des gaz d'échappement, mais également par l'usure des pneus et des freins, de même que par la remise en suspension des poussières recouvrant les routes.

Une catégorie importante d'aérosols anthropiques est le noir de carbone, qui est le composant majoritaire des suies. Les particules de noir de carbone sont constituées pratiquement de carbone élémentaire avec quelques liaisons oxygène et hydrogène présentant une structure hexagonale et en couches. Les deux plus importantes sources de cet élément sont, les combustions des produits d'origine fossile et de la biomasse. La grande majorité des émissions de suies dans les zones urbaines et industrielles provient des moteurs fonctionnant au diesel (Hamilton et Mansfield, 1991).

2.3.1.d. Les particules anthropiques secondaires

En plus de l'importante variété de particules primaires provenant des sources anthropiques vues précédemment, de nombreux composés gazeux sont également émis en grandes quantités dans l'atmosphère, donnant naissance aux particules secondaires par conversion gaz-particules.

Les émissions anthropiques de soufre : Les émissions anthropiques de composés à base de soufre sont totalement dues aux rejets de SO_2. Le soufre est émis notamment par la combustion

du charbon et de produits pétroliers (chauffage, transport, industrie), par les raffineries et par le traitement des minerais non ferreux (OMS, 2011).

Les émissions anthropiques d'azote : Les autres gaz importants et précurseurs de particules anthropiques sont les gaz à base d'azote tels que le NO et le NO_2, émis dans l'atmosphère par des processus de combustion (combustibles fossiles, biomasse) et le NH_3 émis par la combustion de la biomasse, l'élevage des animaux et l'agriculture, conduisant à la formation de nitrate et d'ammonium respectivement.

Les émissions anthropiques de composés organiques : les composés organiques provenant des sources anthropiques sont essentiellement émis par la combustion de carburants fossiles (transport, industrie), l'incinération des déchets et la combustion de bois et de charbon (domestique : cuisine et chauffage) (INERIS, 2005). Ces composés sont ensuite oxydés pour former les aérosols organiques secondaires (AOS) d'origine anthropique.

2.3.2. Evolution des particules dans l'atmosphère

Les particules n'ont pas une composition constante tout au long de leur vie dans l'atmosphère. Depuis leur émission, leur taille, leur abondance et leur composition chimique peuvent être modifiées par différents processus physico-chimiques.

2.3.2.a. Evolution physique

Parmi les processus de transformation auxquels sont soumises les particules, deux d'entre eux méritent particulièrement de retenir notre attention : la coagulation et la condensation.

La coagulation : Du fait du mouvement brownien, les particules migrent en permanence dans l'atmosphère et peuvent entrer en collision avec d'autres particules. Un certain nombre de ces collisions conduit à un agglomérat aboutissant à la formation de particules de taille plus grande. La vitesse de la coagulation dépend de la concentration des particules, leurs compositions, de la vitesse de leurs mouvements et de la surface spécifique de chaque particule.

Le phénomène de coagulation est le plus efficace dans le domaine des plus petites particules (noyaux d'Aitken) et semble être le facteur principal pour définir la limite inférieure de la taille des particules : les particules les plus petites subissent le phénomène de coagulation si rapidement, qu'elles sont éliminées pour donner naissance à des particules plus grandes.

La condensation : L'augmentation de la taille des particules par condensation est le mécanisme le plus important pouvant se produire entre les gaz et les particules dans l'atmosphère. Ce processus nécessite une phase vapeur sursaturée en présence de particules jouant le rôle de noyaux de condensation. Cependant les condensations de gaz qui s'en suivent sur ces particules nouvellement formées, conduisent à des phénomènes de transformation, à savoir des changements au niveau de leur composition et de leur taille.

2.3.2.b. Evolution chimique

Les processus d'évolution chimique des particules au cours de leur transport correspondent le plus souvent à des réactions chimiques homogènes ou hétérogènes de nucléation ou de condensation de gaz émis de façon naturelle ou anthropique. Ce phénomène est connu sous le nom de conversion gaz-particule. Les particules résultantes ont une faible taille à l'état initial, mais qui augmente rapidement par des processus de coagulation et de condensation.

La plupart des réactions de formation de ces particules implique les réactions d'oxydation, entraînant la conversion des gaz en produits condensés. Lorsque suffisamment de ces composés faiblement volatils sont formés, l'atmosphère en devient saturée et les particules commencent à se former. Trois composés majeurs sont impliqués dans le processus de la conversion gaz-particule : les composés à base d'azote (NO_2 et NH_3), ceux à base de soufre (SO_2) et les composés organiques ; les espèces formées sont des ions nitrates (NO_3^-), ammonium (NH_4^+), sulfates (SO_4^{2-}) ainsi que de la matière organique particulaire (d'Almeida *et al.*, 1991).

En règle générale, le nitrate atmosphérique provient de l'oxydation du dioxyde d'azote (NO_2) en acide nitrique (HNO_3), suivie d'une réaction avec l'ammoniac ou le chlorure de sodium (NaCl) pour former des particules de NH_4NO_3 et $NaNO_3$ respectivement (Dasgupta *et al.*, 2007 ; Harrison, 1996 ; Lin et Cheng, 2007). En effet, HNO_3 réagit avec les particules de NaCl en atmosphère marine et côtière, avec libération de HCl, de manière irréversible :

$$HNO_3 + NaCl \rightarrow NaNO_3 + HCl$$

D'autre part, dans une atmosphère contenant des particules riches en calcium, provenant des érosions des sols calcaires, ou durant le transport à longue distance de poussières des déserts riches en $CaCO_3$, le $Ca(NO_3)_2$ se forme suite à la réaction du $CaCO_3$ avec le HNO_3 (Hodzik *et al.*, 2006 ; Kouyoumdjian et Saliba, 2006 ; Koçak *et al.*, 2004), selon la réaction :

$$2HNO_3 + CaCO_3 \rightarrow Ca(NO_3)_2 + H_2CO_3$$

En présence de matériaux alcalins tels que les poussières continentales ou d'aérosols marins, HNO_3 s'adsorbe aisément sur les particules.

Quant au NH_3, il réagit de façon réversible avec HNO_3 et HCl pour former respectivement les sels d'ammonium NH_4NO_3 et NH_4Cl. Ces sels sont assez volatils et peuvent libérer leurs précurseurs gazeux lors de faibles pressions de NH_3 ou à température élevée. De plus NH_3 réagit avec l'acide sulfurique (H_2SO_4) pour former $(NH_4)_2SO_4$ (Anderson *et al.*, 2003 ; Renard *et al.*, 2004 ; Seinfeld et Pandis, 1998).

D'autre part, le sulfate obtenu à partir de l'oxydation de SO_2, est initialement sous forme de H_2SO_4. La présence d'ammoniac dans la troposphère conduit à des processus de neutralisation puis à la formation de NH_4HSO_4 et $(NH_4)_2SO_4$ (Renard *et al.*, 2004). L'excès d'ammoniac favorise la neutralisation complète en $(NH_4)_2SO_4$. De plus une réaction du H_2SO_4 avec le $CaCO_3$ a été montrée durant les transports à longues distances des poussières provenant des déserts aboutissant à la formation de $CaSO_4$ (Hwang et Ro, 2006) et avec les particules de NaCl en atmosphère marine et côtière, avec libération de HCl (ten Brink, 1998).

Concernant la formation des AOS, l'oxydation des COV d'origine naturelle ou anthropique peut produire des espèces ayant des pressions de vapeur suffisamment basses. Ceci assure la condensation de ces composés de la phase gazeuse vers la phase particulaire aboutissant ainsi à la formation des AOS (Kroll et Seinfeld, 2008). Cependant, les réactions de composés organiques moins volatils peuvent conduire aussi à la formation de particules. Alors les AOS peuvent également être formés à partir de réactions chimiques des composés organiques émis à l'origine dans la phase condensée (Robinson *et al.*, 2007).

2.3.3. Elimination des particules

Les particules atmosphériques sont éliminées par voie sèche ou humide. La vitesse d'élimination dépend principalement de leur taille (diamètre aérodynamique) et des conditions météorologiques.

2.3.3.a. Retombée par voie sèche

La retombée par voie sèche peut se définir comme étant le transport des particules vers des surfaces (sol, végétation, immeubles) en absence de précipitation (Seinfeld et pandis, 1998). Les principaux mécanismes entraînant la déposition des particules sont la sédimentation, l'impaction et la diffusion brownienne. Le dépôt des particules dépend des caractéristiques atmosphériques (vitesse de vent, humidité, température), de la surface (réactivité chimique et biologique, caractéristique du terrain) et des propriétés physiques des particules (taille, forme, densité) (Zufall et Davidson, 1998) :

- les particules ultrafines inférieures à 0,1 µm ont une durée de vie courte, car elles sont rapidement transformées en particules plus grosses. En effet, comme la taille des particules augmente suite à la coagulation ou la condensation, le phénomène de gravitation l'emporte sur le mouvement brownien, amenant les particules à se déposer.
- les particules ayant une taille comprise entre 0,1 et 2,5 µm, ont une durée de vie dans l'atmosphère de plusieurs jours jusqu'à ce qu'elles soient éliminées par déposition humide ; elles sont en effet faiblement affectées par le mouvement brownien et la sédimentation (Seinfeld et Pandis, 1998).
- les grosses particules (entre 2,5 et 20 µm) se déposent en général par impaction sur une surface (sol, immeubles, végétation, etc.). En effet, l'impaction intervient lorsqu'une particule transportée par le vent rencontre un objet et s'y dépose.
- les particules de taille supérieure à 20 µm vont sédimenter.

Sous atmosphère sèche, le phénomène de sédimentation détermine la limite supérieure de la granulométrie des aérosols.

2.3.3.b. Retombée par voie humide

Les dépôts humides correspondent aux dépôts par précipitation sous forme de pluie, brouillard ou neige (Seinfeld et Pandis, 1998). On distingue deux phénomènes appelés « washout » et « rainout ». Le washout peut être décrit comme l'interception des particules atmosphériques par des gouttelettes de pluie et le rainout correspond à la condensation de vapeur d'eau sur les particules entraînant la formation de gouttelettes d'eau qui sont éliminées lors des précipitations (élimination à l'intérieur de nuage).

2.4. Composition des particules atmosphériques

La composition des particules atmosphériques est très hétérogène et varie en fonction de leurs sources d'émission (marine, crustale, biogène, transport, industrie, etc.), de leurs évolutions physico-chimiques dans l'atmosphère ainsi que de leurs fractions granulométriques.

Les espèces majoritairement retrouvées au sein des particules sont les ions sulfate, nitrate et ammonium, les éléments de la croûte terrestre, les espèces carbonées organiques et inorganiques, ainsi que la fraction biogénique et également l'eau. A ces composés s'ajoutent des espèces à l'état de traces, tels que les métaux. Quant à la fraction biologique des particules atmosphériques, elle est constituée de bactéries, de champignons ainsi que de pollens.

Des données sur la composition chimique des PM_{10} et $PM_{2,5}$ ont été issues de plus de 60 sites Européens (Putaud *et al.*, 2010). Cette étude a montré que tous les composants (matière carbonée, carbone élémentaire, nitrate, sulfate, ammonium, matière organique, sel marin et poussière minérale) sont présents à la fois dans les fractions de particules fines et grossières à des proportions variables (Figure I-3).

En effet, la poussière minérale et le sel marin contribuent davantage à la fraction grossière (PM_{10}), alors que le NH_4^+, le nss-SO_4^{2-}, le carbone élémentaire, la matière carbonée et dans une moindre mesure la matière organique contribuent davantage à la fraction fine ($PM_{2,5}$). Ces résultats montrent aussi que les principaux constituants des $PM_{2,5}$ et des PM_{10} dans toute l'Europe sont généralement la matière organique, les ions sulfates et nitrates.

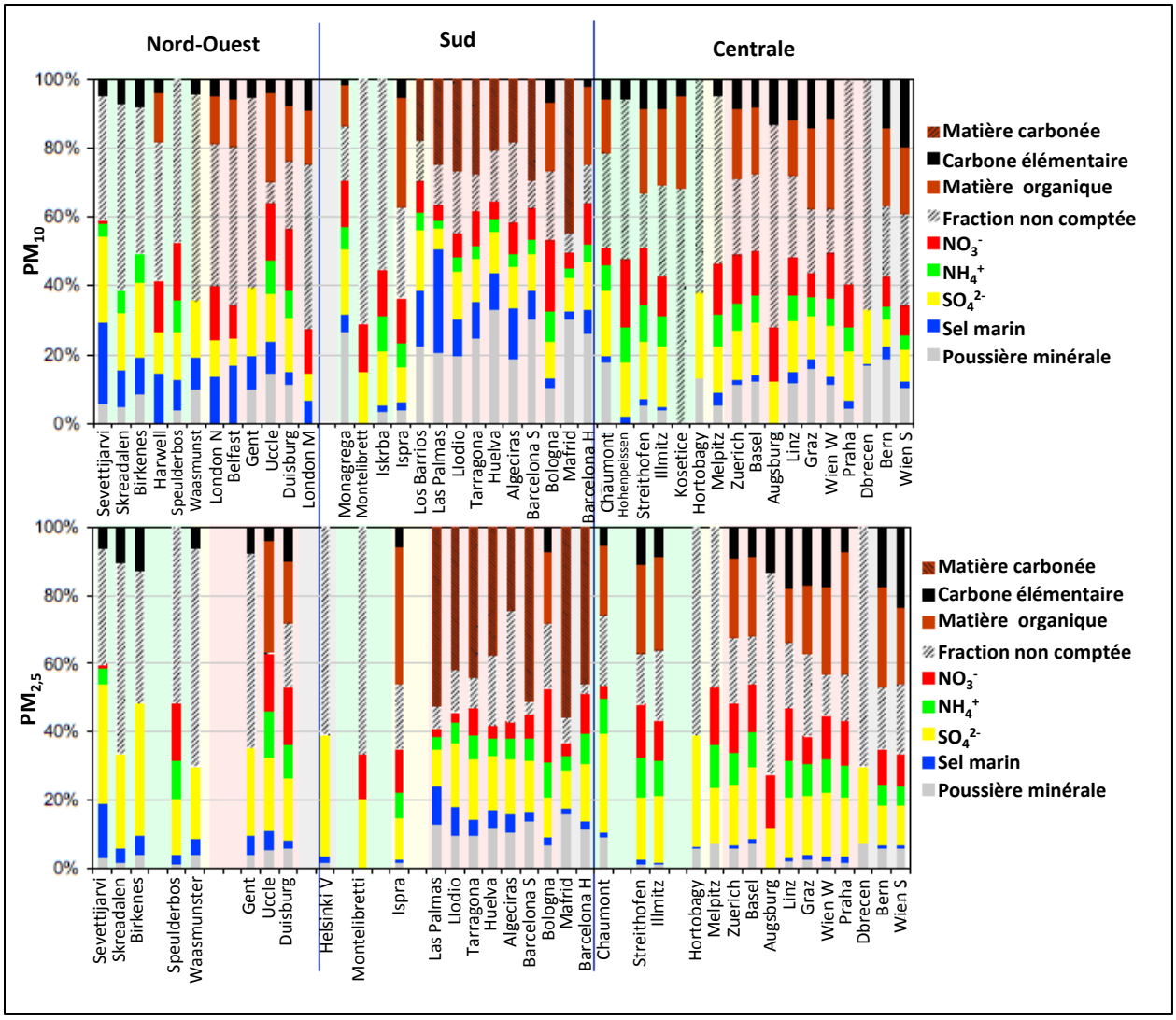


Figure I-3 : Composition chimique moyenne annuelle des PM_{10} et $PM_{2,5}$ dans différents sites Européens (d'après Putaud *et al.*, 2010).

2.5. Normes internationaux et nationaux des particules atmosphériques

Les valeurs limites de PM_{10} et de $PM_{2,5}$ fixées par l'OMS, l'Agence de protection de l'Environnement aux Etats-Unis (United States-Environmental Protection Agency ; US-EPA) et le Ministère de l'environnement libanais, ainsi que les valeurs limites des TSP (uniquement par la loi libanaise) sont regroupées dans le Tableau I-3.

Concernant le Liban, la Décision du Ministère de l'environnement 52/1 (29/07/1996) a établi les premiers standards de la qualité de l'air au Liban. Cette loi couvre non seulement l'air

ambiant, mais aussi l'air intérieur en plus des niveaux de bruit et la durée d'exposition. En 2003, une autre décision a vu le jour. Elle dresse les valeurs limites pour la protection de la santé et de l'environnement, et les marges de tolérance pour certains polluants dont les particules en suspension, le SO_2, le NO_2, l'O_3, etc. Ces valeurs « devaient » être appliquées à partir de 2004, et ont une échéance jusqu'à 2015.

Tableau I-3 : Valeurs recommandées par le Ministère de l'environnement libanais (1996 et 2003), l'OMS (2006) et l'US-EPA pour les particules atmosphériques.

		Normes (µg/m^3)			
Particules	**Durée d'exposition**	**Libanaises (1996)[a]**	**Libanaises (2003)[b]**	**OMS (2005)[c]**	**US-EPA (2006)[d]**
TSP	24 h	120	75	-	-
PM_{10}	24 h	80	50	50	150
	annuelle	10	40	20	50
$PM_{2,5}$	24h	-	-	25	35
	annuelle	-	-	10	15

- : Pas de valeur guide disponible ; [a] arrêté ministériel 1/52 du 12 septembre 1996 ; [b] Ministère de l'environnement libanais 2006 (d'après Chelala, 2008) ; [c] WHO, 2005 ; [d] US-EPA, 2006.

3. Contexte local : le Liban

La méditerranée orientale est considérée comme l'une des régions les plus controversées pour le transport des aérosols, en raison de sa localisation à l'intersection des masses d'air circulantes entre les trois continents (l'Europe, l'Asie et l'Afrique) (Lelieveld *et al.*, 2002). C'est une région semi-fermée entourée par la mer méditerranée et les déserts d'Arabie et du Sahara et située juste au Sud du continent européen densément peuplé et fortement industrialisé.

Situé sur la côte orientale de la méditerranée, le Liban est entouré par la Syrie des côtés Nord et Est, et par la Palestine occupée par les israéliens du côté Sud. Ce pays possède une surface d'environ 10 452 km^2 et un nombre de résidents qui était de l'ordre de 3 753 785 personnes en 2004. Beyrouth et le Mont-Liban, formant ensemble la plus grande division administrative, abritent environ 50% de la population. Ceci explique la rapidité de la dégradation de l'environnement dans ces régions du pays (ACS, 2006).

3.1. Topographie

Le Liban est un pays essentiellement montagneux (Figure I-4).

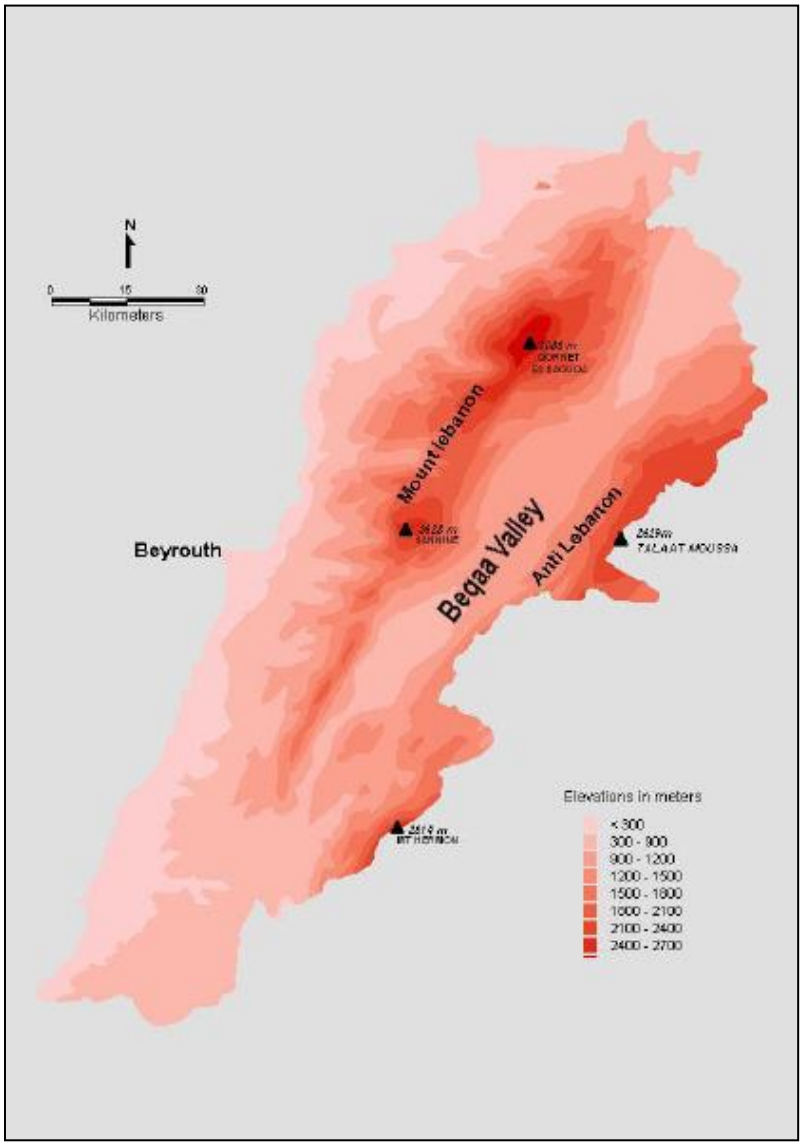


Figure I-4 : Topographie du Liban en mettant l'accent sur les différentes altitudes dans le pays (D'après le Département de Géographie-USJ).

Topographiquement, il se compose des parties suivantes alignées de l'Ouest vers l'Est (Walley *et al.*, 2001) :

- La zone côtière étroite composée de 2 grandes plaines, l'une au Nord et une dans le Sud. Au centre, s'étend une succession de petites plaines étroites séparées par des promontoires rocheux.

- La chaîne du Mont-Liban ayant une altitude moyenne d'environ 2200 m avec un pic à 3088 m (Qornet el Saouda) et divisée en deux parties : une partie nord ayant une hauteur supérieure à celle de la partie sud. Par conséquent, l'altitude diminue à mesure que nous nous dirigeons vers le sud.
- La vallée de la Bekaa, une plaine située entre les chaînes du Mont Liban et de l'Anti Liban.
- La chaîne Anti Liban subdivisée en deux massifs : dans la partie nord, le plus haut sommet est Talaat Moussa (2629 m) et dans la partie sud, Jabal el Cheikh ou le mont Hermon culmine à 2814 m.

3.2. Le climat

Le Liban se caractérise par un climat méditerranéen *i.e.*, des hivers doux et pluvieux et des étés chauds et humides surtout sur la côte. Cependant, la topographie du Liban a un impact sur la variabilité climatique du pays.

3.2.1. Précipitation

Au Liban, les précipitations sont en grande partie causées par les vents pluvieux venant de l'Ouest ou du Sud-Ouest apportant de grandes masses d'air humide. Par conséquent, la quantité de pluie varie en fonction de la topographie et des régimes de vent.

Les plus fortes pluies ont lieu au centre de la région montagneuse. La quantité totale de pluie mesurée atteint environ 1200 mm/an (Figure I-5a). En raison des précipitations orographiques, le plus haut sommet du Liban reçoit plus de 1500 mm de pluie/an. En raison de l'altitude, nous pouvons observer aussi des chutes de neige sur les montagnes pendant la saison d'hiver.

Les zones littorales sont la deuxième zone la plus exposée aux précipitations et peuvent atteindre environ 1000 mm dans la région du littoral central. Les littoraux nord et sud reçoivent environ 900 et 700 mm/an, respectivement. La chaîne du Mont-Liban influe sur la variabilité pluviométrique de la région intérieure. En raison de la présence de la barrière de haute montagne au Nord, la partie nord de la vallée de la Bekaa reçoit environ 200 mm. Le taux de précipitation augmente en se dirigeant vers le sud de la plaine (AQ-Monitoring-Report, 2012).

3.2.2. Température

Globalement, la répartition spatiale de la température moyenne annuelle dépend de la présence des montagnes. Des températures supérieures à 20 °C sont mesurées le long de la plaine côtière (Figure I-5b). Comme l'altitude augmente, une diminution de la température est observée. Une moyenne annuelle de 5-10 ºC est notée à des altitudes supérieures à 1800 m (UNDP/GEF/MOPWT/DGU, 2005).

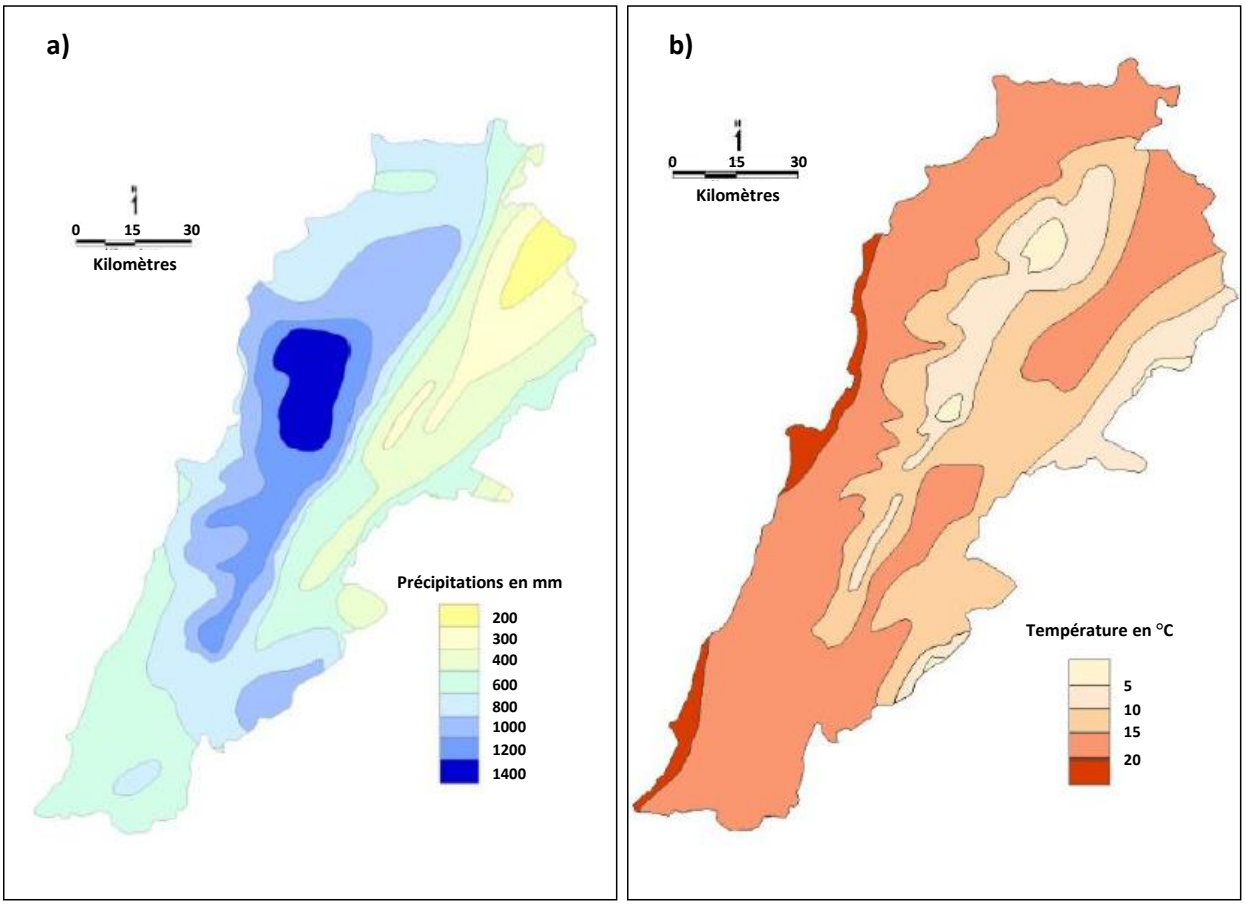


Figure I-5 : Précipitations annuelles moyennes (a) et répartition de la température moyenne annuelle au Liban (b) (D'après le Département de Géographie-USJ).

3.2.3. Vent

La vitesse et la direction du vent dépendent généralement de la situation barométrique générale. En raison de sa localisation géographique, le Liban connaît deux types de vent : le vent synoptique et le vent local.

- vent synoptique : en hiver, le Liban reçoit des masses d'air continentales (Europe et Asie). Cet air est généralement sec et froid et produit parfois de la neige lorsqu'il est mélangé à l'air marin humide. En été, les masses d'air proviennent seulement du littoral. Elles sont plus chaudes et humides en raison de leur passage au-dessus de la mer (UNDP/GEF/MOPWT/DGU, 2005).
- vent local : en se basant sur la station météorologique de l'aéroport international Rafic Hariri de Beyrouth (d'après Chelala, 2008), le vent dominant observé en 2005 a été marqué par la direction sud-ouest comme le montre la Figure I-6. La vitesse moyenne du vent enregistrée était d'environ 2,9 m/s. Le vent saisonnier montre un vent dominant sud-ouest en été et un vent nord-ouest et sud-ouest en hiver.

En raison de la topographie du pays, le Liban connait des brises locales comme, les brises de mer, les brises de terre et le vent de vallée. La vitesse de ces vents est inférieure à 3 m/s.

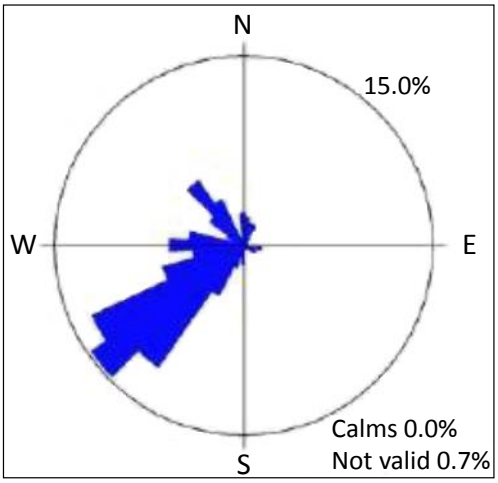


Figure I-6 : Moyenne annuelle de la direction du vent enregistrée à l'aéroport international Rafic Hariri en 2005 (d'après Chelala, 2008).

3.3. Facteurs influençant la qualité de l'air au Liban

Le Liban est exposé à différents types de polluants naturels et anthropiques générés à partir de plusieurs sources régionales et locales. Les principaux facteurs influençant la qualité de l'air au Liban sont les suivants :

- **Les tempêtes de poussières** qui balaient le Liban chaque année et qui proviennent des déserts de Sahara d'Afrique (sud-sud-ouest) et de la Péninsule arabe (sud-est) au printemps et en automne respectivement, et s'étendent sur de vastes surfaces. Ces masses d'air chaudes présentent des niveaux élevés de PM_{10} et de $PM_{2,5}$ riches en éléments de la croûte terrestre (Kubilay *et al.*, 2000).
- **L'apport à longue distance** de polluants provenant de l'Europe centrale ou de l'Est qui constitue une source principale de SO_2 (Saliba *et al.*, 2007a).
- **Les aérosols marins** provenant de la mer Méditerranée qui enrichissent les particules atmosphériques en sels marins surtout dans les zones côtières (Saliba *et al.*, 2007a).
- **Le rayonnement solaire** intense surtout durant l'été accompagné de vent de faible vitesse et de faibles niveaux de précipitation ce qui favorise respectivement les réactions photochimiques et ainsi la formation de polluants secondaires à des niveaux élevés, et l'augmentation de leurs durées de vie dans l'atmosphère en absence des dépositions humides et de la dispersion des polluants (Kouyoumdjian et Saliba, 2006 ; Saliba *et al.*, 2007a).
- **Le secteur d'énergie** : les centrales thermiques (de Zouk, Jiyeh, Hrayche, Sour, Baalbeck, Beddawi et Zahrani) contribuent très largement à la pollution atmosphérique au Liban en émettant des panaches de fumée noire de HC, CO, CO_2, SO_2, NO_x, suie, PM et d'autres polluants (MoE/EU/NEAP, 2005u). Ces centrales sont les plus grandes productrices de CO_2, représentant 39% des émissions nationales de CO_2 en 2005 (MoE-ECODIT, 2010). Cinq d'entre elles sont situées dans la zone côtière.
- **Le secteur des transports** : le système de transport Libanais comprend le transport maritime (les principaux ports de Beyrouth, Tripoli, Saïda et Sour), le transport routier et le transport aérien (l'aéroport international de Beyrouth). Au Liban, les activités liées au transport routier participent à plus de 90% des émissions dans les zones urbaines et sont

le principal contributeur à la mauvaise qualité de l'air urbain (El-Fadel et Bou Zeid, 1999 ; MoE/UNEP/GEF, 2012).

En effet, en absence d'un système efficace de transport en commun couvrant l'ensemble du territoire, le système de transport routier actuel repose principalement sur les voitures privées représentant environ 80% des véhicules du parc automobile libanais en 2007. Le taux de possession de voiture est estimé à une voiture pour 3 personnes avec une tendance à augmenter avec un taux annuel de 1,5%. Le parc automobile est relativement vieux avec une moyenne d'âge supérieure à 13 ans. 63% de ce parc est âgé plus de 20 ans et 90% plus de 10 ans (MoE/UNEP/GEF, 2012).

D'autre part, le transport en commun est limité aux bus privés et publics, aux minibus, taxis et taxis-services privés fonctionnant sans aucune coordination et qui ne disposent pas de voies propres à eux et rivalisent avec les véhicules privés sur des routes très congestionnées (MoE-ECODIT, 2010).

Les émissions de plomb dans le pays ont diminué progressivement depuis l'introduction de l'essence sans plomb en 1993 et l'interdiction de l'essence au plomb en 2001 (Loi 341/2001) (Hashisho et El-Fadel, 2001b). Pourtant, l'interdiction en 2001 du carburant diesel dans les véhicules (à ne pas confondre avec le diesel en Europe doté de propriétés physiques et chimiques conformes à la norme européenne EN 590) et les normes d'émissions de 1995 concernant les camions, les bus et les automobiles (Décret 6603/1995) n'ont pas entrainé une réduction importante des émissions, puisque les camions et les bus roulent toujours au carburant diesel sans aucun contrôle, produisant ainsi beaucoup plus de polluants (PM, suie, NO_x et CO) que l'essence (MoE-ECODIT, 2010).

Les émissions des véhicules sont ainsi influencées par l'âge, l'entretien, la vitesse, le trafic et les conditions des routes qui réduisent le rendement de la combustion, aboutissant ainsi à une plus grande émission de polluants tels que les PM, HC, CO, CO_2, SO_2 et NO_x (MoE-ECODIT, 2010).

- **Le secteur industriel** : les industries au Liban sont réparties sur tout le territoire et la plupart d'entre elles sont à production restreinte. Ce secteur n'est pas trop développé dans le pays. Ces industries peuvent avoir des impacts négatifs potentiels sur l'environnement

mais elles peuvent également jouer un rôle important dans le développement économique national (MoE-ECODIT, 2010).

Les émissions de l'industrie libanaise furent en 1994 de 1 924 063 tonnes de CO_2, 0,3 tonne de CO, 0,1 tonne de NO_x et 273 888 tonnes de SO_2. Les cimenteries sont les premières sources émettant le CO_2 et le SO_2 parmi tous les procédés industriels libanais (ACS, 2006). D'après l'Administration Centrale de la Statistique (ACS), les cimenteries produisent 77,2% des émissions totales suivie par les industries métallurgiques, qui produisent 21,7% du total des émissions de SO_2. Les industries de verre et de boissons génèrent une grande partie de COVNM, tandis que les industries agroalimentaires (viandes, volailles, margarine, biscuits, pâtisseries, pain et torréfactions) produisent la partie restante.

- **Les groupes électrogènes** : le Liban connaît une source de pollution qui est due à la présence des groupes électrogènes ou générateurs électriques fonctionnant au diesel à forte teneur en soufre. En effet, à cause des fréquentes coupures de courant électrique durant la journée les citoyens ont dû s'autoalimenter en énergie électrique en installant des générateurs individuels ou collectifs (au niveau des quartiers) pour subvenir à leur besoin en électricité (Chelala, 2008).
- **Les incendies des forêts** qui sont causés par la sècheresse naturelle, l'accumulation de bois mort et fortement inflammable ou par un acte criminel, causent des dommages importants à la vie sauvage et à la couverture forestière. Ces incendies produisent des panaches de fumée chargée de particules fines riches en carbone (COV, HAP, PCDD, PCDF, etc.) et en potassium qui se répandent sur de vastes étendues. Au Liban, les origines des feux de forêts demeurent indéterminées. Entre 2008 et 2009, 707 incendies ont été signalés dans le pays, ravageant 45 km^2 de forêts, ce qui équivaut à 1,8 % de la couverture forestière (MoE-ECODIT, 2010).
- **Autres facteurs** : l'agriculture, la construction, l'exploitation des carrières, les décharges sauvages et/ou la combustion à ciel ouvert de déchets solides, le brulage des pneus, les accidents d'explosion dans des entrepôts faiblement règlementés, les feux d'artifice et les guerres constituent des sources supplémentaires de pollution atmosphérique au Liban (MoE-ECODIT, 2010).

3.3.1. Cas de Beyrouth

3.3.1.a. Localisation

Beyrouth, capitale du Liban, est une semi-île située à (33°52'10"N; 35°30'40"E), sur la côte orientale de la mer Méditerranée. Les côtés nord et ouest de la ville sont ouverts sur la mer tandis que le côté « est » est entouré par le Mont Liban. L'agglomération de Beyrouth, de 32 km^2 de surface comporte 600 000 habitants. Le port de Beyrouth est situé au nord de la ville. Une gare routière internationale avec des bus fonctionnant au diesel ainsi qu'un incinérateur de déchets se trouvent à côté du port. Quant à l'aéroport, il est situé au sud de Beyrouth.

3.3.1.b. Urbanisation

L'importance de cette ville vient du fait que c'est une province libanaise et que c'est le centre administratif et tertiaire du pays. La capitale qui s'est construite par étapes, ne cesse de s'accroître. L'expansion de la ville s'est faite rapidement grâce à l'émigration et à l'exode rural et elle est toujours, actuellement, en extension continuelle. On parle désormais du Grand Beyrouth ou de la Région Métropolitaine de Beyrouth (RMB) comportant environ 1,8 million d'habitants (Figure I-7). Celle-ci est une appellation qui correspond à l'étalement urbain de la ville qui s'étend du fleuve « Nahr el Damour » au sud jusqu'au fleuve « Nahr el Kalb » au nord, et vers le côté est du pays jusqu'à une altitude de 400 m (Chelala, 2008).

Un des impacts directs de la centralisation et de l'extension de cette urbanisation est l'augmentation des déplacements urbains. Par conséquent, de graves problèmes environnementaux peuvent apparaître, telle que la pollution de l'air.

Dans les limites administratives de la ville, l'industrie reste artisanale ou de petite taille, regroupant 14 % de l'industrie nationale. Par contre, les régions périphériques de Beyrouth sont les zones les plus développées industriellement, et concentrent plus de 50 % de l'industrie libanaise (Chelala, 2008).

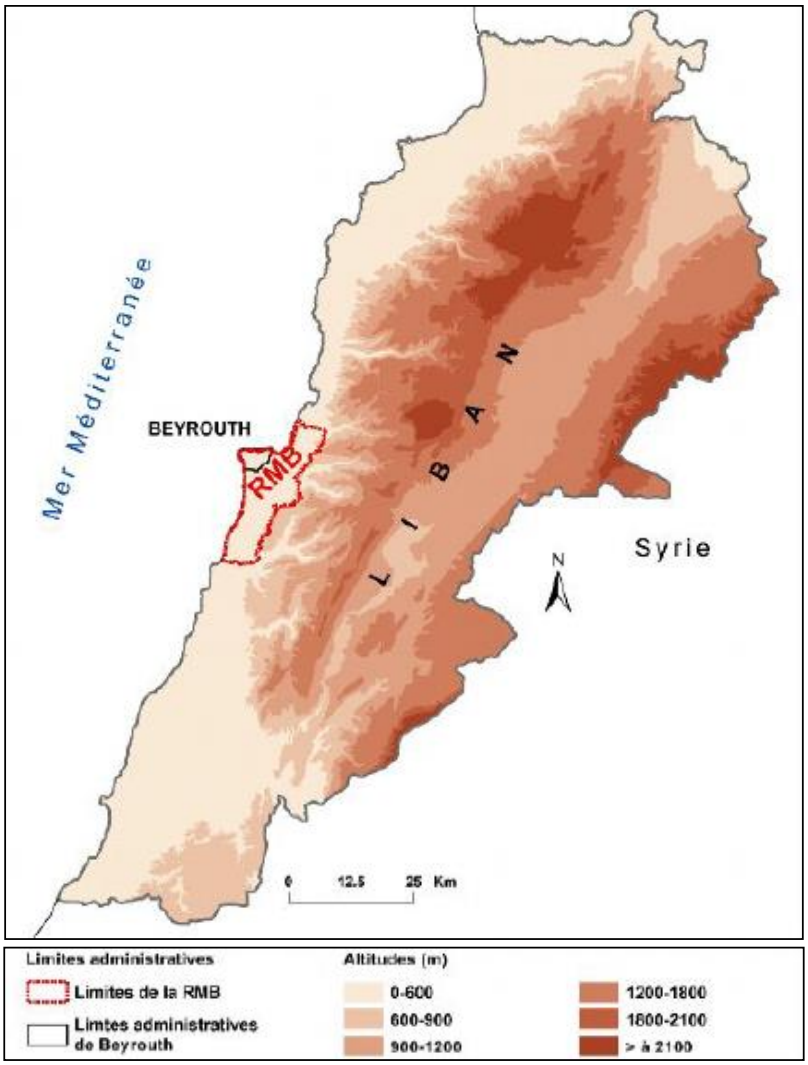


Figure I-7 : Limites administratives de Beyrouth et de la Région Métropolitaine de Beyrouth (RMB) (Chelala, 2008).

3.3.1.c. Sources de pollution

Plusieurs facteurs influent sur la qualité de l'air dans l'agglomération de Beyrouth, dont la majorité sont communs avec tout le Liban et sont déjà cité dans le paragraphe3.3, tels que les tempêtes de sable en automne et au printemps, l'apport à longue distance de polluants de l'Europe industrialisée, les aérosols marins à cause de sa proximité de la mer et les émissions à partir des groupes électrogènes mis en route durant les périodes de coupure du courant. Etant donné que le secteur industriel dans l'agglomération de Beyrouth est modeste, et en absence des activités agricoles, la centralisation et l'urbanisation et par conséquent le trafic routier constitue la principale source de pollution atmosphérique dans cette agglomération (Afif *et al.*, 2008). Le

système de transport influe directement par les émissions des échappements et indirectement par l'usure des pneus, des freins et des pièces automobiles ainsi que par la remise en suspension des poussières sur les routes suite au mouvement des véhicules.

Le réseau routier y est la seule infrastructure de déplacement dans la capitale libanaise ; le réseau de transport en commun est peu développé et fonctionne au diesel riche en soufre ce qui aggrave l'émission de polluants atmosphériques. Le parc automobile est en majorité constitué de voitures privées : une enquête a été réalisée à Beyrouth (Chelala, 2008) et a montré qu'en moyenne, 59 % des véhicules circulant sur les routes de la capitale sont des voitures particulières (Figure I-8).

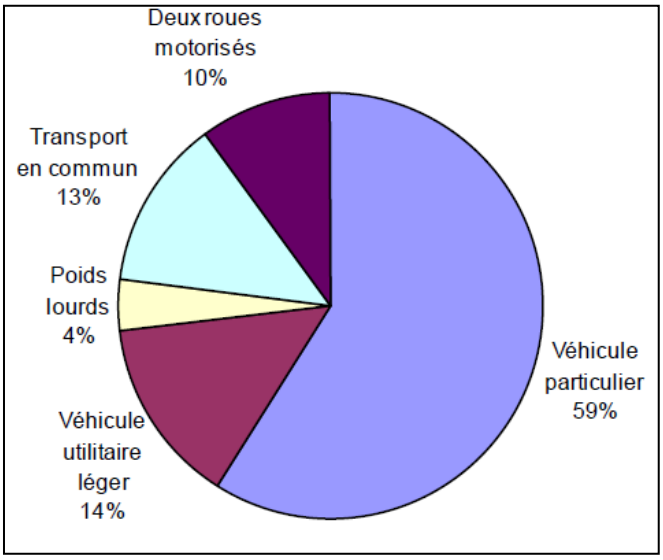


Figure I-8 : Composition moyenne des flux routiers à Beyrouth en 2005 (Chelala, 2008).

Tous ces facteurs entrainent une émission de divers polluants et une dégradation de la qualité de l'air et influent sur la composition des particules atmosphériques dans l'agglomération de Beyrouth. Malgré que le vent dominant soit le sud-ouest, le Mont Liban constitue un obstacle vis-à-vis de la dispersion des polluants qui restent au-dessus de Beyrouth pendant un temps important surtout en absence de précipitation, affectant ainsi la qualité de l'air ambiant dans cette agglomération.

3.4. Qualité de l'air au Liban

A partir des années 90, les études sur la qualité de l'air ont débuté au Liban et la plupart des recherches ont été concentrées sur l'évaluation de la pollution atmosphérique due au système

de transport dans les zones urbaines surtout dans l'agglomération de Beyrouth (El-Fadel *et al.*, 2000a ; El-Fadel *et al.*, 1999 ; El-Fadel et Bou Zeid, 2000 ; Sbayti *et al.*, 2002).

La pollution de l'air au Liban touche surtout les agglomérations urbaines, les zones industrialisées et les zones proches des centrales électriques (El-Fadel *et al.*, 2009). Une revue de la littérature sur les travaux réalisés au Liban pour évaluer la qualité de l'air, est présentée dans ce paragraphe et un résumé est présenté dans le Tableau I-4. La plupart de ces travaux ont porté sur les émissions des particules atmosphériques, les gaz à effet de serre (GreenHouse Gas ; GHG), le NO_2, SO_2 et O_3. Nous débuterons par la présentation des études qui englobent tout le Liban, puis nous présenterons les études réalisées dans deux zones industrielles (Chekka et Selaata) puis dans les deux plus grandes agglomérations au Liban (Tripoli et Beyrouth).

Un inventaire des émissions atmosphériques de sources anthropiques et biogéniques a été développé au Liban. Les émissions annuelles obtenues à partir de l'inventaire pour l'année 2010 pour le CO, NO_x, SO_2, COVNM, NH_3, PM_{10} et $PM_{2,5}$ étaient de 563, 75, 62, 115, 4, 12 et 9 Gg, respectivement. La distribution spatiale des émissions montre que les émissions de CO, NO_x et des COVNM sont principalement au niveau de Beyrouth et ses banlieues, Tripoli et Saïda, qui se caractérisent par des populations denses, un trafic lourd et de petites industries. Les grandes centrales électriques et les installations industrielles dans les régions de Zouk Mikael, Jiyeh, Chekka et Selaata sont les principaux contributeurs aux concentrations de SO_2, PM_{10} et $PM_{2,5}$ (Waked *et al.*, 2012).

En 1999, une étude sur les émissions des gaz à effet de serre provenant du secteur des transports au Liban a été publiée par El-Fadel et Bou-Zeid. Les émissions de CO, NOx et COVNM calculées pour l'année 1997 étaient de 344, 28, et 34 Gg/an, respectivement (El-Fadel et Bou Zeid, 1999).

D'autre part, un inventaire des gaz à effet de serre a été réalisé en 2001 par El-Fadel et collaborateurs, en suivant les directives établies par le Groupe d'experts intergouvernemental des Nations Unies, sur les changements climatiques. L'inventaire a indiqué que le secteur industriel est le deuxième plus grand émetteur de GHG après le secteur d'énergie au Liban et que les cimenteries, l'industrie de l'asphalte et du fer sont responsables d'environ 99% des émissions du secteur industriel (El-Fadel *et al.*, 2001).

Tableau I-4 : Résumé des études sur la qualité de l'air réalisées au Liban et polluant ciblé.

Polluants	Zones	Références
NO_2	Liban	(Waked *et al.*, 2012)
	Beyrouth	(Afif *et al.*, 2009)
	Tripoli	(TEDO, 2009 ; SMAP, 2002)
	Chekka	(Karam et Tabbara, 2004 ; MoE, 2001)
SO_2	Liban	(Waked *et al.*, 2012)
	Beyrouth	(Saliba *et al.*, 2006)
	Beyrouth	(Afif *et al.*, 2008)
	Tripoli	(TEDO, 2009 ; SMAP, 2002)
	Chekka	(Karam et Tabbara, 2004 ; MoE, 2001)
NH_3	Liban	(Waked *et al.*, 2012)
CO	Liban	(Waked *et al.*, 2012)
	Beyrouth	(Saliba *et al.*, 2006)
O_3	Beyrouth	(Saliba *et al.*, 2006)
	Tripoli	(TEDO, 2009 ; SMAP, 2002)
Gaz à effet de serre	Liban	(El-Fadel *et al.*, 2001 ; El-Fadel et Bou Zeid, 1999 ; Gérard, 2009)
COVNM*	Liban	(Waked *et al.*, 2012)
Hydrocarbures légers	Beyrouth	(Moussa *et al.*, 2006)
BTX*	Tripoli	(TEDO, 2009 ; SMAP, 2002)
TSP	Beyrouth	(El-Fadel *et al.*, 1999)
	Tripoli	(TEDO, 2009 ; SMAP, 2002)
	Selaata	(Yammine *et al.*, 2010)
	Chekka	(Kfoury *et al.*, 2009)
PM_{10}	Beyrouth	(Daher *et al.*, 2013 ; Kouyoumdjian et Saliba, 2006 ; Massoud *et al.*, 2011 ; Saliba et Chamseddine, 2012 ; Saliba *et al.*, 2010 ; Saliba *et al.*, 2009 ; Saliba *et al.*, 2007a ; Saliba *et al.*, 2006 ; Shaka et Saliba, 2004)
	Liban	(Waked *et al.*, 2012)
	Tripoli	(TEDO, 2009 ; SMAP, 2002)
	Chekka	(Karam et Tabbara, 2004 ; MoE, 2001)
$PM_{2,5}$	Beyrouth	(Daher *et al.*, 2013 ; Kouyoumdjian et Saliba, 2006 ; Massoud *et al.*, 2011 ; Saliba et Chamseddine, 2012 ; Saliba *et al.*, 2010 ; Saliba *et al.*, 2007a ; Shaka et Saliba, 2004)
	Liban	(Waked *et al.*, 2012)
	Tripoli	(TEDO, 2009)
$PM_{0,25}$	Beyrouth	(Daher *et al.*, 2013)

*COVNM = Composés Organiques Volatiles Non-Méthaniques ; BTX = Benzène Toluène Xylène.

Par ailleurs, dans le rapport de l'inventaire des gaz à effet de serre de Adjizian-Gérard en 2009, il a été montré que le CO_2 constitue 94% des émissions totales des GHG au Liban pour les années 2000 à 2006. Le reste des émissions est composé essentiellement CH_4 et N_2O. Par conséquent, il a été montré que le principal émetteur du CO_2 est le secteur d'énergie surtout les centrales électriques. Pour le CH_4, les déchets participent à environ 60% des émissions. Quant au N_2O, l'agriculture et la foresterie, surtout l'utilisation des engrais, constituent la principale source d'émission au Liban (Gérard, 2009). L'analyse de l'inventaire a montré que les principales sources d'émission de GHG sont la production d'électricité et le système de transport. Cependant, il a été mis en évidence le rôle important des cimenteries dans l'émission des GHG et qui prend de plus en plus d'importance.

Dans la suite de cette partie, un résumé de l'ensemble des travaux sur la qualité de l'air réalisés à Chekka, Selaata, Tripoli et Beyrouth est présenté. La localisation de ces zones d'étude est représentée dans la Figure I-9.

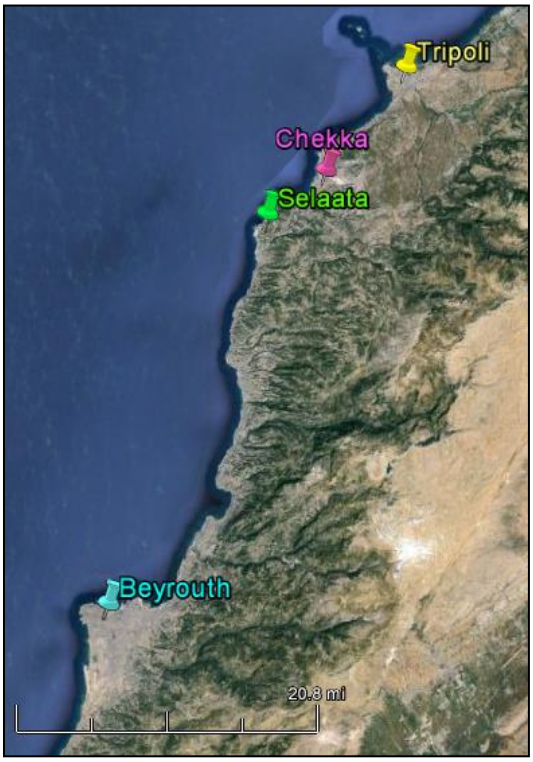


Figure I-9 : Localisations des zones d'étude de la qualité de l'air au Liban

3.4.1. Cas de Chekka et Selaata

Au Nord du Liban, les régions côtières de Chekka et de Selaata sont des zones industrielles. La première est caractérisée surtout par la présence de deux cimenteries et la deuxième par la présence d'une usine de fabrication d'engrais phosphatés. Ces deux régions ont fait l'objet de peu d'études sur la pollution de l'air et particulièrement sur les aérosols atmosphériques.

3.4.1.a. Chekka

En 2001, le Ministère Libanais de l'Environnement a publié les résultats du programme de surveillance de la qualité de l'air dans la région de Chekka. Les niveaux de SO_2 (1,28-2 mg/m^3), de NO_2 (13,14-20,76 mg/m^3) et de PM_{10} (67-315 µg/m^3) trouvés dans tous les sites d'échantillonnage (MoE, 2001), dépassaient les normes de la qualité de l'air ambiant fixés par l'US-EPA ainsi que les normes libanaises.

Ensuite, en 2004 Karam et Tabbara ont utilisé un modèle de dispersion afin d'évaluer la dispersion et la concentration de polluants atmosphériques qui sont émis par les usines de ciment et de leurs carrières correspondantes à Chekka. Ils ont constaté que les concentrations de NO_2, SO_2 et de PM_{10} dépassaient les normes de l'US-EPA dans plusieurs endroits et pour de longues périodes et que les niveaux les plus élevés ont été remarqués dans les sites localisés sous la direction du vent provenant du côté des cimenteries. Les activités liées aux industries du ciment sont la principale source de ces polluants. Les résultats ont confirmé que les fumées industrielles ne représentent pas plus d'une fraction (10 à 20%) de la pollution observée. Le reste est produit par les sources secondaires (carrières) et les centrales électriques privées opérant dans chaque site industriel. Par conséquent, la population locale est soumise à des risques plus élevés de mortalité par maladies cardio-pulmonaires et de cancer du poumon que la population libanaise globale (Karam et Tabbara, 2004).

En 2009, une évaluation de la composition chimique des particules atmosphériques collectées aux niveaux de différents sites de la région industrielle de Chekka a été réalisée par Kfoury et collaborateurs (Kfoury *et al.*, 2009). Cette étude s'est concentrée sur la caractérisation chimique des TSP (ions inorganiques et éléments majeurs et traces). Les auteurs ont remarqué que la charge moyenne globale des espèces analysées et par conséquent la masse des particules

collectées augmente à mesure que les sites s'approchent de la zone industrielle (cimenteries et carrières). Parmi les métaux analysés, le potassium possède la concentration moyenne la plus élevée (4370 ng/m^3) suivi par le calcium (2134 ng/m^3) et le sodium (1079 ng/m^3). D'autre part, l'aluminium et le fer montrent des concentrations modérées de 522 et 386 ng/m^3 respectivement. Concernant les ions solubles dans l'eau, le NO_3^- possède la concentration moyenne la plus élevée (6182 ng/m^3), suivi par le SO_4^{2-} (4048 ng/m^3), le NH_4^+ (1726 ng/m^3) et le Cl^- (1278 ng/m^3).

3.4.1.b. Selaata

Concernant Selaata, quelques tentatives ont été menées pour évaluer la pollution causée par l'usine d'engrais chimique dans cette région. Brigden et collaborateurs et Nakhlé ont été intéressés par l'analyse des effluents provenant de l'usine (Brigden *et al.*, 2002 ; Nakhlé, 2003), alors que Yammine et collaborateurs (Yammine *et al.*, 2010) ont été concentrés sur les particules atmosphériques émises par l'usine. En effet, la composition chimique des TSP collectés dans différents sites de la région de Selaata a été déterminée. Les concentrations de phosphore élémentaire, du calcium, du nitrate et des éléments traces (Ti, V, Cr, Cu, Cd, Ni, et Mn) ont été plus élevées dans les sites situés au Nord de l'usine, sous le vent dominant, que dans ceux situés au Sud. Ceci a pu mettre en évidence la contribution de l'usine d'engrais à l'augmentation des concentrations de phosphate dans la région, de calcium (par la remise en suspension de la poussière chargée en calcium par les machines lourdes et/ou par le broyage des roches), du nitrate (par l'émission du NO_2 par les véhicules lourdes et/ou les moteurs utilisés dans le site industriel) et des éléments traces (Ti, Cr, Ni et Mn) ayant comme une source possible les impuretés présentes dans les roches phosphatées.

3.4.2. Cas de Tripoli

L'union des municipalités d'Al Fayhaa (au nord du Liban) se compose de trois villes : Tripoli, El Mina et Beddaoui. Tripoli, située à 80 km de Beyrouth, est la capitale du Nord et la deuxième plus grande ville après Beyrouth. El Mina, la deuxième ville d'Al Fayhaa, est la zone voisine de Tripoli et est fortement liée à elle géographiquement et historiquement. Beddaoui, la troisième ville, est le cœur des activités industrielles et des complications de zones résidentielles pauvres d'Al Fayhaa. Cette région a attiré l'attention des chercheurs depuis l'année 2000 et

quelques études menées afin d'évaluer la qualité de l'air dans la région, sont présentées ci-dessous.

Les résultats de l'inventaire réalisé par l'observatoire de l'environnement et de développement de Tripoli (TEDO) dans la région d'Al Fayhaa ont montré que les problèmes de la pollution de l'air sont dus à 16 secteurs qui ont clairement des impacts sur l'environnement. Parmi ces secteurs nous citons : le système de transport, les navires (port), la centrale électrique de Deir Amar, la décharge, la construction, la remise en suspension des poussières à partir des routes pavées, le transfert de l'essence dans les réservoirs des camions, les générateurs électriques et le chauffage domestique. Il a été montré que ces 16 secteurs sont situés dans des zones spécifiques de Tripoli, El Mina et Beddaoui qui sont également caractérisées par des niveaux élevés de polluants (TSP, PM_{10}, $PM_{2,5}$, NO_2, SO_2 O_3, benzène, toluène et xylène) qui dépassent les normes de l'US-EPA ainsi que les normes libanaises (SMAP, 2002).

Ensuite, en 2008 TEDO a installé des stations de surveillance fixes dans le centre-ville de Tripoli (station urbaine) et sur le toit du bâtiment de TEDO (station périurbaine sous l'influence des vents marins) afin de surveiller les TSP, PM_{10} et $PM_{2.5}$ à Tripoli. TEDO a également installé 13 stations de surveillance d'échantillonnage passif, réparties dans 13 zones d'Al Fayhaa, et ceci dans le but de contrôler les polluants suivants : benzène, toluène, xylène, HF, NO_2, SO_2 et O_3. Durant la période d'échantillonnage, les relevés de TSP ont dépassé 40 fois la norme quotidienne nationale fixée à 75 $\mu g/m^3$; De même, les valeurs de PM_{10} ont dépassé 61 fois la norme quotidienne nationale fixée à 50 $\mu g/m^3$ sur 84 jours d'échantillonnage. Concernant les $PM_{2,5}$, généralement les valeurs enregistrées à Tripoli ont été sensiblement supérieures aux normes quotidiennes de l'US-EPA (35 $\mu g/m^3$) et de l'OMS (25 $\mu g/m^3$) (TEDO, 2009).

3.4.3. Cas de Beyrouth

La plupart des travaux réalisés dans l'agglomération de Beyrouth ont porté sur les émissions des particules atmosphériques (PM_{10} ; $PM_{2,5}$ et récemment les $PM_{0,25}$) alors que d'autres ont évalué les émissions des gaz NO_2 et SO_2.

3.4.3.a. Les gaz NO_2 et SO_2

Une étude a été menée par l'Université Saint-Joseph de Beyrouth, la région Ile-de-France et Airparif entre décembre 2004 et juillet 2006. Elle repose sur un réseau de stations dans l'agglomération de Beyrouth équipées de préleveurs à diffusion passive pour la mesure de NO_2 et SO_2 (Afif *et al.*, 2008 ; Afif *et al.*, 2009). Des faibles concentrations en SO_2 ont été observées (Afif *et al.*, 2008) par contre, la concentration moyenne annuelle de NO_2 mesurée en 2005 était de 67 µg/m^3 (Afif *et al.*, 2009), supérieure à la valeur annuelle maximale recommandée par l'OMS (40 µg/m^3). Par conséquent, la capitale libanaise soufre d'une pollution chronique au NO_2 mais, par contre le cas ne se présente pas pour le SO_2. Les concentrations atmosphériques les plus élevées des deux polluants ciblés ont été mesurées en hiver. En plus des sources locales, le transport à longue distance peut représenter une source importante de SO_2 à Beyrouth, expliquant environ 50% des niveaux de SO_2 dans la ville. Quant au NO_2, sa principale source d'émission est le système de transport.

3.4.3.b. Les particules atmosphériques

Dans ce paragraphe un ordre chronologique des études réalisées dans l'agglomération de Beyrouth sur les particules atmosphériques, leurs concentrations et compositions, est présenté.

Lors d'une étude réalisée par El-Fadel et collaborateurs en 1999 (El-Fadel *et al.*, 1999), des échantillons d'air prélevés dans plusieurs sites à Beyrouth ont révélé une concentration moyenne de TSP de 166 µg/m^3. D'après les auteurs, les principales sources des TSP sont les émissions des échappements des véhicules, la remise en suspension des poussières par la circulation de ces véhicules, ainsi que par les activités de construction et les carrières.

En 2004, Shaka et Saliba (Shaka et Saliba, 2004) ont déterminé des teneurs moyennes de 76 et de 40 µg/m^3 pour les $PM_{10-2,5}$ et les $PM_{2,5}$ respectivement, et ont observé la présence des anions SO_4^{2-}, NO_3^-, SiO_4^{2-}, CO_3^- et du cation NH_4^+ en concentrations plus importantes dans les $PM_{2,5}$ que dans les $PM_{10-2,5}$ collectées au niveau du campus de l'Université Américaine de Beyrouth (AUB). Ils ont également montré que les tempêtes de poussières se caractérisent par un enrichissement en SiO_4^{2-} et $CaCO_3$. Des groupes fonctionnels organiques comme les carbones aliphatiques, les alcools, les carbonyles, et les nitrates organiques ont également été détectés. Des

concentrations plus élevées d'espèces organiques, ont été identifiées dans les $PM_{2,5}$ alors que des concentrations élevées en eau ont été observées dans les $PM_{10-2,5}$.

En 2006, Moussa et collaborateurs ont mesuré les hydrocarbures légers (formaldéhyde, acétaldéhyde, propanal, acétone) et le monoxyde du carbone dans deux sites différents de Beyrouth. Ils ont trouvé que les formaldéhydes et les acétaldéhydes étaient les plus abondants, et que les émissions des véhicules de transport constituent la source principale de ces composés (Moussa *et al.,* 2006).

Durant la même année, Saliba et collaborateurs ont suivi la variation des concentrations de CO, SO_2, O_3, et PM_{10} dans l'air de la ville de Beyrouth afin d'identifier leurs sources majeures d'émission. Les résultats montrent que les concentrations mensuelles moyennes de CO, SO_2 et O_3 sont inférieures aux valeurs fixées par l'US-EPA à la différence des PM_{10}, et que les véhicules de transport et les chauffages sont les sources majeures de CO et SO_2 respectivement (Saliba *et al.,* 2006).

Entre Février 2004 et Janvier 2005, des faibles concentrations de PM ($PM_{10-2,5}$ et $PM_{2,5}$) ont été mesurées à Beyrouth (Borj Hammoud) durant la saison pluvieuse alors que des niveaux élevés ont été observés durant les tempêtes de sable provenant des déserts d'Arabie et/ou de l'Afrique. Les concentrations moyennes annuelles étaient de 53±20 et 31±9 µg/m^3 pour les $PM_{10-2,5}$ et $PM_{2,5}$ respectivement. D'après les auteurs, les ions NO_3^-, SO_4^{2-}, CO_3^{2-} et Cl^- sont les principaux constituants anioniques des $PM_{10-2,5}$, alors que les sulfates sont principalement dominants dans les $PM_{2,5}$ sous forme de $(NH_4)_2SO_4$. En parallèle, les cations Ca^{2+} et Na^+ dominent dans les grosses particules tandis que les particules fines sont dominées par les cations NH_4^+, Ca^{2+} et Na^+ (Kouyoumdjian et Saliba, 2006). Les auteurs ajoutent qu'en été, une augmentation des ions nitrates et sulfates a été remarquée en raison de l'amélioration des réactions photochimiques facilitant ainsi la conversion des gaz de NO_2 et SO_2 en NO_3^- et SO_4^{2-} respectivement. De plus, les émissions de NO_2 ont été principalement attribuables au système de transport local. Par contre celles de SO_2 sont dues aux phénomènes de transport local et à longue distance (vents venant du centre et de l'Est de l'Europe). D'autre part, en plus du sel marin, des concentrations élevées de chlorure ont été également attribuées à l'incinération des déchets à proximité du site et les concentrations élevées de calcium qui ont été observées sont une bonne indication de l'abondance du calcium terrigène dans la région.

En 2007, la composition de ces particules, collectées à Borj Hammoud, en éléments majeurs et traces a été déterminée par Saliba et collaborateurs (Saliba *et al.*, 2007a). Les résultats montrent que les éléments terrigènes (Si, Ca, K, Ti, Mn et Fe) sont plus abondants dans la fraction $PM_{10-2,5}$ tandis que les éléments d'origine anthropique (S, Cu, Zn et Pb) dominent dans les $PM_{2,5}$. Les concentrations élevées des éléments terrigènes ont été associées aux tempêtes de sable venant du désert du Sahara et de l'Afrique. Les auteurs ont également attribué les concentrations élevées de Cu et Zn aux particules générées par l'usure des disques et plaquettes de freins et des pneus.

En 2009, la relation entre les concentrations en PM_{10} et celles des ions inorganiques solubles présents à l'intérieur et à l'extérieur des maisons à Beyrouth a été étudiée par Saliba et collaborateurs (Saliba *et al.*, 2009). Cette étude a montré des teneurs élevées en PM_{10} qui sont en corrélation avec le trafic automobile, l'activité des fumeurs à l'intérieur, mais aussi avec le degré de ventilation des maisons. Les sulfates et nitrates hydrosolubles ont montré des concentrations pratiquement identiques dans l'air intérieur et extérieur de résidences sans fumeur. Tandis que dans les maisons avec fumeur, le niveau des nitrates solubles était beaucoup plus faible du fait de leur réaction possible avec la fumée de tabac pour produire les nitrosamines.

En 2010, une évaluation des concentrations des PM_{10} et $PM_{2,5}$ collectées entre 2003 et 2007 dans divers sites de Beyrouth a été réalisée et les concentrations obtenues étaient supérieures à celles fixées par l'OMS (20 et 10 $\mu g/m^3$ respectivement). De plus, les concentrations moyennes globales pour les deux types de particules ont été plus élevées en automne et en été. D'après les auteurs ceci est dû aux faibles précipitations, à l'augmentation des activités de la tempête de poussière en automne, l'augmentation des brises de la mer et de la terre en été, accompagnée d'une augmentation des activités de trafic (l'été est une grande saison touristique) (Saliba *et al.*, 2010).

Une autre étude a été réalisée en 2011 par Massoud et collaborateurs (Massoud *et al.*, 2011). Dans cette étude, les concentrations des PM_{10} et $PM_{2,5}$ collectées dans trois sites à Beyrouth entre Mai 2009 et Avril 2010, ainsi que leurs compositions chimiques ont été déterminées. Les résultats ont montré que malgré que les concentrations de PM_{10} et de $PM_{2.5}$ aient montré des facteurs de corrélation élevés et de faibles coefficients de divergence indiquant une grande homogénéité entre les trois sites, une hétérogénéité a été trouvée dans leurs

composants individuels. A partir des coefficients de divergences, les auteurs ont pu mettre en évidence que les contributions des ions et des éléments aux niveaux totaux des PM sont différentes entre les 3 sites malgré que ces espèces proviennent de sources similaires.

En 2012, Saliba et Chamseddine ont mené une étude à Beyrouth en collectant les particules atmosphériques (PM_{10} et $PM_{2,5}$) au niveau du campus de l'université AUB depuis août 2009 jusqu'au avril 2010. Les résultats ont montré que durant les épisodes riches en poussières, les niveaux de PM_{10} et de $PM_{2,5}$ ont augmenté de 80 et 75% respectivement et qu'une augmentation des nitrates dans les PM_{10} (36%) et les $PM_{2,5}$ (54%) a été attribuée à la réaction de HONO et HNO_3 avec les particules de poussière ($CaCO_3$) qui est améliorée en zone urbaine (Saliba et Chamseddine, 2012).

Très récemment, une étude a été menée par Daher et collaborateurs en 2013 (Daher *et al.*, 2013) dans le but de caractériser les émissions dues au trafic routier dans l'agglomération de Beyrouth. Des $PM_{10-2,5}$, $PM_{2,5-0,25}$ et des $PM_{0,25}$ ont été collectées au niveau d'un site urbain de fond et d'un autre site proche d'une autoroute. La fermeture chimique a montré que la fraction $PM_{10-2,5}$ est composée en grande partie des éléments « terrigènes », contribuant à 12-23% de sa masse, tandis que pour les $PM_{2,5-0,25}$ et $PM_{0,25}$, les composés organiques (46-56%) dominent au niveau du site proche de l'autoroute alors que les ions secondaires (54-68%) ont été plus abondants au niveau du site de fond. Les auteurs ont montré aussi que les niveaux de carbone organique varient de 4 µg/m^3 dans les $PM_{10-2,5}$ jusqu'à 10,1 µg/m^3 dans les $PM_{0,25}$ collectées à côté de l'autoroute, dépassant celles collectées dans le site de fond (4-7 fois). Quant au carbone élémentaire, il a été montré que sa teneur dans les $PM_{0,25}$ collectées à côté de l'autoroute était 7 fois supérieure à celle trouvée dans le site de fond, indiquant une contribution des véhicules au diesel aux émissions du trafic routier. Finalement, des HAP ont été détectés dans le site proche de l'autoroute (un maximum de 11,5 ng/m^3) et pas dans le site de fond, avec la majorité confiné à la fraction $PM_{0,25}$.

Partie B :

Particules atmosphériques et pathologies respiratoires

La seconde partie de cette analyse bibliographique sera consacrée à l'étude de l'impact des particules sur l'appareil respiratoire. Nous reviendrons dans un premier temps sur l'anatomie et la physiologie de l'appareil respiratoire, afin de comprendre comment elles peuvent déterminer la déposition et la rétention des particules, avant d'aborder la génotoxicité et les mécanismes d'altérations épigénétiques.

1. L'appareil respiratoire : principale cible des particules atmosphériques

1.1. Physiologie de l'appareil respiratoire

L'Homme respire en moyenne 15 m^3 d'air par jour, et la zone d'échange gazeux de l'appareil respiratoire représente une superficie pouvant atteindre 100 m^2. En effet, le poumon constitue ainsi l'interface la plus importante entre le milieu extérieur et l'organisme, ce qui lui confère un intérêt particulier en toxicologie. Par conséquent, cet appareil est une cible privilégiée pour les différents agents toxiques et les polluants gazeux et particulaires présents dans l'air que nous respirons. Cependant on distingue deux régions fonctionnelles distinctes : les voies aériennes supérieures et les voies aériennes inférieures (Figure I-10).

Les voies aériennes supérieures englobent les structures rigides suivantes :

- Les fosses nasales sont constituées d'un épithélium olfactif associé à un épithélium respiratoire, cylindrique, cilié et pseudostratifié dont la fonction est de filtrer les poussières en suspension dans l'air grâce aux poils qui les tapissent.
- Le pharynx est formé d'un épithélium squameux stratifié non kératinisé, participant à la respiration et à la digestion.
- Le larynx est constitué d'un épithélium pluristratifié squameux au niveau des cordes vocales, et d'un épithélium de type respiratoire, où les cellules ciliées battent vers la

bouche pour écarter les particules, les bactéries et le mucus pour ne pas atteindre les poumons.

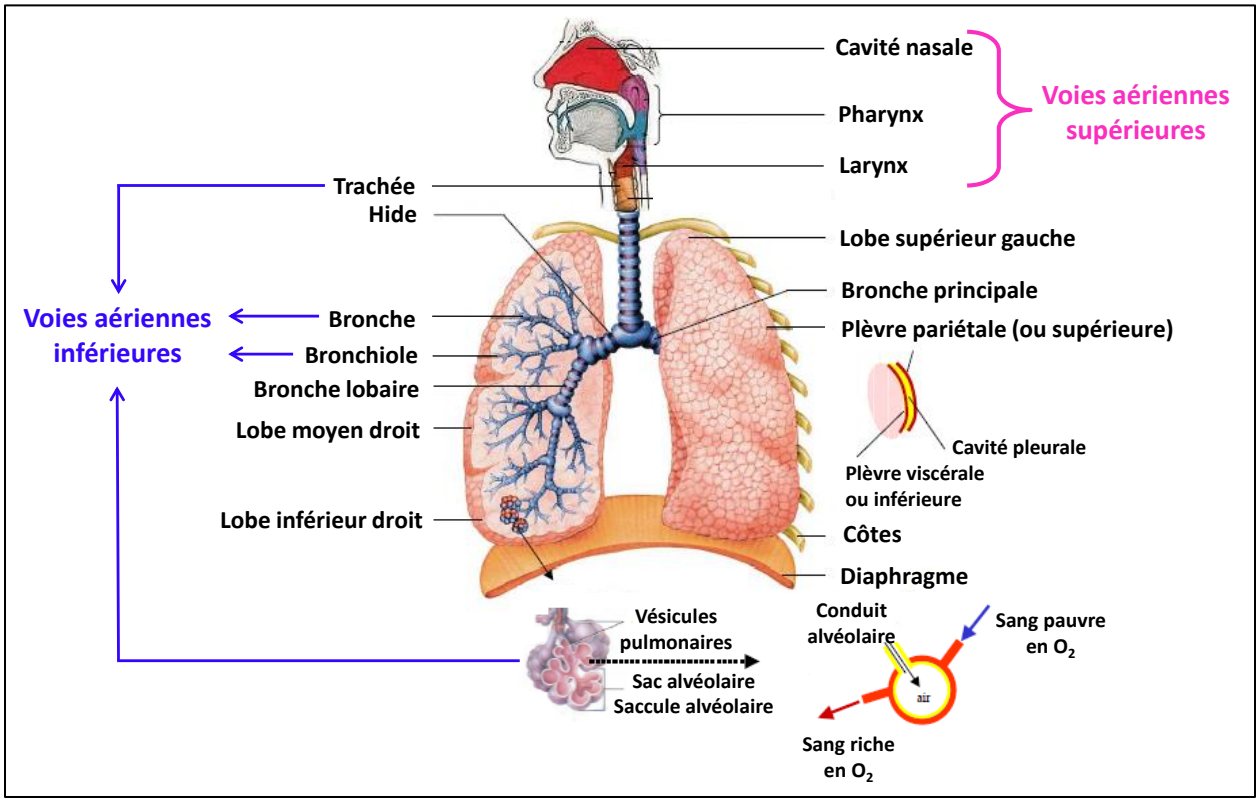


Figure I-10 : Système respiratoire (adaptée de Bassart, 2006).

Quant aux voies aériennes inférieures, elles englobent la trachée, les bronches, les bronchioles et les alvéoles. Elles sont divisées en zones conductrice et respiratoire (Tableau I-5).

La zone conductrice, comprend les régions qui ne subissent pas des échanges gazeux et commencent par la trachée. Cette dernière se divise en 2 bronches principales qui se séparent en une série de bronches et de bronchioles intra-pulmonaires qui se terminent par les bronchioles terminales (16ème génération) (Tableau I-5). Le diamètre et la longueur de chaque branche des voies aériennes successives diminuent progressivement tout en pénétrant profondément dans le poumon (BéruBé *et al.*, 2010).

Cette zone conductrice est suivie par les bronchioles respiratoires, une région de transition ayant les caractéristiques des bronchioles et des alvéoles à la fois. Enfin, les parties terminales des bronches sont les alvéoles qui sont les unités fonctionnelles des poumons car elles

forment le site d'échange gazeux. Les bronchioles respiratoires et les alvéoles (conduits et sacs alvéolaires) constituent la zone respiratoire (BéruBé *et al.*, 2010) (Tableau I-5).

Tableau I-5 : Zones conductrice et respiratoire des voies aériennes inférieures chez l'Homme.
La ramification des voies respiratoires forme jusqu'à 23 générations (Z), de la trachée Z = 0 jusqu'aux sacs alvéolaires Z = 23 (les générations Z = 20-22 ne sont pas présentées et correspondent aux canaux alvéolaires) (adapté de Germann et Stanfield, 2004).

ZONE	Anatomie	Structure	Génération (Z)	Types de cellules
		Larynx	N/A	Cellules ciliées ; Cellules caliciformes ; Cellules basales
Conductrice		Trachée	0	. Cellules ciliées . Cellules caliciformes . Cellules basales . Cellules séreuses . Cellules des glandes séreuses . Cellules des glandes à mucus
		Bronches primaires	1	
		Bronches secondaires	2	. Cellules ciliées . Cellules caliciformes . Cellules basales . Cellules séreuses
		Bronches tertiaires	3	
		Petites bronches	4	
		Bronchioles	5	
		Bronchioles terminales	6-16	Cellules ciliées ; Cellules de Clara ; Cellules basales
Respiratoire				Cellules ciliées ; Cellules de Clara ; Cellules basales ; pneumocytes de types I et II
		Bronchioles respiratoires	17-19	
		Sacs alvéolaires	23	. Pneumocytes de type I . Pneumocytes de type II

1.1.1. Les épithéliums des voies aériennes inférieures

Comme les voies aériennes inférieures progressent de la zone conductrice vers la zone respiratoire, les types cellulaires changent pour assurer les fonctions spécifiques et les mécanismes de défense pour chaque région (BéruBé *et al.*, 2010).

La zone conductrice des voies respiratoires inférieures (trachée, bronches et bronchioles) est formée d'un épithélium pseudo-stratifié constitué surtout de cellules caliciformes sécrétrices,

de cellules basales et de cellules ciliées (Figure I-11) qui fournissent des mécanismes de clairance mucociliaire et englobe les structures suivantes :

- La trachée : maintenu béant par des anneaux incomplets de cartilage, la trachée est composée d'un épithélium de type respiratoire renfermant de très nombreuses cellules caliciformes sécrétrices de mucus et reposant sur une lame basale. Sa surface est humidifiée par des sécrétions muqueuses et séreuses. Les battements ciliaires font remonter le film muqueux vers le larynx; ce film englobe des particules étrangères contenues dans l'air inspiré qui n'auraient pas été retenues en amont.

- Les bronches : leurs parois contiennent du cartilage et des glandes séromuqueuses. Les bronches sont constituées d'un épithélium mucociliaire pseudostratifié constitué principalement de quatre types cellulaires : les cellules sécrétrices, notamment les cellules à mucus (cellules caliciformes) et les glandes séreuses, les cellules ciliées, les cellules basales et les cellules intermédiaires. Le battement ciliaire permet le déplacement du mucus sécrété dans un sens rétrograde afin d'assurer la remontée des particules déposées dans les voies aériennes et leur élimination (Jaurand *et al.,* 1995). La fonction de clairance de l'arbre trachéobronchique est un processus physiologique de première importance dans la protection des poumons contre les agressions extérieures.

- Les bronchioles : l'épithélium des bronchioles est constitué surtout de cellules ciliées, et de cellules de Clara. Ces dernières sont particulièrement remarquables. Ce sont des cellules sécrétoires non-ciliées possédant une intense activité métabolique. Notamment leur système de monooxygénases à cytochrome P450 (CYP450), permet la métabolisation d'une vaste gamme de xénobiotiques, et entraîne ainsi la libération de métabolites réactifs potentiellement toxiques (Chang *et al.,* 2006).

Quant à la zone respiratoire, les alvéoles pulmonaires sont tapissées de deux types de pneumocytes (qui sont trouvées aussi dans l'épithélium des bronchioles respiratoires) (Figure I-11). Les pneumocytes de type I représentent 95 % de la surface alvéolaire. Ces cellules, aplaties et incapables de se diviser, contiennent seulement quelques organites, et jouent le rôle de mince barrière à travers laquelle s'effectuent les échanges gazeux entre le sang et l'air (Andreeva

et al., 2007). Malgré leur plus faible participation à la surface alvéolaire, les pneumocytes de type II, de forme cubique et représentant 60 % des pneumocytes, disposent de fonctions particulièrement importantes. Ils sont capables de se diviser et de se différencier en cellules de type I. La fonction principale et la plus largement étudiée des pneumocytes de type II est la sécrétion du surfactant pulmonaire par les corps lamellaires (Fehrenbach, 2001). Cet agent tensio-actif diminue la tension superficielle à la surface des alvéoles et évite le collapsus des sacs alvéolaires. De plus, son rôle est suggéré dans la protection contre les oxydants et les infections (Schmitz et Muller, 1991). Il existe également une population résidente de macrophages alvéolaires (phagocytes) qui se trouvent dans les espaces interstitiels et fonctionnent pour se débarrasser des débris inhalés et déposés dans les voies aériennes (Figure I-11).

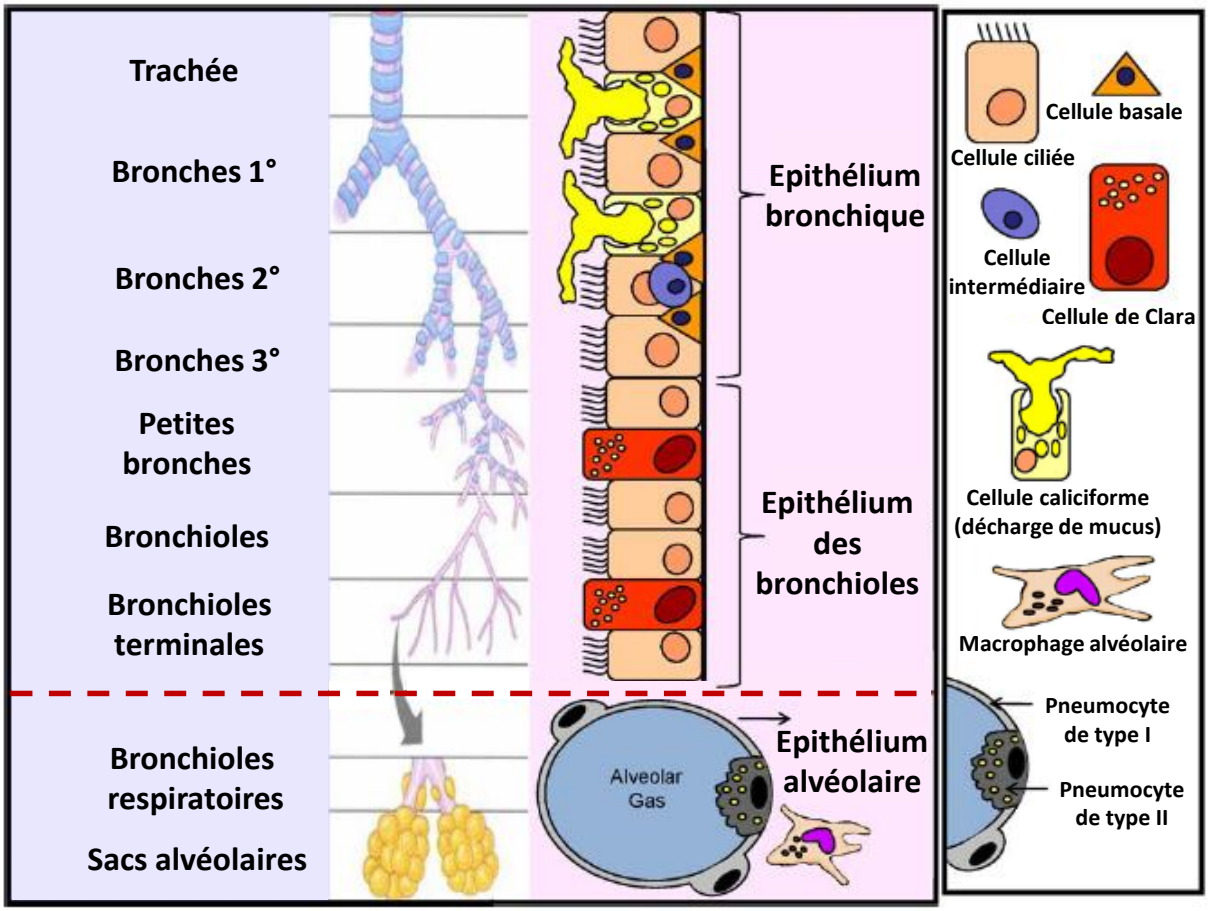


Figure I-11 : Les principaux types de cellules trouvées le long de l'épithélium des voies aériennes inférieures dans le tractus respiratoire humain (adaptée de BéruBé *et al.*, 2010).

1.2. Interaction des particules atmosphériques avec l'appareil respiratoire

1.2.1. Pénétration, dépôt et clairance des particules atmosphériques

L'appareil respiratoire est la cible majeure des polluants de l'air, plus particulièrement les particules atmosphériques. Le profil granulométrique de ces particules détermine leur site de déposition dans l'appareil respiratoire et l'on peut ainsi déterminer trois régions de dépôt : les régions nasopharyngée, trachéobronchiale et alvéolaire.

Les PM dites « respirables » sont celles qui ont un diamètre aérodynamique (d_{ae}) moyen inférieur à 10 µm (PM_{10}). Donc les particules de taille supérieure à 10 µm sont captées au niveau du segment nasopharyngé puis évacuées, grâce au système mucociliaire, par mouchage ou déglutition. Alors que les particules de d_{ae} inférieur à 10 µm dépassent cette première barrière et pénètrent jusqu'au segment trachéobronchique (Figure I-12). Ce segment est protégé par des cellules ciliées et des cellules caliciformes produisant du mucus. Par un mouvement ondulatoire, les minuscules cils des cellules ciliées transportent le film muqueux et les corps étrangers qui y sont englués jusqu'au pharynx où ils sont déglutis en continu. La clairance mucociliaire, qui assure une élimination rapide des particules (en 24 h environ), constitue la première ligne de défense non spécifique des régions nasopharyngée et trachéobronchiale (ERS, 2010 ; Marano, 2007).

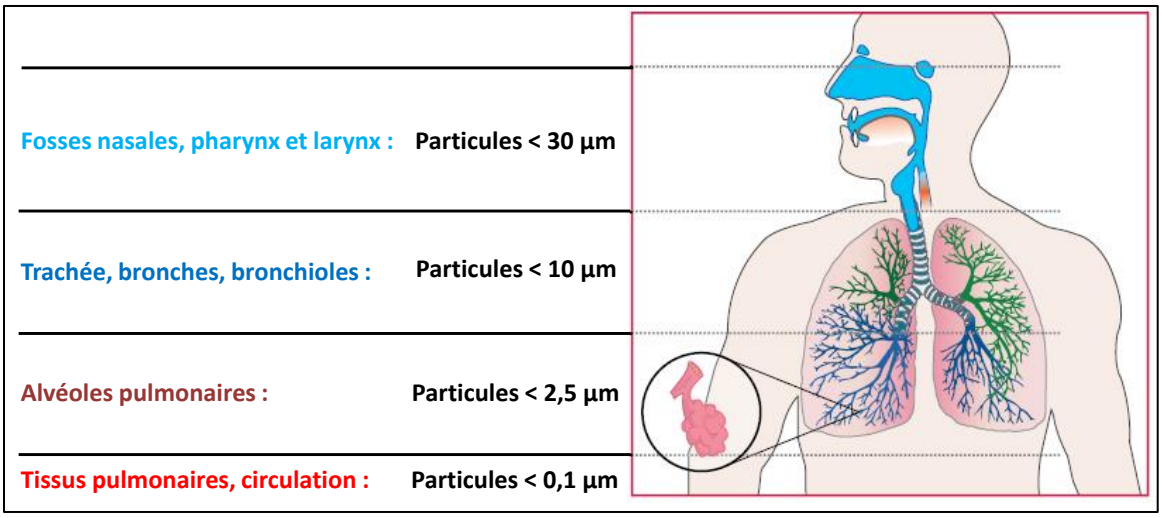


Figure I-12 : Profondeur de pénétration des particules atmosphériques dans les voies respiratoires (adaptée de ERS, 2010).

Quant aux particules fines, de d_{ae} inférieur à 2,5 µm, elles s'échappent à cette barrière et pénètrent profondément dans le poumon jusqu'aux alvéoles (Figure I-12). Ces dernières ne possèdent pas de cellules ciliées, mais possèdent une clairance macrophagique qui est plus lente, et donc la demi-vie des particules pourra atteindre des mois (Marano, 2007).

Concernant les particules ultrafines ($PM_{0,1}$), elles se comportent de façon particulière dans la mesure où leur dépôt se fait à la fois dans les régions nasopharyngée, trachéobronchiale et alvéolaire donc tout au long des voies de l'appareil respiratoire (Marano, 2007). De plus, dans le poumon profond, leur élimination par le processus de clairance alvéolaire est perturbée. En effet, il semble qu'elles soient plus difficilement phagocytées que les particules fines par les macrophages alvéolaires, ce qui conduit à une persistance accrue et une interaction avec les cellules épithéliales (Oberdörster *et al.*, 2005).

1.2.1.a. Mécanismes de dépôt des particules atmosphériques

En plus de la physiologie pulmonaire des patients (par exemple le motif de respiration et la géométrie du poumon), le dépôt des particules inhalées dépend de leurs propriétés physico-chimiques telles que : la forme, la charge, la densité, l'hygroscopie et surtout la taille qui est le facteur le plus important (Pilcer et Amighi, 2010). De plus, le débit d'inspiration joue également un rôle important dans ce dépôt (Dolovich, 2000). En effet, le dépôt des particules dans l'appareil respiratoire peut se faire par cinq mécanismes : impaction inertielle, sédimentation, diffusion, interception et interaction électrostatique (Carvalho *et al.*, 2011).

- **Impaction inertielle**

Vue la géométrie des voies respiratoires des poumons, l'air inspiré change brusquement de direction à chaque bifurcation. L'impaction inertielle se produit donc lorsque les particules en suspension présentent une dynamique suffisante pour maintenir leurs trajectoires malgré les changements de direction du flux d'air, et par conséquent, entrent en collision avec les parois de l'appareil respiratoire. Son effet augmente avec la taille et la densité des particules ainsi qu'avec la vitesse de l'air (qui augmente quand la respiration devient plus forte).

- **Sédimentation**

La sédimentation est un processus temps-dépendant durant lequel les particules se déposent sous l'influence de la gravité. L'effet de la sédimentation augmente avec la taille des particules, leur

densité, ainsi que leur temps de résidence dans les voies respiratoires qui augmente quand la respiration se ralentit.

- **Diffusion**

La diffusion se produit lorsque la vitesse de l'air est presque nulle et lorsque les particules sont suffisamment petites pour subir un mouvement aléatoire due à des collisions avec les molécules de gaz. Ce processus, également appelé mouvement brownien, est corrélé à la taille des particules. A l'opposition des mécanismes d'impaction et de sédimentation, la déposition par diffusion est donc inversement proportionnelle à la taille des particules et elle est caractéristique surtout des particules ultrafines.

- **Interception**

Ce phénomène se produit lorsque la particule, sans dévier de son chemin, rencontre la paroi d'un conduit pulmonaire et se dépose.

- **Interaction électrostatique**

Elle dépend des charges électrostatiques des particules atmosphériques. Deux mécanismes peuvent être à l'origine du dépôt des particules électriquement chargées : soit par attraction vers la surface par la charge image induite par la particule, ou bien par répulsion mutuelle des particules ayant la même charge et présentes en très grand nombre.

1.2.2. Translocation extra-pulmonaire des particules ultrafines

Chez l'Homme, le passage des particules ultrafines à travers la barrière alvéolo-capillaire a été étudié avec des nanoparticules de carbone de 20 nm marquées. Une première étude a montré une translocation rapide vers le sang et une accumulation significative dans le foie (Nemmar *et al.,* 2002), alors qu'une autre étude, réalisée durant la même année, conteste ces résultats (Brown *et al.,* 2002). Des études ultérieures n'ont pas confirmé cette constatation et ont détectés seulement un faible degré de translocation (Mills *et al.,* 2006 ; Wiebert *et al.,* 2006).

Cependant, si l'on considère le cas chez l'animal, plusieurs études ont montré que les particules ultrafines puissent traverser la barrière épithéliale alvéolaire vers l'interstitium pulmonaire. Elles seraient aussi capables de franchir la paroi des capillaires et de se retrouver dans le flux sanguin, distribuées ensuite au niveau de l'organisme. Elles peuvent ainsi avoir un impact sur d'autres organes, tels que le cœur ou le cerveau (Oberdörster *et al.,* 2005). Ces

résultats ont été observés aussi pour les nanoparticules du dioxyde de titane chez le rat (Geiser *et al.*, 2005; Mühlfeld *et al.*, 2007), ainsi que pour les particules d'échappement diesel chez le hamster (Nemmar *et al.*, 2004).

Après leur translocation à travers la barrière alvéolo-capillaire, l'accumulation des particules ultrafines dans des organes cibles a été étudiée à l'aide de nanoparticules modèles (par exemple : billes de polystyrène marquées). Le foie est le site majeur d'accumulation, mais une accumulation mineure dans le cœur et dans le rein a également été retrouvée (Akerman *et al.*, 2002). Par ailleurs, le passage des barrières hémato-encéphalique et placentaire est suspecté mais encore insuffisamment démontré.

Une autre voie d'entrée potentielle des particules ultrafines est la voie olfactive. Il est connu depuis de nombreuses années que certains virus peuvent emprunter le nerf olfactif, et des anciennes expériences chez le singe ont montré que des nanoparticules d'or colloïdal instillées dans les fosses nasales pouvaient être transportées vers le bulbe olfactif (de Lorenzo, 1970 ; Bodian et Howe, 1941a,b). La question d'un tel transfert se pose donc pour les particules atmosphériques ultrafines. Des observations d'inflammation chronique du cerveau et de maladies neurodégénératives chez des chiens, à Mexico, ont été associées à la forte pollution particulaire de la ville (Calderon-Garciduenas *et al.*, 2003). D'autre part, une étude réalisée par Kleinman et collaborateurs a montré que les particules ultrafines inhalées affectent les processus d'inflammation du système nerveux central *via* les voies de signalisation MAP-kinase chez des souris à Los Angeles (Kleinman *et al.*, 2008). Donc ceci permet de signaler que les particules ultrafines ont, peut-être, la capacité d'atteindre le cerveau *via* le nerf olfactif et de provoquer des inflammations ou des maladies neurodégénératives. Des études supplémentaires sont ainsi indispensables.

De nombreuses études épidémiologiques ont été menées afin d'explorer un éventuel lien entre l'exposition chronique aux particules atmosphériques et l'apparition de pathologies respiratoires dont le cancer broncho-pulmonaire. Cependant, les mécanismes d'actions potentiellement impliqués ne sont pas intégralement décrits et leur connaissance nécessite donc d'être approfondie. Dans la suite de ce manuscrit, nous présenterons certains mécanismes de toxicité pouvant être induits par des particules, qui pourraient influencer leur potentiel

cancérogène. Nous nous aborderons donc les processus d'activation métabolique, d'altération épigénétique et de génotoxicité.

2. Biotransformation des composés organiques adsorbés sur les particules atmosphériques

2.1. Principe et mécanismes de biotransformation

Le processus de biotransformation ou de métabolisme correspond à la transformation, par des réactions enzymatiques, d'un xénobiotique en un ou plusieurs composés, dits métabolites. Ces réactions conduisent à la formation des substances hydrosolubles plus facilement éliminées par les milieux aqueux tels que les urines, la bile, la salive ou la sueur.

Le principal organe impliqué dans ce processus est le foie et dans une moindre mesure les autres organes comme la peau, le rein, la muqueuse intestinale et le poumon (Hodgson, 2004). Nous nous intéresserons principalement à ce dernier puisqu'il constitue l'organe cible principal des polluants atmosphériques. Il faut noter que la biotransformation des xénobiotiques peut se révéler parfois néfaste en transformant une substance non toxique en métabolite(s) plus réactif(s) que la molécule initiale. Ce phénomène est appelé activation métabolique. Nous pouvons donc distinguer trois phases dans le métabolisme des xénobiotiques.

2.1.1. Les réactions de phase I ou de fonctionnalisation

Les réactions de phase I consistent à introduire un groupement fonctionnel polaire sur la molécule de xénobiotique et englobent les réactions d'oxydation, de réduction et d'hydrolyse. Parmi les enzymes de la phase I, les mono-oxygénases à cytochromes P450 (CYP450) sont des protéines à noyau hème (hémoprotéines) qui catalysent des réactions d'oxydation nécessitant de l'oxygène et du NADPH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate) comme source d'électrons. Elles sont localisées principalement dans la membrane du réticulum endoplasmique mais elles existent également dans la membrane interne des mitochondries. La nomenclature actuelle des CYP450 tient compte de leur appartenance à des familles et sous-familles grâce au pourcentage d'analogie dans la séquence d'acides aminés (Hodgson, 2004). Les CYP450 des familles 1, 2 et 3 sont généralement impliquées dans la phase I du métabolisme des médicaments

et d'autres composés étrangers à l'organisme, alors que les autres possèdent des fonctions endogènes (Hodgson, 2004).

2.1.2. Les réactions de phase II ou de conjugaison

Les produits de la phase I du métabolisme et d'autres xénobiotiques possédant des groupes fonctionnels tels que des groupements hydroxyle, amine, carboxyle, époxyde, ou un atome d'halogène peuvent subir des réactions de conjugaison avec des métabolites endogènes. Ces derniers comprennent des sucres, des acides aminés, du glutathion, du sulfate, etc. Les produits de conjugaison, avec de rares exceptions, sont plus polaires, moins toxiques et plus facilement excrété que sont leurs composés parents (Hodgson, 2004). Les réactions de la phase II sont présentées dans le Tableau I-6.

Tableau I-6 : Principales réactions de la phase II du métabolisme (Inserm, 2001).

Enzymes	Réactions	Groupe transféré	Exemples de substrats
UDP-Glucuronosyl-Transférases (UGT)	Glucuro-congugaison	Acide glucuronique	Hydroxylamines, arylamines
Sulfo-Transférases (ST)	Sulfo-conjugaison	Sulfate	Stéroïdes, phénoles, amines, hydroxylamines
Méthyltransférases	Méthylation	Méthyle	Amines, catécholamines, imidazoles, thiols
Glutathion-S-Transférases (GST)	Conjugaison au glutathion	Glutathion	Epoxydes d'AHP, Arylamines
Acétyl-transférases	Acétylation	Acéthyl	Arylamines, hydrazines
Glycine-transférases	Conjugaison à la glycine	Glycine	Acides carboxyliques aromatiques et aliphatiques

UDP = Uridine DiPhosphate ; HAP = Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

Une autre enzyme comme la NAD(P)H-Quinone Oxydoréductase (NQO1) est également mise en jeu au cours de cette phase du métabolisme. La réduction à deux électrons catalysée par cette enzyme nécessite l'oxydation d'un cofacteur, la NADPH. L'action de la NQO1 engendre une réduction des quinones qui se forment durant le métabolisme des xénobiotiques en hydroquinones protégeant ainsi la cellule des effets toxiques de ces métabolites. En effet, les quinones sont des métabolites électrophiles qui peuvent interagir avec les macromolécules cellulaires telles que l'Acide DésoxyriboNucléique (ADN) et les protéines formant ainsi des

adduits (Joseph et Jaiswal, 1994). De plus, ce processus permet de contourner les intermédiaires radicalaires de semiquinones potentiellement toxiques, qui peuvent être formés par la réduction à un électron des quinones (Ross *et al.*, 2000).

2.1.3. Les réactions de phase III ou de transport

C'est une étape indispensable à la détoxification. Elle se base sur le transport, hors de la cellule, des xénobiotiques et de leurs métabolites formés durant les phases précédentes du métabolisme. Ce transport est réalisé via des protéines transporteuse utilisant de l'Adénosine TriPhosphate (ATP) : les MRP (Multidrug Resistance Proteins) appartenant à la superfamille des transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) (Lecomte *et al.*, 2006).

2.2. Activation métabolique des composés organiques

2.2.1. Mécanismes d'induction des gènes de phase I et de phase II par les composés organiques

Comme nous l'avons vu précédemment, différents composés organiques peuvent entrer dans la composition des particules atmosphériques, tels que les HAP, PCDD, PCDF et les PCB. Ces composés ont la particularité d'être des substrats mais également des inducteurs de quelques enzymes de la phase I et de la phase II du métabolisme (Wessel, 2010) à l'exception des PCDF et PCDD dont la majorité est résistante à la biodégradation et s'accumule dans le foie et les tissus adipeux. Ces derniers peuvent quand même induire l'expression des enzymes du métabolisme qui activent d'autres composés comme les œstrogènes endogènes, dont le métabolisme accru par les CYP450 induits conduit à la formation des dérivés catéchols qui pourraient contribuer à l'effet cancérogène (INERIS, 2005). L'induction de l'expression des CYP450 et des enzymes de détoxification de phase II par les composés organiques s'effectue par 2 mécanismes (Prochaska, 1985).

- **1er mécanisme :** cette induction est régulée par le Aryl hydrocarbon Receptor (AhR), un facteur de transcription, qui est spécifique des composés aromatiques plans. En l'absence de ligand, AhR est présent dans le cytosol sous la forme d'un complexe avec 2 protéines Hsp 90 (Heat shock protein 90), la protéine AIP-XAP2 (immunophilin-like protein

hepatitis B virus X-associated protein 2) et la cochaperone p23 (Haarmann-Stemmann et al., 2007) comme représenté dans la Figure I-13.

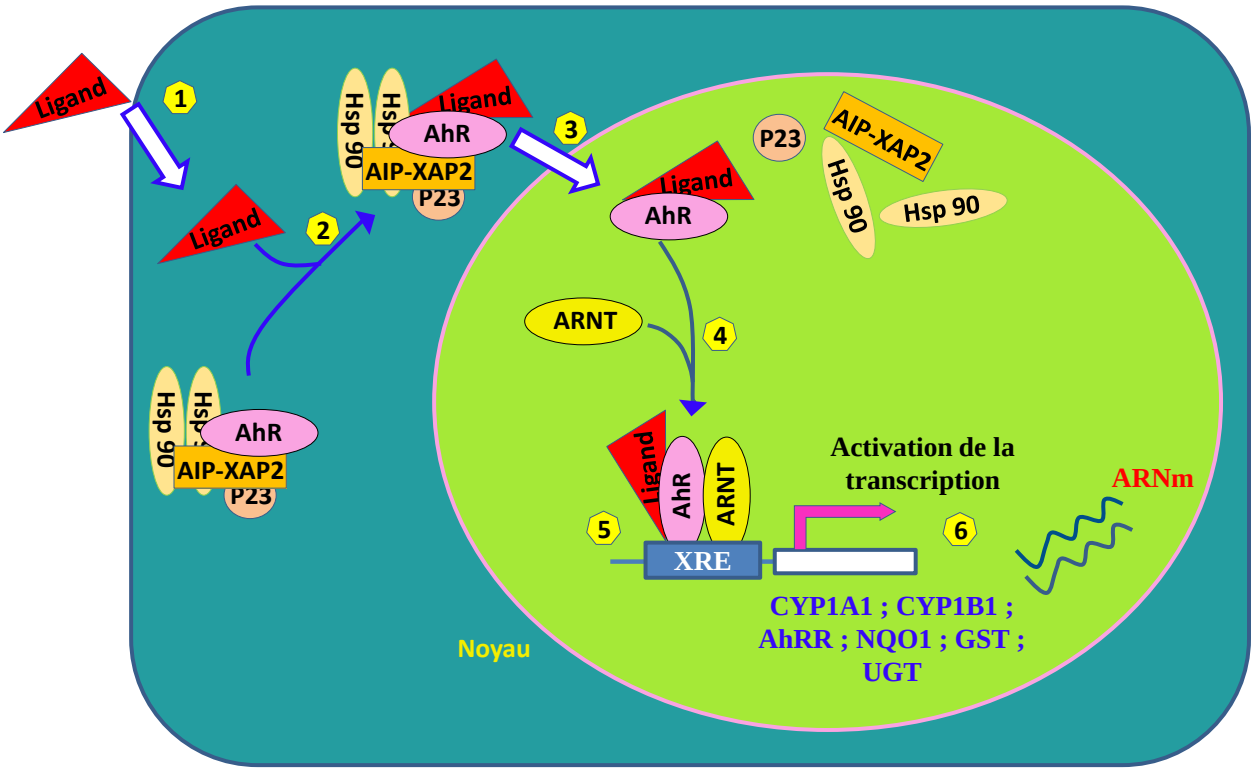


Figure I-13 : Schéma simplifié de l'induction des gènes de la phase I et II du métabolisme et du répresseur AhRR par les composés organiques.
(1) Pénétration du ligand (HAP, PCDD, PCDF ou PCB) dans la cellule ; (2) Liaison du ligand au complexe AhR/protéines associées ; (3)Translocation du complexe ligand/AhR/protéines associées dans le noyau et dissociation ; (4) Dimérisation du AhR avec l'ARNt ; (5) Fixation du complexe AhR/ARNT au niveau d'un élément de réponse aux xénobiotiques XRE ; (6) Transcription des gènes activés par la voie AhR.

Les composés organiques se lient directement à l'AhR. Le complexe AhR et les protéines associées pénètrent alors dans le noyau, où les protéines fixées se dissocient et l'AhR se dimérise avec sa molécule partenaire, ARNT (AhR Nuclear Translocator). Le complexe AhR/ARNT active l'expression d'une batterie de gènes contenant un élément de réponse aux xénobiotiques (XRE, Xenobiotic Responsive Element) dans leur région promotrice tels que les *CYP1A1*, *CYP1B1*, NQO1, AhRR (represseur d'AhR), GST et UGT (Mimura *et al.*, 2003 ; Mimura *et al.*, 1999) (Figure I-13).

AhRR, dont l'expression est controlée par AhR, est capable de contrôler l'activité d'AhR par un rétrocontrôle négatif. AhRR se fixe sur ARNT à la place d'AhR. Le complexe AhRR/ARNT ainsi formé entre en compétition avec le complexe AhR/ARNT pour la

fixation sur les régions XRE des gènes régulés par AhR (Mimura *et al.*, 1999). Des études récentes ont montrées que la compétition entre AhR et AhRR pour la fixation sur XRE n'est pas le seul mécanisme de répression mis en jeu (Evans *et al.*, 2008 ; Haarmann-Stemmann *et al.*, 2007 ; Mathews *et al.*, 2013) et des études supplémentaires sont nécessaires pour élucider ce mécanisme.

- **2ème mécanisme :** les métabolites électrophiles des HAP sont capables d'activer les éléments de réponse aux antioxydants (ARE, Antioxidant Responsive Element) localisés dans les régions promotrices des gènes des enzymes de phase II.

  Il est admis que ces enzymes faisant partie de la batterie des gènes régulés par le récepteur AhR sont reliées à une 2ème batterie : celle du gène NF-E2-related factor 2 (Nrf2). Les métabolites électrophiles (tels que les HAP *o*-quinones) stimulent la protéine cytosolique KEAP1, aboutissant à l'activation et la libération du facteur de transcription Nrf2 du complexe KEAP1-Nrf2. Dans le noyau, le Nrf2 activé forme un complexe avec les protéines Mafs, induisant par la suite la batterie des gènes ayant ARE dans leurs séquences promotrices tels que les gènes de phase II du métabolisme (NQO1, GST, UGT) (Figure I-14) (Miao *et al.*, 2005).

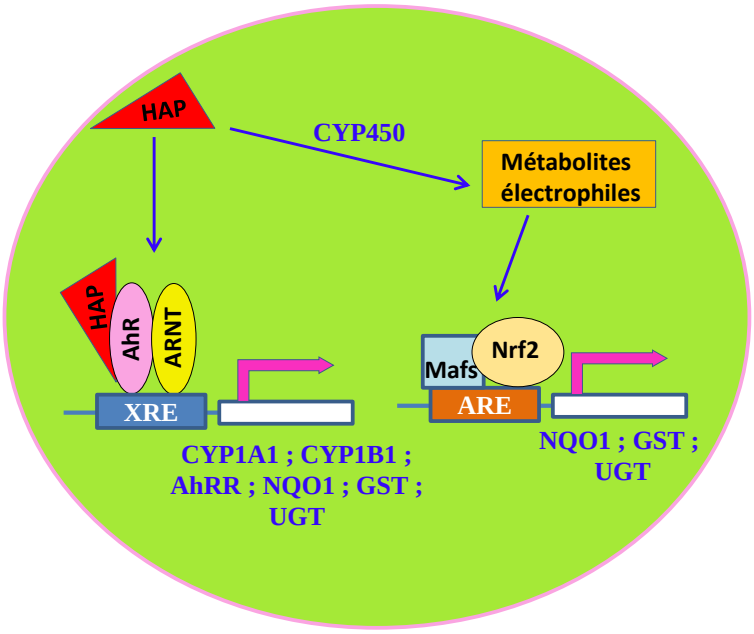


Figure I-14 : Induction des gènes de phase I et de phase II du métabolisme via les voies de signalisation AhR et Nrf2.

2.2.2. Biotransformation des HAP

Il existe 3 voies principales de biotransformation des HAP qui sont résumées dans la Figure I-15. Dans ce paragraphe nous allons donner l'exemple du B[a]P dont le métabolisme est très bien élucidé.

2.2.2.a. Voie des diol-époxydes

Cette voie est considérée comme majoritaire et consiste en l'oxydation du B[a]P, catalysée par les CYP450, menant à des époxydes très instables (Jacob et Grimmer, 1996). Trois époxydes sont formés majoritairement : le 4,5-, 7,8- et le 9,10-époxydes. Ces derniers peuvent ensuite être rapidement hydrolysés par l'action de l'Epoxyde Hydrolase (EH) pour former les *trans*-dihydrodiols correspondants (avec différentes configurations isomériques) (Borgen *et al.*, 1973) ou être réarrangés en phénols (le cas des 4,5- et le 9,10-époxydes) (Jiang *et al.*, 2007). Les phénols produits vont être ensuite auto-oxydés en quinones (Cooper *et al.*, 1983) (Figure I-15).

Le 7,8-dihydrodiol est quant à lui considéré comme le dihydrodiol majoritaire. Il subit une seconde oxydation sur les carbones C9 et C10 par les CYP450 pour générer le B[a]P-7,8-Diol-Epoxyde (BPDE), extrêmement réactif vis-à-vis de l'ADN et considéré comme le carcinogène ultime du B[a]P. Le BPDE peut ensuite être hydrolysé en tétraols inactifs (Xue et Warshawsky, 2005), ou conduire à des dommages à l'ADN par la formation d'adduits à l'ADN (Chen *et al.*, 1996), ou par le biais du stress oxydant (Douki *et al.*, 2008) (Figure I-15).

2.2.2.b. Voie des o-quinones

Les premières étapes de formation des *o*-quinones sont communes à celles de la voie des diol-époxydes, jusqu'à l'obtention du 7,8-dihydrodiol. Les enzymes du CYP450 et l'EH sont donc impliquées dans cette voie de biotransformation. En effet, la Dihydrodiol Déshydrogénase (DD), appartenant à la superfamille des Aldo-Kéto Réductases (AKR), entre en compétition avec le CYP450, afin de catalyser l'oxydation $NADP^+$ dépendante des différentes configurations du 7,8-dihydrodiol en catéchols (Penning *et al.*, 1996). Le catéchol étant lui-même instable, il est transformé en *o*-quinone par deux oxydations successives à un électron ; la première oxydation menant à la formation d'un radical semi-quinone, et la seconde à la *o*-quinone (Figure I-15). Les quinones ainsi formées peuvent être retransformées en catéchol, via une réduction non

enzymatique à deux électrons, ou en radical semi-quinone via une réduction enzymatique à un électron (Penning *et al.,* 1998), catalysée par des réductases.

2.2.2.c. Voie du radical cation

La troisième voie principale impliquée dans la biotransformation des HAP est la voie du radical cation, également appelée voie du carbocation, qui a été décrite chez les vertébrés supérieurs en 1985 (Cavalieri et Rogan, 1985). Lors de cette voie, le carbone le plus électrophile de l'HAP, le C6 dans le cas du B[a]P, subit une oxydation à un électron. Cette réaction, catalysée par des peroxydases dépendantes du CYP450, entraîne la formation du radical cation activé (Penning *et al.,* 1998). L'HAP activé va être transformé en phénol correspondant (6-OH-BaP), qui par auto-oxydation va former les quinones 1,6 ; 3,6 ; ou 6,12 (Harvey, 1991). Les quinones ainsi formées peuvent subir des réactions d'oxydoréduction afin d'être transformées en semi-quinones, qui peuvent être retransformées en quinones (Kim *et al.,* 2000) (Figure I-15).

Par la suite, les métabolites du B[a]P issus de ces 3 voies de biotransformation vont subir des réactions de phase II afin de fournir des molécules plus hydrophiles et donc plus facilement éliminer dans les urines (Figure I-15) :

- Les UGT catalysent la conjugaison des dihydrodiols, des phénols et des diphénols avec l'acide glucuronique. De plus, les quinones formées par oxydation des phénols peuvent subir une réduction pour former les diphénols correspondants, qui peuvent être conjugués à l'acide glucuronique afin d'être excrétés (Bock *et al.,* 1999).
- D'autre part, les époxydes, ainsi que les diol-époxydes issus de la transformation des HAP, sont donc des substrats préférentiels pour les GST (Jernström *et al.,* 1996).
- De plus, les ST catalysent la conjugaison des phénols, dihydrodiols et hydroquinones au sulfate (Glatt, 2000).
- Finalement, la NQO1 catalyse la réduction à 2 électrons des quinones et *o*-quinones en hydroquinones inactives (Ross et Siegel, 2004).

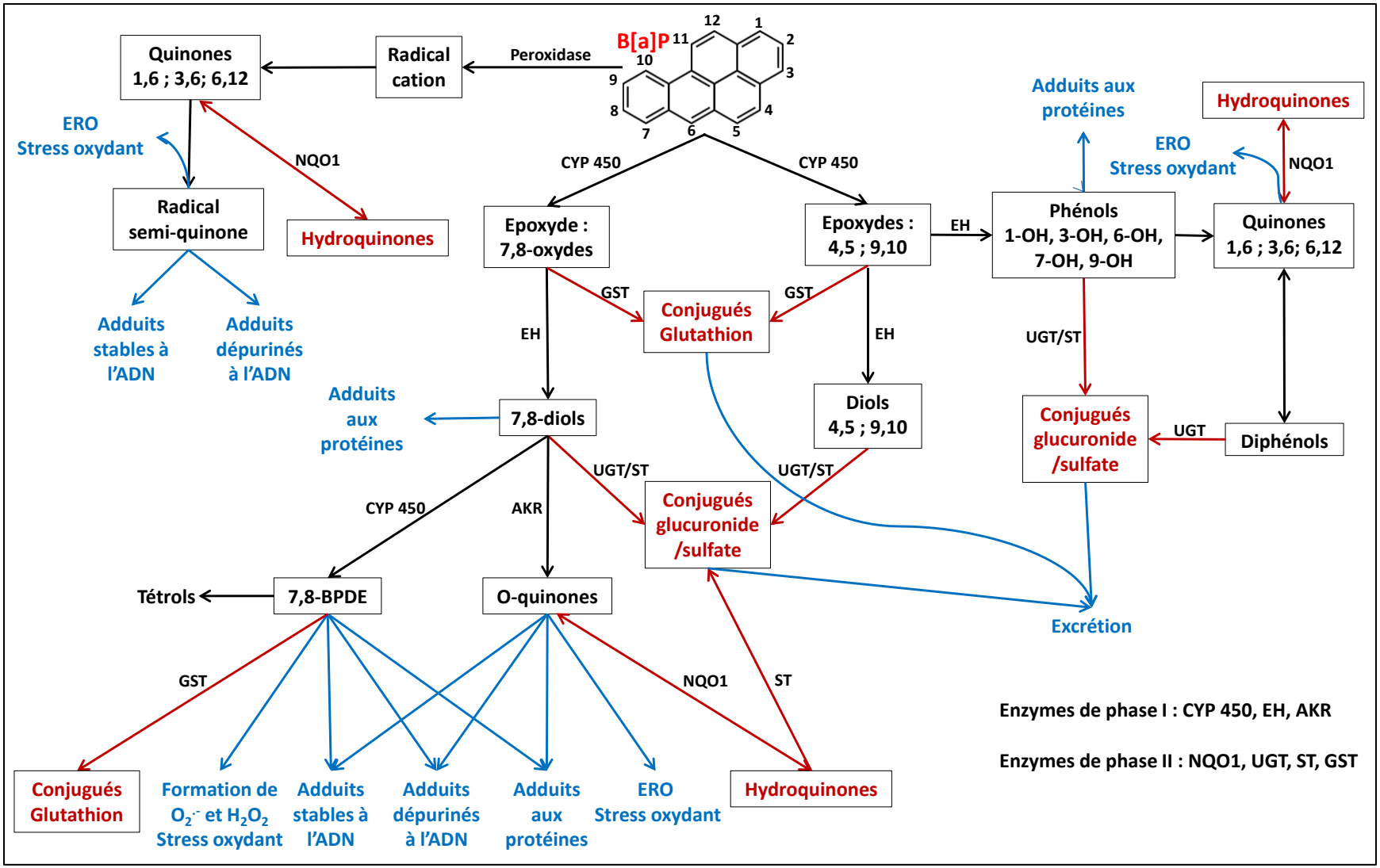


Figure I-15 : Schéma d'activation métabolique du B[a]P.
CYP450 : Cytochrome P450 ; EH : Epoxyde hydrolase ; AKR : Aldo-keto reductase ; NQO1 : NAD(P)H-quinone oxydoréductase 1 ; UGT : UDP-glucuronosyl-transférase ; ST : Sulfo-transférase ; GST : Glutathion-S-transférase (adapté de Wessel, 2010).

2.2.3. Biotransformation des PCB

La biotransformation des PCB se réalise par l'intermédiaire des CYP (1A1, 1A2, 2B1, 2B2, 3A) et conduit à la formation des époxydes qui sont ensuite principalement transformés en composés phénoliques ou en dihydrodiols. Les époxydes sont capables de réagir avec les acides nucléiques ou les protéines et former des adduits et donc sont impliqués dans la survenue de nécrose cellulaire, de mutagénicité et de cancérogénicité. D'autre part, le métabolisme des PCB peut donner naissance à des quinones capables de réagir sur les sites nucléophiles des protéines ou de l'ADN (INERIS, 2005). D'une façon générale, plus le degré de chloration des PCB augmente, plus le taux de métabolisation diminue et plus l'accumulation dans les tissus surtout adipeux augmente (INERIS, 2005).

2.2.4. Biotransformation des PCDD et PCDF

Les PCDD et PCDF sont des substances très lipophiles, résistent beaucoup à la métabolisation et leur distribution dans l'organisme se fait en fonction de la teneur en graisse des différents tissus. Chez l'Homme, la métabolisation de la 2,3,7,8-TCDD par les CYP450 n'est sans doute pas importante aux concentrations habituellement rencontrées et c'est la teneur en lipides des tissus qui détermine sa répartition. Leur métabolisme conduit à la substitution du chlore par des groupements OH et à la formation du dichlorocatéchol pour la 2,3,7,8-TCDD. L'analyse toxicocinétique des données humaines indique que la demi-vie d'élimination est d'environ 8,5 ans pour les cohortes professionnelles et de 15,5 ans pour la population générale (INERIS, 2005).

Les mécanismes d'activation métabolique des composés organiques décrits ci-dessus ainsi que la possibilité de l'induction d'un stress oxydant par les métaux présents dans les PM, peuvent être à l'origine d'espèces réactives qui sont capables d'interagir avec différentes macromolécules cellulaires. Ces interactions sont susceptibles de conduire, de manière directe ou indirecte à des lésions du génome, qualifiées alors de lésions génotoxiques.

Les sous-chapitres suivants seront consacrés à la description de différents mécanismes potentiellement impliqués dans les étapes d'initiation ou de promotion de la cancérogenèse qui sont la génotoxicité (la phosphorylation du variant H2AX de l'histone H2A suite aux cassures de l'ADN et l'activité télomérase) et les modifications épigénétiques (microARNs).

3. Phosphorylation de H2A-X : réponse cellulaire aux dommages à l'ADN

3.1. Les protéines histones

Les histones sont des petites protéines de 11 à 14 kDa riches en acides aminés basiques et sont les principaux constituants protéiques de la chromatine. Cinq classes de protéines histones ont été déterminées : les histones des classes H3, H4, H2A et H2B nommées « histones de cœur » et les histones de la classe H1 ou « histone de liaison ».

Chacune des classes des « histones de cœur », sauf H4, comprend plusieurs formes protéiques appelées «variants d'histones» qui ont des homologies de séquences variables et sont codées par des gènes différents (Franklin et Zweidler, 1977). Schématiquement, il existe deux types de variants d'histones : les histones majeures et les histones de remplacement. On appelle histones majeures les histones dont l'expression est augmentée au cours de la phase S (synthèse d'ADN) du cycle cellulaire, afin de répondre au besoin massif en histones nécessaires à l'assemblage en chromatine de l'ADN en cours de réplication. Par contre, les histones de remplacement, minoritairement représentées, sont exprimées en dehors de la phase S et peuvent être incorporées dans la chromatine indépendamment de la synthèse d'ADN (Wu *et al.*, 1982).

Concernant l'histone H2A, six variants ont été décrits, parmi lesquels H2A-X est un variant de remplacement qui est incorporé de façon aléatoire dans le génome et phosphorylé en réponse aux cassures double-brin de l'ADN, et semble jouer un rôle important dans le processus de réparation de ces lésions.

3.2. γH2AX : réponse précoce aux cassures double-brin de l'ADN

3.2.1. Cassures double-brin de l'ADN

La stabilité génomique est d'importance primordiale pour la survie et le fonctionnement correct de tout organisme. Le matériel génétique des cellules peut subir une grande variété de lésions causées par des sources exogènes et/ou endogènes. Les cassures double-brin de l'ADN (Double strand DNA breaks, DSB) constituent la forme la plus grave des dommages de l'ADN dans les cellules eucaryotes (Bassing et Alt, 2004 ; Khanna et Jackson, 2001) car les deux brins de la double hélice sont endommagés, ce qui empêche l'utilisation du brin complémentaire

comme matrice pour la réparation et donc, ces cassures menacent directement l'intégrité génétique. Les DSBs peuvent être provoqués par des facteurs endogènes tels que les stress mécaniques (McClintock, 1941), les transpositions (Engels *et al.*, 1990), la méiose responsable de la génération de la diversité génétique (Keeney et Neale, 2006), la réplication de l'ADN, ainsi que les espèces réactives du métabolisme cellulaire (ERO ; Espèces Réactives de l'Oxygène), ou peuvent également être le résultat de l'action directe ou indirecte d'agents exogènes, comme les radiations ultraviolettes émises par le soleil, les radiations ionisantes et des substances chimiques génotoxiques.

Tous les eucaryotes ont développé plusieurs mécanismes pour faire face aux cassures double-brin de l'ADN, ce qui montre l'importance et la difficulté de leur réparation. Ces systèmes entrainent la participation d'une quantité imposante de protéines qui fonctionnent dans un réseau de signalisation impliqué dans la reconnaissance du dommage, l'arrêt du cycle cellulaire et l'activation des voies de réparation.

La réponse cellulaire à une DSB peut survenir à différentes phases du cycle cellulaire et quand la cellule subit un nombre important de dommages, plusieurs voies de signalisation peuvent se chevaucher ; ces circonstances peuvent conduire à la mort cellulaire pour éviter la propagation d'une cellule avec un génome hautement instable (Su, 2006). Cela rend la réponse cellulaire aux DSBs extrêmement critique, puisque si les mécanismes de réparation ne sont pas efficaces, l'alternative pour la cellule à la mort cellulaire peut être la carcinogenèse ou d'autres effets biologiques délétères (Jeggo et Löbrich, 2007 ; McKinnon et Caldecott, 2007).

3.2.2. Phosphorylation de H2AX (γH2AX)

La phosphorylation du variant H2A-X (γH2AX ou p-H2AX) est sans doute la modification la plus caractérisée qui est induite par les dommages à l'ADN (Pilch *et al.*, 2003 ; Rogakou *et al.*, 1998). Elle s'effectue sur la serine 139 (Ser139) de l'extrémité Carboxy-terminale (C-terminale) de H2AX. La modification est réalisée par les kinases appartenant à la famille des Phosphatydil-Inositol-3-Kinase related Kinase (PIKKs) : Ataxia Telangiectasia Mutated protein (ATM), ATM and Rad3-related protein (ATR) et, dans quelque cas particulier, par la DNA-dependant Protein Kinase - catalytic subunit (DNAPKcs) (Stucki et Jackson, 2006).

ATM se trouve dans la cellule sous forme de dimères et d'oligomères qui sont inactifs. Après l'induction des dommages à l'ADN, les formes inactives deviennent des monomères qui s'auto-phosphorylent sur la Ser1981 (Bakkenist et Kastan, 2003). Il a été montré *in vitro* que la monomérisation d'ATM est réalisée par l'action du complexe MRN (MRE11-RAD50-NBS1) qui est composé par les protéines MRE11 (Meiotic REcombination protein 11), RAD50 et NBS1 (Nijmegen Breakage Syndrome protein) (Lee et Paull, 2005). De plus, selon la concentration de DSBs, l'autophosphorylation d'ATM nécessite, *in vitro*, de l'interaction avec NBS1 (Dupre *et al.,* 2006). Ainsi le deuxième rôle de MRN pourrait être de promouvoir l'activité kinase d'ATM à travers l'interaction d'ATM avec NBS1. Toutefois, à hautes concentrations de DSBs, ATM peut se transformer en monomère même en absence du complexe MRN.

Après autophosphorylation, ATM phosphoryle plusieurs protéines impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN. H2AX est une des cibles immédiates des PIKKs. L'histone γH2AX ainsi formée est responsable de l'assemblage des complexes multi-protéiques dans des foyers nucléaires (Paull *et al.,* 2000). La phosphorylation de la Ser139 a lieu dans l'espace de quelques minutes après l'induction de la DSB (Rogakou *et al.,* 1998) et γH2AX ne se distribue pas de façon homogène dans le noyau, mais elle forme des foyers (IRIF, Ionizing Radiation Induced Foci) dont le nombre, dans les cellules de mammifères, correspond au nombre des DSBs.

Ensuite, γH2AX recrute la protéine MDC1 (Mediator of DNA Damage Checkpoint protein 1) constitutivement phosphorylée, qui est indispensable pour la formation des IRIF (Stewart *et al.,* 2003). MDC1 interagit directement et spécifiquement avec γH2AX à travers son domaine BRCT (Stucki *et al.,* 2005). Les données les plus récentes suggèrent que MRN est recruté sur γH2AX *via* l'interaction entre MDC1 et NBS1 (Spycher *et al.,* 2008) (Figure I-16). Ainsi, l'extension des protéines de la réparation sur la chromatine, pourrait venir du recrutement séquentiel sur γH2AX de MDC1, MRN et ATM, qui par la suite génèrent d'autre γH2AX en position distale à la lésion et un recrutement ultérieur des mêmes et d'autres facteurs.

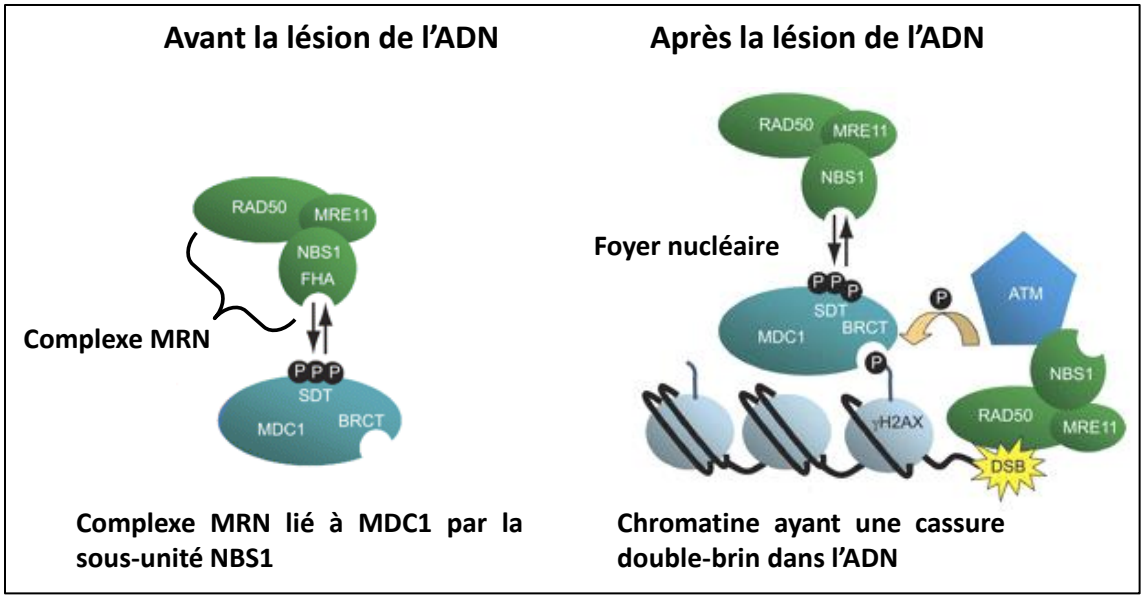


Figure I-16 : Modèle représentant le mécanisme d'interaction entre MDC1 et le complexe MRN avant et après la cassure double-brin de l'ADN (d'après Spycher *et al.*, 2008).

3.3. Effets des PM

La détection de γH2AX a été largement utilisée pour étudier le stress génotoxique et la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN après une exposition à des agents environnementaux (Smart *et al.*, 2011). Une augmentation des niveaux de γH2AX a été observée dans des études *in vitro* après exposition des cellules à des composés endommageant l'ADN, comme la fumée de cigarette (Albino *et al.*, 2004), le dinitrobenzo[e]pyrène (Kawanishi *et al.*, 2009), les métaux lourds (Peterson-Roth *et al.*, 2005), les HAP (Toyooka et Ibuki, 2006 ; Mattsson *et al.*, 2009) et les nitro-HAP (2- et 3-nitrobenzanthrone) (Oya *et al.*, 2011).

Concernant l'effet des PM sur l'induction de la phosphorylation de H2AX suite à l'apparition de cassures au niveau de l'ADN, très peu d'études figurent dans la littérature. Une étude réalisée par Sanchez-Perez et collaborateurs sur des cellules A549 a montré, après exposition aux PM_{10}, une phosphorylation de H2AX suite à la formation des DSB au niveau de l'ADN. L'utilisation d'un antioxydant a mis en évidence le rôle des ERO en tant que médiateur de la génotoxicité induite par les PM_{10}, ce qui pourrait fournir un environnement adéquat pour le développement du cancer pulmonaire (Sánchez-Pérez *et al.*, 2009). Une autre étude a été réalisée et a montré également une phosphorylation de H2AX dans des cellules BEAS-2B exposées aux

$PM_{2,5}$ collectées en Milan (Italie) suite à l'apparition de cassures au niveau de l'ADN (Gualtieri *et al.*, 2011).

D'autre part, γH2AX a également été observée dans les lésions pré-cancéreuses chez l'Homme (Gorgoulis *et al.*, 2005), et dans une grande variété de tumeurs, y compris le mélanome (Warters *et al.*, 2005), le carcinome du colon, l'ostéosarcome, le fibrosarcome (Sedelnikova et Bonner, 2006) et le cancer du col utérin (Banáth *et al.*, 2004). Ainsi, en plus de servir de marqueur spécifique des effets génotoxiques, γH2AX pourrait être utilisée pour le dépistage précoce du cancer car elle est impliquée dans les voies de l'apoptose et de la sénescence (Gire *et al.*, 2004).

4. Télomères et télomérases

4.1. Les télomères

4.1.1. Définition et structure

A l'inverse des procaryotes, les chromosomes des eucaryotes sont linéaires et possèdent des télomères à leurs extrémités. Ces télomères constituent des complexes nucléoprotéiques qui coiffent les extrémités naturelles des chromosomes (de Lange, 2002) et empêchent que ces extrémités soient reconnues comme des cassures par les systèmes de réparation des dommages de l'ADN. Donc, les télomères ont pour rôle de protéger les séquences géniques situées en amont, vis-à-vis des phénomènes de dégradation et des événements de recombinaisons inappropriées, empêchant ainsi la perte de l'information génétique. En plus de cette fonction de protection, ils participent également à l'organisation nucléaire et à la bonne ségrégation des chromosomes.

4.1.1.a. L'ADN télomérique

Dans les cellules humaines, les télomères sont composés de séquences répétitives d'ADN double brin (5′-TTAGGG-3′) de 5 à 15 kb et d'une extrémité 3' simple brin d'environ 200 à 300 bases (Wright *et al.*, 1997). Dans tous les organismes étudiés, le brin riche en guanines, correspondant à l'extrémité 3', est plus long que le brin complémentaire riche en cytosines (Figure I-17). L'analyse de l'ADN télomérique chez différentes espèces montre que le motif télomérique est relativement bien conservé (Zakian, 1995). Quant au nombre des répétitions

télomériques, il varie selon les espèces, selon les individus et même entre les différents chromosomes d'une même cellule.

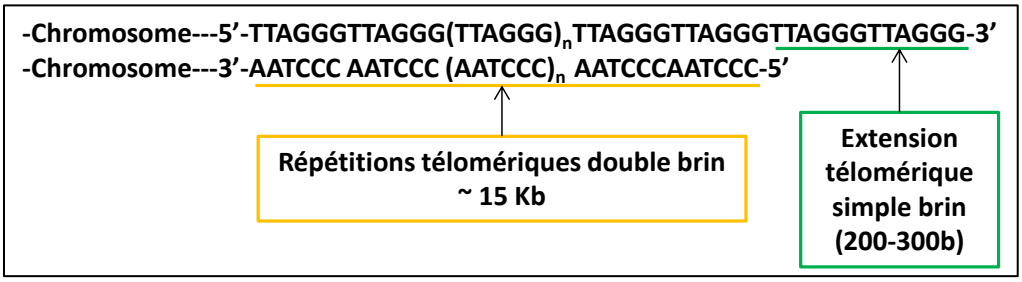


Figure I-17 : Structure primaire de l'ADN télomérique humain.

4.1.1.b. Les protéines télomériques : le complexe shelterin

Un grand nombre de protéines sont associées aux télomères. Parmi celles-ci, six protéines appartiennent au complexe shelterin qui compose « la coiffe » télomérique et possède un rôle crucial dans la régulation de la taille des télomères (Smogorzewska et de Lange, 2004). Ce complexe permet aussi à la cellule de faire la distinction entre les cassures double brin de l'ADN et les extrémités naturelles des chromosomes. En effet, un télomère dépourvu de son complexe protéique est reconnu par la machinerie cellulaire comme des cassures double brin, ce qui permet le déclenchement des voies de détection de dommages à l'ADN et l'activation des kinases des points de contrôle du cycle cellulaire.

4.1.2. Le problème de la réplication terminale

Lors de la réplication de l'ADN, la synthèse du brin néoformé s'effectue toujours dans le sens 5'-3' (Figure I-18) ; la situation est donc différente sur les deux brins. Sur l'un, la fourche avance de 5' vers 3' et donc le brin peut être synthétisée directement en suivant la progression de la fourche : c'est la synthèse du brin précoce. Sur l'autre brin, par contre, la fourche avance de 3' vers 5', donc il faut attendre que la fourche se soit ouverte pour permettre la synthèse en direction opposée à la progression de l'hélicase. La chaîne tardive est donc synthétisée de façon discontinue sous forme de fragments appelés fragments d'Okazaki, dont la longueur est environ de 100 nucléotides chez les eucaryotes. Une amorce d'ARN est nécessaire pour le début de chaque fragment. Ces amorces sont ensuite excisées et remplacées par de l'ADN. En effet, du côté 5' de chaque brin néoformé, l'ADN a été synthétisé à partir d'une amorce d'ARN, mais une fois cette amorce excisée, il n'y a pas de fragment plus tardif en amont permettant de combler la

lacune. Ce nouveau brin est par conséquent plus court (du côté 5') que son modèle du côté 3'. Comme il sert lui-même de modèle à la génération suivante, sa double hélice fille sera plus courte (Figure I-18). En se répétant à chaque division cellulaire, ceci entraine un raccourcissement progressif des télomères dans les cellules somatiques normales, jusqu'à une taille critique déclenchant un phénomène de sénescence et/ou d'apoptose (Harley *et al.*, 1990). Cependant, il existe l'enzyme télomérase, activée dans certains cas, qui vient allonger le brin parental de son côté 3' en ajoutant, comme une ADN polymérase, des nucléotides du 5' vers le 3', mais sans brin matrice : la télomérase possède elle-même une matrice d'ARN qui lui sert de modèle pour synthétiser cette séquence.

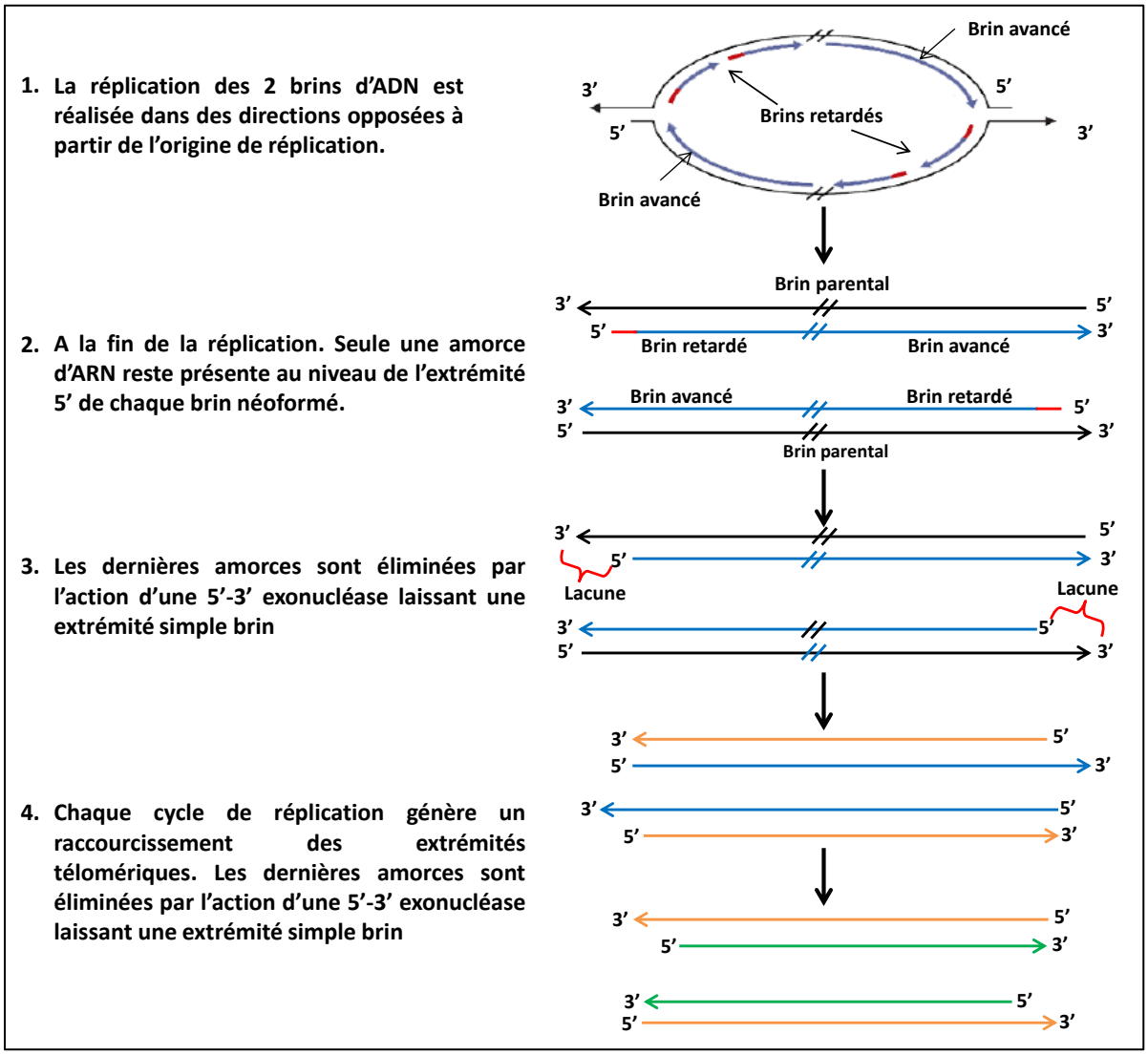


Figure I-18 : Le problème de la réplication terminale (adaptée de Lemarteleur, 2005).

4.2. Les témolmérases

4.2.1. Structure de la télomérase

La télomérase est un complexe ribonucléoprotéique constitué d'une sous-unité protéique à activité transcriptase inverse, hTERT (human TElomerase Reverse Transcriptase), d'une sous-unité nucléique ARN matrice, hTR (human Telomerase RNA component) et de protéines associées.

4.2.1.a. La sous-unité hTR

L'activité catalytique de la télomérase est dépendante d'un ARN appelé hTR. Contrairement à hTERT, hTR est exprimée de façon quasi-ubiquitaire dans les cellules qui possèdent ou non une activité télomérasique (Feng *et al.*, 1995). Codé par un gène situé en 3q26 (Soder *et al.*, 1997), il est constitué d'une séquence primaire de 451 nucléotides non-polyadénylés et comprend une séquence de 11 nucléotides (5'-CUAACCCUAAC-3') complémentaire de l'extrémité 3'simple brin des télomères, servant de matrice lors de la synthèse de répétitions télomériques TTAGGG (Feng *et al.*, 1995).

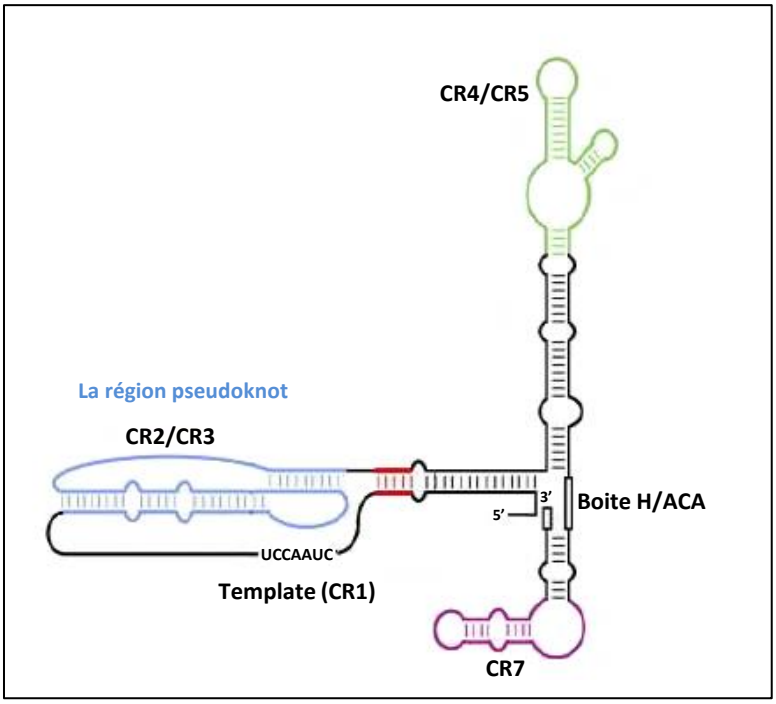


Figure I-19 : Structure secondaire d'hTR (d'après Legassie et Jarstfer, 2006).

Bien que la séquence primaire de la TR (telomerase RNA) présente peu d'homologies entre les différentes espèces, la structure secondaire est paradoxalement bien conservée chez les vertébrés (Chen *et al.,* 2000). L'étude prédictive de la structure secondaire de cette sous-unité ribonucléique (Figure I-19) a permis de mettre en évidence plusieurs régions conservées, CR1 à CR8 (Conserved Region). Ces motifs conservés seraient impliqués dans diverses fonctions comme sa stabilisation, son accumulation, sa localisation cellulaire ainsi que son assemblage avec d'autres constituants (Chen *et al.,* 2000). La région CR1, proche de l'extrémité 5', contient la séquence dite « matricielle », le domaine pseudoknot incluant les régions CR2-3 et le domaine CR4-5 formé d'une structure en tige et boucle qui permet une interaction avec la sous-unité catalytique hTERT. hTR possède également un domaine CR7 et un motif de type H/ACA (CR6 et CR8) qui semble être important pour son accumulation, pour l'activité catalytique *in vivo* et la processivité de la télomérase (Mitchell *et al.,* 1999a ; Mitchell et Collins, 2000). Il semblerait qu'en dehors de la séquence matrice, seuls les domaines « pseudoknot » et CR4-5 sont indispensables à la reconstitution d'une télomérase catalytiquement active *in vitro* (Ly *et al.,* 2003) (Figure I-19).

4.2.1.b. La sous-unité hTERT

hTERT est une ADN polymérase appartenant à la famille des transcriptases inverses (Cech et Lingner, 1997). Le gène hTERT, localisé en 5p15.33 est constitué de 16 exons codants une protéine de 1132 acides aminés (127 kDa) (Meyerson *et al.,* 1997 ; Wick *et al.,* 1999). L'analyse *in silico* de la séquence de TERT a permis d'identifier 7 domaines très conservés (1, 2, A, B', C, D et E) caractéristiques des transcriptases inverses (Lingner *et al.,* 1997). hTERT possède également des motifs (GQ, CP, QFP, et T) spécifiques de la télomérase (Kelleher *et al.,* 2002) ainsi qu'une courte région C-terminale (Figure I-20).

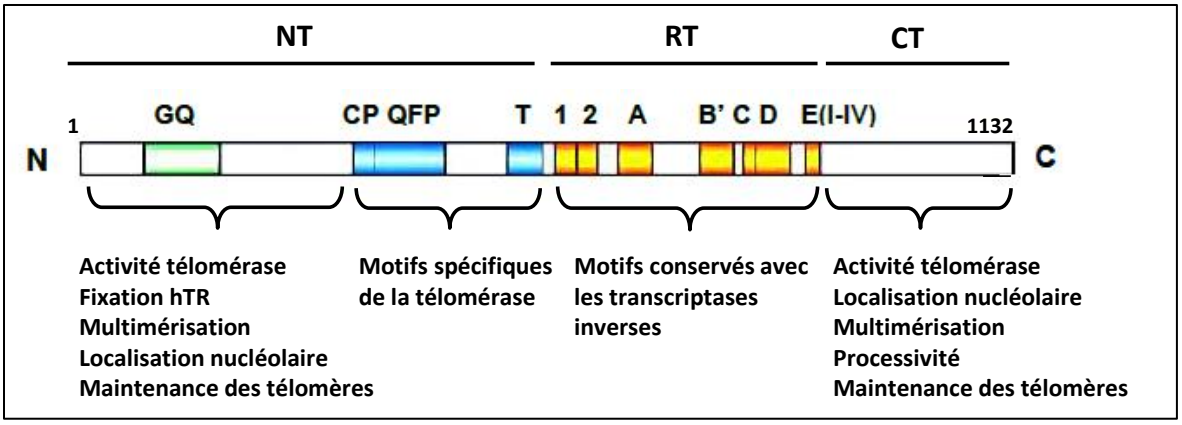


Figure I-20 : Représentation schématique de la structure de la protéine hTERT.
NT : N-terminal, RT : Reverse Transcriptase, CT : C-terminal. 1, 2, A, B', C, D, et E (I à IV) : domaines caractéristiques des protéines à activité transcriptase inverse. GQ, CP, QFP, et T : motifs spécifiques de la télomérase (adaptée de Samy, 2011).

4.2.2. Mécanismes de régulation de la télomérase

Contrairement à hTR qui est exprimée de façon constitutive, hTERT est soumise à une régulation très précise au cours de la vie cellulaire notamment durant l'embryogenèse ou lors de la différenciation.

4.2.2.a. Régulation d'hTERT

Cette régulation peut s'exercer à différents niveaux : transcriptionnel, post-transcriptionnel par épissage alternatif (Kilian *et al.,* 1997 ; Ulaner *et al.,* 2000), post-traductionnel (Rohde *et al.,* 2000; Ulaner *et al.,* 2000) et épigénétique par méthylation de l'ADN (Lopatina *et al.,* 2003; Shin *et al.,* 2003) ou modification des histones (Doetzlhofer *et al.,* 1999 ; Takakura *et al.,* 2001).

La télomérase est fortement exprimée dans les cellules germinales et les cellules souches ainsi qu'au cours de certaines étapes précoces du développement embryonnaire. A contrario, la télomérase est réprimée dans la majorité des cellules somatiques normales mais elle est réactivée dans environ 90% des cancers (Kim *et al.,* 1994). Cette réactivation de la télomérase est en grande partie la conséquence de la réexpression du gène d'hTERT. Pendant que la composante ARN « hTR » est exprimée de façon constitutive et ubiquitaire (Soder *et al.,* 1998 ; Yi *et al.,* 1999), hTERT semble être le facteur limitant et déterminant pour l'activité télomérase. La corrélation entre l'ARNm de hTERT et l'activité télomérase suggère une régulation

transcriptionnelle du gène hTERT qui constitue le premier et principal mécanisme de régulation de l'activité télomérase (Cong *et al.,* 1999). Le clonage de la région 5' situé en amont du gène de TERT a permis de montrer que le promoteur de hTERT est inactif dans la plupart des cellules somatiques normales mais réactivé lors de l'immortalisation cellulaire (Cong *et al.,* 1999).

4.2.2.b. Régulation d'hTR

Même si hTR est exprimé de façon ubiquitaire (Feng *et al.,* 1995), il semblerait néanmoins que la quantité d'hTR soit augmentée dans les tumeurs en comparaison avec les tissus sains (Feng *et al.,* 1995 ; Soder *et al.,* 1998). De plus, l'augmentation de l'expression d'hTR dans des tumeurs qui surexpriment également hTERT suggère un phénomène de coopération entre ces deux composants dans l'augmentation de l'activité télomérase (Yi *et al.,* 1999). Ces différences observées dans l'expression de cet ARN matrice peuvent résulter entre autre d'une amplification génique (Soder *et al.,* 1997), de modifications transcriptionnelles (Yi *et al.,* 1999), post-transcriptionnelles, épigénétiques et post-traductionnelles (Cairney et Keith, 2008 ; Mitchell *et al.,* 1999a).

4.2.3. Rôles de la télomérase

4.2.3.a. L'élongation des télomères par la télomérase

La fonction la plus connue de la télomérase est le maintien de la longueur des télomères par ajout à leur extrémité de séquences TTAGGG répétées en tandem. L'immortalisation cellulaire ou la réplication à l'infinie nécessite que les télomères ne se raccourcissent pas. L'activité catalytique de la télomérase induit le rallongement de l'extrémité 3'simple brin des télomères par un mécanisme processif et contribue ainsi à l'immortalisation cellulaire.

Tout d'abord, la ribonucléoprotéine va se positionner sur l'extrémité simple brin du télomère par le biais de sa matrice hTR (a) (Figure I-21). Ensuite, la sous unité catalytique allonge le télomère en ajoutant des nucléotides sur l'extrémité 3' (b). Une étape de repositionnement de l'extrémité 3'du télomère (c) permet de réaliser un nouveau cycle d'addition de nucléotides (d) (Figure I-21).

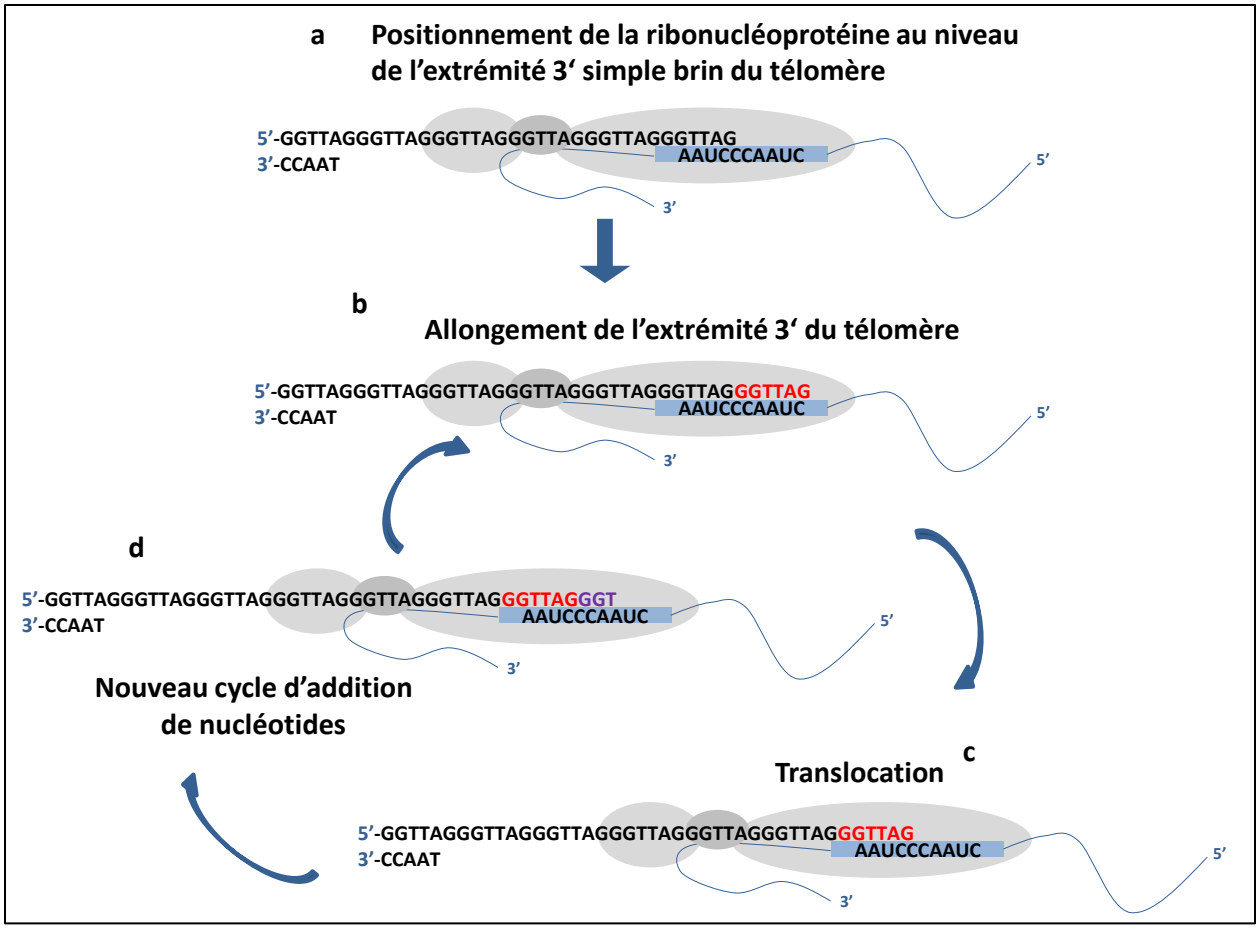


Figure I-21 : Modèle de l'élongation processive des télomères par la télomérase (adaptée de Autexier et Lue, 2006).

4.2.3.b. Rôle anti-apoptotique

L'inhibition de la télomérase, en ciblant soit hTERT soit hTR, engendre la mort cellulaire d'un grand nombre de cellules. Cette mort observée a souvent été attribuée au raccourcissement progressif des télomères ou à une augmentation des dommages à l'ADN déclenchée par des télomères déprotégés. Néanmoins, au cours de ces dernières décennies, plusieurs travaux ont apporté de nombreux arguments qui étayent la fonction anti-apoptotique de la télomérase contribuant ainsi à la tumorigenèse (une activité télomère-indépendante et indépendante de son activité transcriptase inverse).

Des études récentes, ont montré que la télomérase protège les cellules de l'apoptose en agissant précocement sur certaines voies de la signalisation ou en interagissant avec des protéines pro- ou anti-apoptotique ou en régulant de façon direct ou indirect l'expression de

gènes impliqués dans la survie et l'apoptose. En effet, la fonction extra-télomérique d'hTERT dans la tumorigenèse pourrait être la conséquence, d'une stimulation de la prolifération et de la survie cellulaire (Smith *et al.,* 2003), de la modulation du transcriptome (Smith *et al.,* 2003), de l'activation/inhibition de certaines protéines anti-/pro-apoptotique (Massard *et al.,* 2006), des interactions complexes avec certaines voies de signalisation (Cao *et al.,* 2002) ou d'une protection vis-à-vis des dommages de l'ADN (Sharma *et al.,* 2003), dépendant du type cellulaire et du contexte de l'étude.

4.3. Télomères / télomérases et cancer

Dans les cellules somatiques normales, la réplication de l'extrémité des chromosomes au cours des divisions cellulaires, entraîne inévitablement le raccourcissement progressif des télomères. Ce raccourcissement télomérique est le résultat de la réplication incomplète du brin parent à l'extrémité 3' par l'ADN polymérase conventionnelle (Olovnikov, 1973 ; Watson, 1972). De ce fait, chez les mammifères, les cellules somatiques normales prolifèrent jusqu'à une certaine limite au-delà de laquelle elles arrêtent leur croissance et rentrent en sénescence réplicative. Cette limite est appelée la limite de Hayflick (Hayflick, 1965). Les télomères ayant atteint une taille critique sont à l'origine d'un signal conduisant à l'entrée des cellules en sénescence. Cette observation est à la base de l'hypothèse « télomérique » du vieillissement et postule que le raccourcissement télomérique agirait donc comme une horloge moléculaire, contrôlant la prolifération des cellules (Harley *et al.,* 1992).

Le raccourcissement critique des télomères provoque un signal de dommages de l'ADN à l'origine de l'activation de la protéine p53 (supresseur de tumeur) (Figure I-22). Il s'en suit une induction des protéines p21 et p16 qui vont alors lever l'inhibition de la protéine du rétinoblastome induite par les kinases cyclines-dépendantes. La protéine du rétinoblastome active, va alors permettre l'arrêt des cellules en phase G1 (Growth) du cycle cellulaire (Sharpless et DePinho, 2004). Les cellules ayant inactivé p53 ou la protéine rétinoblastome continuent à se proliférer, et les télomères perdent leur fonction de protection de l'ADN et les cellules entrent dans une phase appelée crise cellulaire (Figure I-22) (Counter *et al.,* 1992; Shay *et al.,* 1993) caractérisée par une apoptose massive et une forte instabilité génétique (Karlseder *et al.,* 2002; Sharpless et DePinho, 2004). Les rares cellules qui survivent à cette crise, réactivent un des deux mécanismes du maintien des télomères aboutissant à l'immortalisation cellulaire. Dans environ

90% des cas, les cellules émergentes réactivent la télomérase alors que dans 10% des cas elles activent un autre mécanisme appelé ALT (Alternative Lenghtening of Telomeres) (Bryan *et al.*, 1995). Ce modèle en deux étapes (Figure I-22) démontre également que certaines failles dans le processus de sénescence pourraient favoriser l'émergence de cancer.

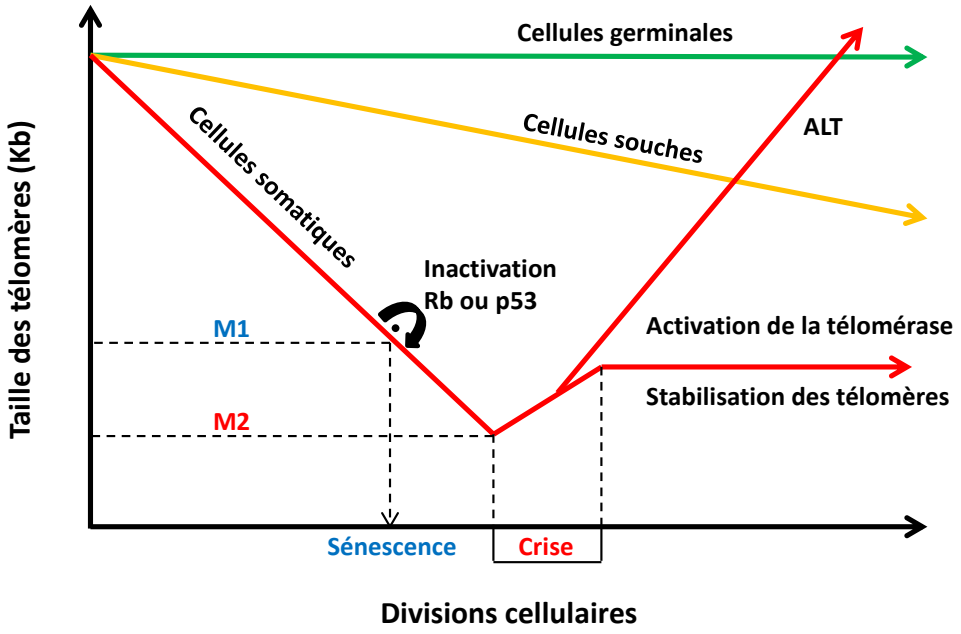


Figure I-22 : Représentation schématique de l'hypothèse télomérique du vieillissement et de l'immortalisation cellulaire.
Dans certaines cellules souches, l'expression de la télomérase serait suffisante pour ralentir le raccourcissement des télomères. La forte expression de la télomérase dans les cellules germinales permet de maintenir une taille des télomères importante (~15 kb), alors que les cellules somatiques normales dépourvues de télomérase ont des télomères qui se raccourcissent progressivement jusqu'à atteindre une taille critique (~5-7 kb) où les cellules entrent en sénescence. Cette première barrière proliférative appelée "limite de Hayflick" (ou M1) peut être surmontée par quelques cellules qui ont inactivé les protéines p53 ou Rétinoblastome (Rb). Ces rares cellules continueraient à proliférer et leurs télomères à raccourcir jusqu'à ce que la perte de leur fonction protectrice aboutisse à une forte instabilité génomique puis à la mort cellulaire de la plupart de ces cellules. Cette deuxième barrière de prolifération appelée M2 (ou crise) pourrait là encore être spontanément outrepassée par de très rares cellules ($1/10^5$ à $1/10^7$ cellules) qui réactiveraient un mécanisme de maintien des télomères comme la réexpression de hTERT ou le mécanisme ALT (adaptée de Cong *et al.*, 2002 ; Bachand et Autexier, 1999).

4.4. Effets des PM

L'effet de la pollution atmosphérique particulaire sur l'activité de la télomérase est peu documenté et les résultats sont parfois contradictoires. En effet, la modulation de l'activité télomérase a été mise en évidence lors d'une étude qui a souligné le lien entre le stress oxydant

induit par les particules et l'érosion des télomères (Grahame et Schlesinger, 2012). De plus, une étude réalisée par Büchner et collaborateurs a montré que l'exposition des cellules épithéliales pulmonaires et des cellules endothéliales vasculaires aux particules ultrafines du carbone noir ou « black carbon » a abouti à une réduction de l'activité de la télomérase. Ceci est associé au vieillissement cellulaire conduisant à l'apparition des pathologies pulmonaires et cardiovasculaires (Büchner *et al.,* 2013). D'autre part, l'exposition à court terme aux PM à Pékin (Chine) a été associée à une augmentation de la longueur des télomères dans les cellules sanguines des sujets exposés alors que l'exposition à long terme peut raccourcir les télomères après une exposition pro-oxydante prolongée (Hou *et al.,* 2012).

De plus, une association entre le tabagisme et l'activité de la télomérase dans l'épithélium bronchique normal a été mise en évidence par Yim et collaborateurs. Cette augmentation de l'activité de la télomérase pourrait prolonger la durée de vie des cellules et contribuer ainsi à la carcinogenèse pulmonaire (Yim *et al.,* 2007). D'autre part, concernant certains éléments pris isolément, le cadmium semble induire une augmentation de l'activité télomérase dans les hépatocytes de rat (Dai *et al.,* 2010). Il faut signaler aussi que la télomérase a été activée dans différents types de cancer, (Engelhardt *et al.,* 1997 ; Hiyama *et al.,* 1996 ; Mekhail *et al.,* 2003 ; Gelmini *et al.,* 2000) y compris le cancer pulmonaire (Chen *et al.,* 2006 ; Lee *et al.,* 1998 ; Nassani *et al.,* 2013 ; Sen *et al.,* 2001 ; Xinarianos *et al.,* 2000).

5. Modifications épigénétiques : cas des microARNs

Le code génétique ne peut pas être le seul arbitre du destin de la cellule. Une information supplémentaire autre que celle générée par le code génétique est indispensable pour la régulation de l'expression génique. Cette information est appelée épigénétique (Adcock *et al.,* 2006). A l'opposition des modifications génétiques (mutations) qui impliquent un changement dans la séquence des gènes aboutissant au changement de leur expression, les modifications épigénétiques se réfèrent à un nombre de mécanismes moléculaires réversibles qui régulent l'expression des gènes sans changer leur séquence d'ADN (Brambilla, 2009b ; Robertson, 2005). Quatre mécanismes épigénétiques ont été identifiés : la méthylation de l'ADN, les modifications des histones, le remodelage de la chromatine et l'ARN interférence. Dans ce sous-chapitre, nous détaillerons uniquement le dernier mécanisme.

A l'état physiologique normal, les mécanismes épigénétiques régulent l'expression des gènes et assurent la stabilité du génome. Cependant, plusieurs études ont montré que l'altération de ces mécanismes, due à des facteurs environnementaux, peut être à l'origine de certaines pathologies (Baccarelli *et al.,* 2009 ; Baccarelli et Bollati, 2009 ; Tsou *et al.,* 2007). D'autre part, les modifications épigénétiques peuvent être héritées par mitose dans les cellules somatiques. Ceci permet aux facteurs environnementaux d'avoir des effets à long terme sur l'expression des gènes. En outre, ces modifications pourraient aussi être héritées par méiose, ce qui affecte potentiellement la santé des générations futures même si celles-ci ne sont pas exposées directement aux facteurs environnementaux qui y sont responsables (Jirtle et Skinner, 2007).

5.1. ARN interférence : les microARNs

Les microARNs (miARNs) sont des Acides RiboNucléiques (ARNs) simple brin non codants de 21 à 23 nucléotides de longueur et d'origine endogène. Au cours de ces dernières décennies, ils se sont imposés comme des éléments majeurs du contrôle de l'expression génique au niveau post-transcriptionnel en se liant aux régions 3'-UTR (UnTranslated RNA) non codantes des ARN messagers (ARNm). Les études fonctionnelles réalisées sur les miARNs indiquent que ces derniers participent à la régulation de quasiment tous les processus cellulaires, puisque toute altération dans leur niveau d'expression est associée à des pathologies (cancers, maladies cardiovasculaires, etc.) (Kloosterman et Plasterk, 2006). En effet, il a été estimé que plus de 60% des gènes humains codant pour des protéines sont régulés par des miARNs (Friedman *et al.,* 2009) et que chaque miARN possède plusieurs centaines de gènes cibles (Bushati et Cohen, 2007).

5.1.1. Biogenèse des miARNs

La genèse des miARNs se fait en quatre étapes successives présentées dans la Figure I-23.

5.1.1.a. Transcription du pri-miARN : miARN primaire

Les miARNs sont codés dans le génome au sein des unités transcriptionnelles codantes ou non pour des protéines. Dans la mesure où un gène ne codant pas pour une protéine peut en fait « coder » pour un miARN, nous appellerons P-codants les gènes codant pour une protéine, et

R-codants les gènes codant pour des miARNs. Les miARNs appartenant à des gènes P-codant sont généralement présents dans les introns du gène. Tandis que, si les miARNs sont présents dans des exons, il s'agit principalement des gènes R-codants. La majorité des gènes codant pour les miARNs sont transcrits par l'ARN polymérase II, qui produit une molécule d'ARN en forme de tige-boucle (avec quelques mésappariements dans la tige), d'une centaine des nucléotides, appelé pri-miARN (Lee *et al.,* 2004).

5.1.1.b. Formation du pré-miARN : précurseur du miARN

Le pri-miARN est ensuite pris en charge par un complexe multi-protéique appelé « microprocesseur » composé des protéines Drosha et DGCR8 (DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8) (Seitz et Zamore, 2006). Drosha est une ribonucléase de type III agissant de concert avec DGCR8 (protéine de liaison à l'ARN double brin) pour libérer un précurseur d'environ 70 nucléotides (Figure I-23) ; ce précurseur, le pré-miARN forme toujours une structure en tige-boucle avec une extrémité 3' sortante (avec 2 nucléotides qui dépassent, 2-nt 3' overhang).

Certains miARNs codés dans de courts introns sont générés directement par épissage et ne nécessitent pas de clivage par le microprocesseur. Dans ce cas particulier, après épissage une structure tige-boucle de type pré-miARN se forme (Figure I-23). Ces miARNs particuliers sont appelés « mirtrons » (Berezikov *et al.,* 2007).

5.1.1.c. Export du pré-miARN dans le cytoplasme

Les pré-miARNs générés dans le noyau par clivage du microprocesseur ou par la voie « mirtrons » seront ensuite activement exportés dans le cytoplasme par l'Exportine-5. Celle-ci reconnaît le pré-miARN grâce à son extrémité 3' sortante (Lund *et al.,* 2004).

5.1.1.d. Clivage du pré-miARN et libération du miARN

Dans le cytoplasme, le pré-miARN va subir sa dernière étape de maturation, catalysée par Dicer, une autre ribonucléase de type III, assistée de la protéine TRBP (pour TAR RNA Binding Protein). Le miARN résultant est un duplexe de 21 nucléotides en moyenne, avec deux extrémités 3' sortantes. Le miARN mature serait issu du brin de ce duplexe, qui aurait l'extrémité 5' la moins stable d'un point de vue thermodynamique (Khvorova *et al.,* 2003). Ce

miARN simple brin sera ensuite intégré dans le complexe ribonucléoprotéique appelé RISC (RNA-Induced Silencing Complex) ou encore appelé miRISC (miRNA- Induced Silencing Complex).

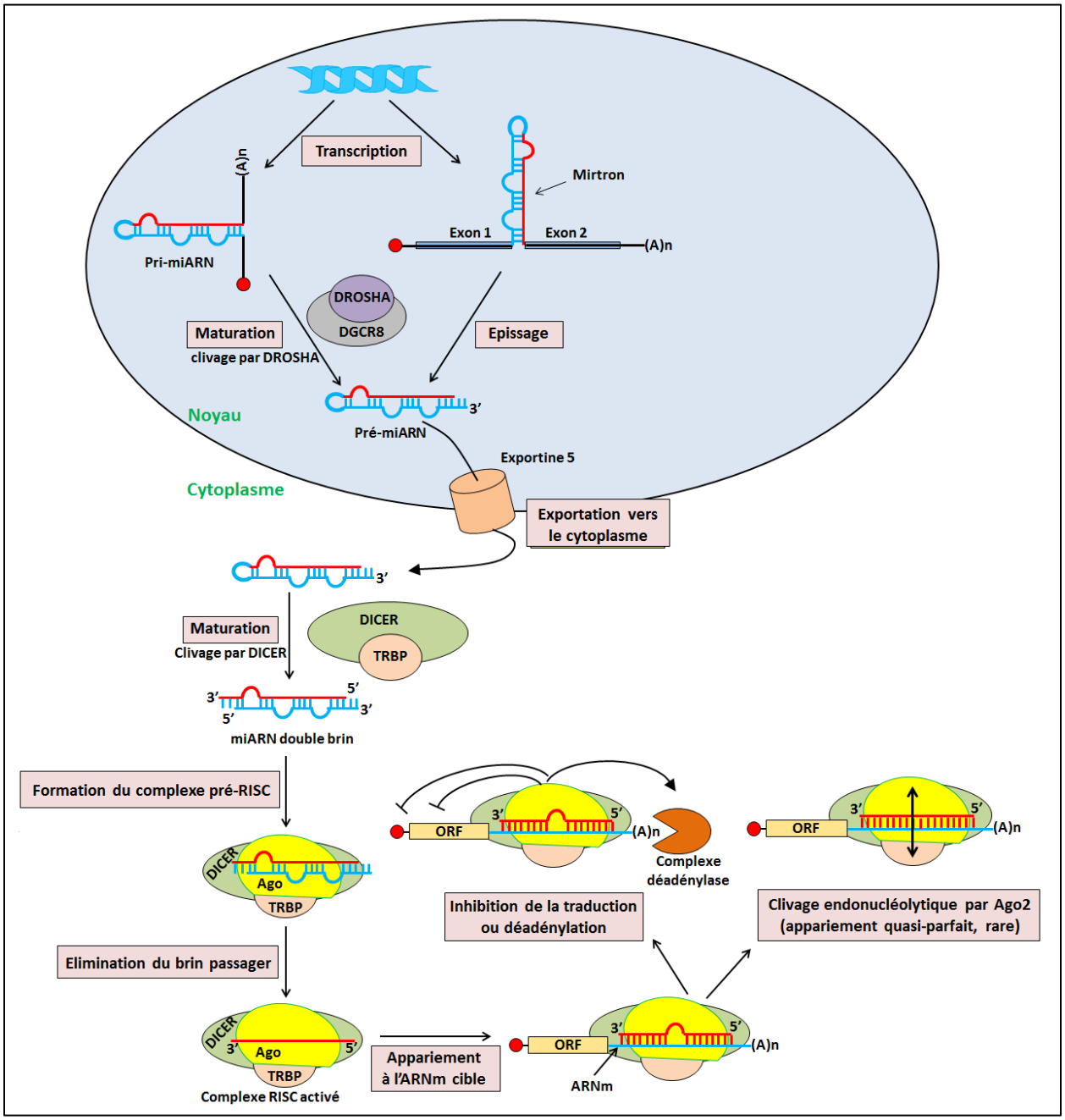


Figure I-23 : Mécanisme général de biogenèse et d'action des miARNs.
(ORF = Open Reading Frame ou phase ouverte de lecture (fragment codant de l'ARNm mature) ; RISC = RNA-Induced Silencing Complex (adapté de Davidson et McCray, 2011).

5.1.2. Mécanismes de régulation post-transcritionnels par les miARNs

Le miARN simple brin formé sera ensuite intégré dans le complexe miRISC (Figure I-23). Ce dernier contient le miARN mature, les protéines Dicer et TRBP auxquelles sont venues se joindre les protéines Argonautes (Ago). Les membres de la famille des protéines Ago sont les composants les plus caractérisés des complexes miRISC. Chez les mammifères, la répression de la synthèse protéique amenée par les miARNs *via* le complexe miRISC dépend de la présence des protéines Ago1-4 (Pillai *et al.,* 2004) et s'effectue suite à la fixation du miARN au niveau de la région 3'-UTR de l'ARNm cible aboutissant ainsi soit à une inhibition de la traduction (Petersen *et al.,* 2006 ; Pillai *et al.,* 2005) soit à une déadénylation (Giraldez *et al.,* 2006) suivie d'une dégradation de l'ARNm. Dans quelques cas rares d'appariement quasi parfait, Ago2 peut cliver l'ARNm cible (Figure I-23). En effet, Ago2 est le seul membre de la famille des protéines Argonautes à posséder une fonction ribonucléase apportée par son domaine PIWI (RNaseH-like Pelement induced wimpy testis) (Peters et Meister, 2007).

5.1.3. miARNs et cancer

Depuis quelques années, les miARNs ont été décrits comme dérégulés dans un grand nombre de tumeurs. Ils peuvent agir comme oncogènes ou en tant que suppresseurs de tumeurs. La surexpression d'un miARN contrôlant un gène suppresseur de tumeur aboutit à une diminution de la production d'une protéine anti-oncogénique (Yang *et al.,* 2013). A l'inverse, un effet positif sur le développement tumoral est observé en cas de diminution de l'expression d'un miARN contrôlant un oncogène (Liu *et al.,* 2011). En plus de la dérégulation de l'expression des miARNs, de nombreuses études montrent une dérégulation de l'expression de certains acteurs de la voie de biogenèse des miARNs dans les cancers, tels que la dérégulation de l'expression des ribonucléases de type III Dicer et Drosha aboutissant à une diminution globale de l'expression des miARNs, parfois associées à un pronostic défavorable de survie (Lin *et al.,* 2010 ; Merritt *et al.,* 2008).

5.2. Effets des PM

Jusqu'à présent, très peu d'études ont mis en évidence l'impact de la pollution atmosphérique chez l'Homme sur les profils d'expression des miARNs dans les systèmes pulmonaire (jardim, 2011). Une première étude *in vitro* a été réalisée en 2009 par Jardim et

collaborateurs sur des cellules épithéliales bronchiques humaines. Cette étude a montré des changements radicaux dans l'expression de 197 miARNs parmi les 313 miARNs qui étaient détectables dans les cellules exposées pendant 24 h aux particules d'échappement diesel. Parmi ces miARNs, les miR-26b et miR-27a ont été détectés et leur expression a été réprimée (Jardim *et al.,* 2009). D'après la littérature, le miR-26b a été également réprimé dans les poumons des rats exposés aux fumées de cigarettes (Izotti *et al.,* 2009) ainsi que dans les cellules humaines cancéreuses du sein (Li *et al.,* 2013 ; Liu *et al.,* 2011). Cependant, une surexpression de miR-26b a été observée dans un environnement hypoxique favorisant ainsi le développement d'un cancer en inhibant le signal pro-apoptotique (Kulshreshtha *et al.,* 2007).

Concernant le miR-27a, et contrairement aux résultats obtenus par Jardim et collaborateurs (Jardim *et al.,* 2009), une surexpression a été mise en évidence dans le cancer pancréatique, favorisant le comportement maligne des cellules cancéreuses (Ma *et al.,* 2010). D'autre part, miR-27a est réprimé dans le carcinome hépatique humain aboutissant à une augmentation du niveau de la P-glycoprotéine qui confie aux cellules cancéreuses la résistance aux substances chimiothérapiques (Chen *et al.,* 2013). Une contradiction a été remarquée dans le travail de Zhu et collaborateurs où une surexpression du miR-27a a abouti à l'activation de la P-glycoprotéine par inhibition de son suppresseur dans des lignées cellulaires humaines du carcinome du col utérin et du cancer ovarien (Zhu H *et al.,* 2008).

Une autre étude, menée par Bollati et collaborateurs, a évalué l'expression de trois candidats de miARN : miR-222, miR-21 et miR-146a, dans les leucocytes du sang périphérique d'ouvriers d'une aciérie exposés aux PM. Ils ont constaté que miR-222 et miR-21 étaient constamment élevés après une exposition professionnelle au cours de la semaine de travail (Bollati *et al.,* 2010). miR-21 est le miARN oncogène « oncomiR » le plus abondant, jouant un rôle fonctionnel important dans plusieurs types de cancers (Asangani *et al.,* 2008 ; Corsten *et al.,* 2007 ; Ribas *et al.,* 2009 ; Wang *et al.,* 2009) y compris le cancer pulmonaire (Liu *et al.,* 2011 ; Seike *et al.,* 2009). Des travaux antérieurs ont révélé que miR-21 favorise la croissance cellulaire et augmente l'invasion tumorale et les métastases dans le cancer de poumon (Zhang *et al.,* 2010 ; Zhu S *et al.,* 2008) en réduisant l'expression d'un ensemble spécifique de gènes cibles. Parmi ces gènes, nous pouvons noter PDCD4 (Chen *et al.,* 2003), PTEN (Zhang *et al.,* 2010), TPM1 (Zhu S *et al.,* 2007), NFIB (Fujita *et al.,* 2008), RECK (Gabriely *et al.,* 2008) et maspine (Zhu S *et al.,* 2008), dont la plupart sont des suppresseurs de tumeurs

Objectifs du travail de recherche

Les études sur la qualité de l'air au Liban ont commencé à partir des années 90, et jusqu'à présent, rares sont les études qui ont réalisé une caractérisation physico-chimique détaillée des particules atmosphériques. De plus, mis à part quelques études épidémiologiques, aucune étude n'a évalué les effets toxiques de la pollution atmosphérique, notamment la pollution particulaire, sur la santé humaine. Par ailleurs, comme nous l'avons mentionné dans le chapitre 1 partie A, plusieurs facteurs influencent négativement la qualité de l'air dans l'agglomération de Beyrouth, et des études récentes réalisées au Liban ont montré que le niveau des particules fines à Beyrouth dépasse les limites fixées par l'OMS (Saliba *et al.*, 2010).

Les particules fines sont capables de pénétrer profondément dans les poumons et d'atteindre les bronchioles et les alvéoles où elles exercent leurs effets toxiques. Quant aux particules ultrafines, non seulement elles se déposent tout au long des voies de l'appareil respiratoire (Marano, 2007) mais aussi, elles sont suspectées de traverser la barrière alvéolo-capillaire et d'atteindre la circulation sanguine, et donc de pouvoir exercer leurs effets toxiques aussi au niveau extra-pulmonaire (cœur, cerveau, etc.).

Partant de ce contexte, une étude menée au Liban était primordiale afin de mieux comprendre la composition des particules fines et ultrafines, leurs caractéristiques physico-chimiques ainsi que leurs mécanismes d'action impliqués dans la survenue de nombreuses maladies, notamment le cancer pulmonaire.

Par conséquent, nous avons choisi de travailler non seulement sur des particules fines mais également sur des particules ultrafines, et l'objectif de notre travail consistait donc à déterminer les caractéristiques physico-chimiques de PF et de PUF collectées sur un site urbain de l'agglomération de Beyrouth et sur un site rural situé à environ 38 km de la capitale et utilisé comme référence. Dans un deuxième temps, nous avons recherché *in vitro* les effets toxiques de ces particules, sur des cellules épithéliales bronchiques humaines.

Notre travail de recherche a donc consisté à :

- Effectuer des prélèvements de particules fines et ultrafines à l'aide d'un impacteur en cascade à haut débit sur un site urbain de fond et sur un site rural au Liban.

- Effectuer une caractérisation physico-chimique des échantillons de particules par la détermination de la composition en éléments inorganiques, en composés organiques, en ions inorganiques et en carbone total, la granulométrie, et la surface spécifique.

- Déterminer la cytotoxicité globale des échantillons de particules fines et ultrafines sur une lignée de cellules épithéliales pulmonaires humaines (lignée cellulaire BEAS-2B).

- Etudier l'activation métabolique des composés organiques adsorbés à la surface des particules, en recherchant l'induction de l'expression génique de quelques enzymes du métabolisme des xénobiotiques (*i.e.*, *CYP1A1*, *CYP1B1* et NQO1) et du récepteur de ces composés organiques (AhR) et de son translocateur nucléaire (ARNT) ainsi que du répresseur d'AhR (AhRR).

- Evaluer la capacité de ces particules à modifier l'expression génique de trois microARNs (miR-21, miR-26b et miR-27a) dans les cellules BEAS-2B.

- Evaluer l'activité de la télomérase dans les cellules BEAS-2B exposées à ces particules.

- Evaluer la phosphorylation de l'histone H2AX, en réponse aux cassures double-brin de l'ADN, dans les cellules exposées aux particules.

L'approche générale de ce travail de thèse est résumée dans la Figure I-24.

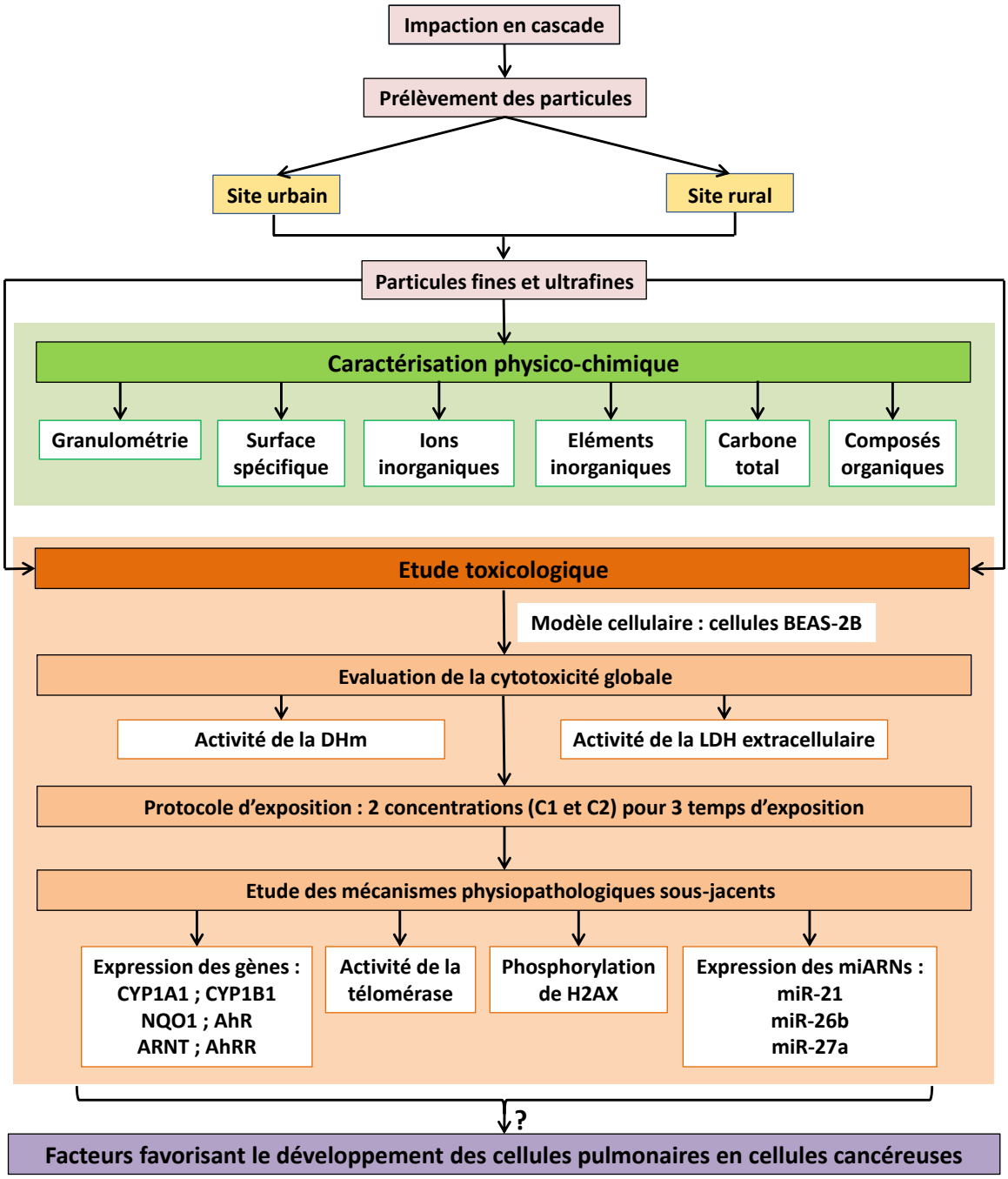


Figure I-24 : Méthodologie générale de l'étude.

II. Chapitre 2 :

Matériels et méthodes

Le deuxième chapitre sera subdivisé en 4 parties. La partie A sera consacrée à la description des sites d'échantillonnage des particules atmosphériques ainsi qu'à la méthodologie de prélèvement. Puis, dans la partie B sera présentée la préparation des échantillons de particules destinées aux études toxicologiques. Ensuite, les parties C et D seront consacrées aux techniques utilisées (principes et conditions opératoires) respectivement pour la réalisation des analyses physico-chimiques des particules collectées et pour étudier les mécanismes physiopathologiques suite à l'exposition des cellules épithéliales bronchiques à ces particules atmosphériques.

Partie A :

Méthodologie d'échantillonnage

1. Les sites de prélèvements

Ce projet de thèse vise à étudier les caractéristiques des aérosols atmosphériques, présents dans deux sites côtiers Libanais, et à évaluer leurs effets sur les cellules pulmonaires humaines. Pour se faire, des particules fines (PF) de diamètre aérodynamique inférieur ou égal à 2,5 µm et supérieur à 0,3 µm ($PM_{2,5-0,3}$) et des particules ultrafines (PUF), dans notre cas de diamètre aérodynamique inférieur à 0,3 µm ($PM_{0,3}$), ont été collectées à Sin El-Fil, un site représentatif de la pollution atmosphérique urbaine de l'agglomération de Beyrouth, et à Bejje, un site rural situé à 38 km au nord-nord-est du premier site (Figure II-1).

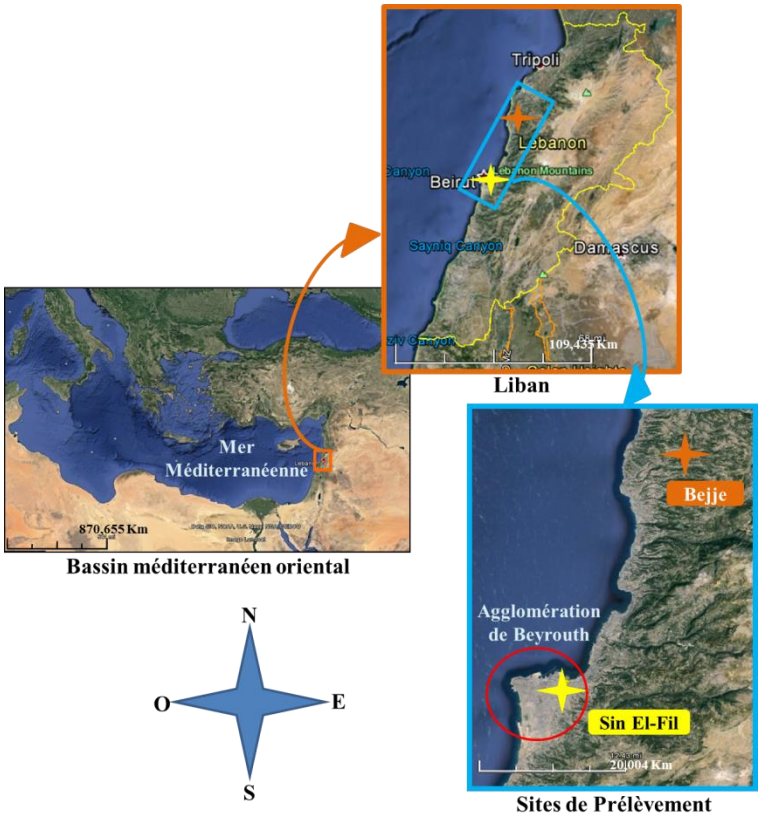


Figure II-1 : Localisation des sites de prélèvement.

1.1. Site urbain: Sin El-Fil - Beyrouth

Pour évaluer la toxicité des particules atmosphériques dans l'agglomération de Beyrouth, nous avons choisi de faire les prélèvements à Sin El-Fil, un site de fond représentatif de la pollution atmosphérique à Beyrouth et n'étant pas sous l'influence directe d'une source de pollution localisée.

Sin El-Fil, 2,5 km^2 et 12 396 habitants, est située dans la banlieue sud-est de Beyrouth à environ 3 km de la côte méditerranéenne. L'échantillonnage a été réalisé sur le toit de la gendarmerie de Sin El-Fil (33°52'46,76" N ; 35°32'14,53" E) située à une élévation de 35 m par rapport à la mer (Figure II-2). A 40 m environ du côté est et à 100 m du côté nord du site, se situent deux routes secondaires (passage régulier des voitures pendant les heures de pointe). De plus, deux axes routiers principaux à sens unique se situent à 240 m du côté est et à 130 m au sud du site de prélèvement (trafic de transit et d'échange régulier toute la journée qui devient dense pendant les heures de pointe). Un petit jardin public se situe vers le nord de la gendarmerie ainsi qu'un cours d'eau (actif en hiver et en printemps, sec en été et automne) à 580 m vers le nord.

À 3 km du nord-nord-ouest du site, se trouve le port de Beyrouth ainsi que les activités sauvages de combustion des déchets, alors qu'à 8 km de son côté sud-ouest se situe l'aéroport international de Beyrouth (Figure II-2).

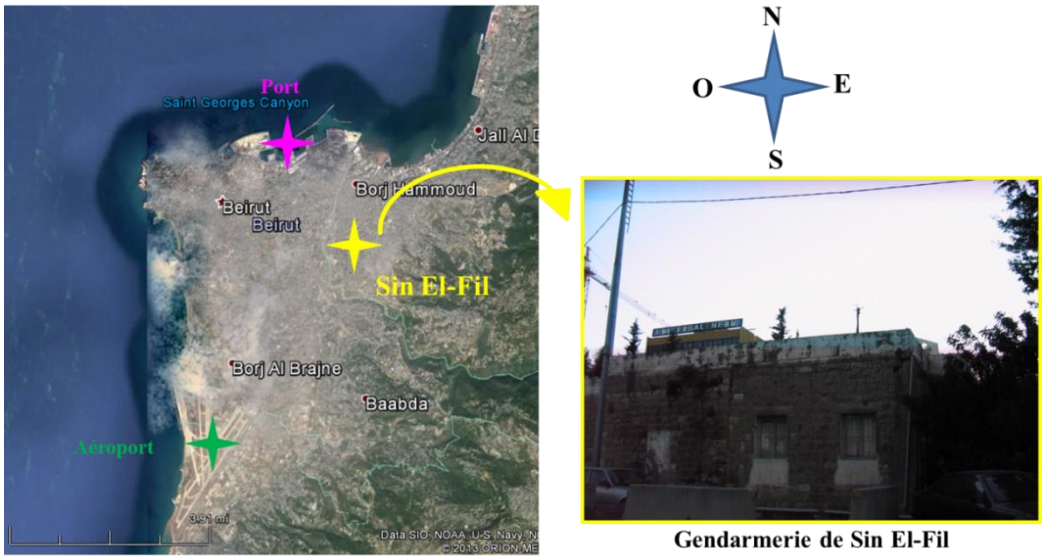


Figure II-2 : Site de Prélèvement à Sin El-Fil et son environnement.

1.2. Site Rural : Bejje

A 9 km nord-est de Byblos et à environ 7,5 km de la côte méditerranéenne, se situe Bejje (5,25 km^2), un village Libanais de 1 562 habitants qui a été choisi comme site rural afin de pouvoir comparer les effets toxiques des particules atmosphériques collectées dans l'agglomération de Beyrouth à un site non urbanisé.

L'échantillonnage a été réalisé sur le toit d'une église (34°10'33,02"N ; 35°42'58,48"E) située à 550 m du centre de Bejje et à 590 m au-dessus du niveau de la mer (Figure II-3). Deux routes, dont le trafic est local et le passage des voitures est rare, se situent à 370 m et à 310 m vers l'est et vers le nord-nord-ouest du site de prélèvement respectivement. Les sources d'émission de particules les plus proches dans la région de Bejje se situent à Selaata et Chekka à environ 15 km : carrières, cimenteries, usines d'engrais chimiques

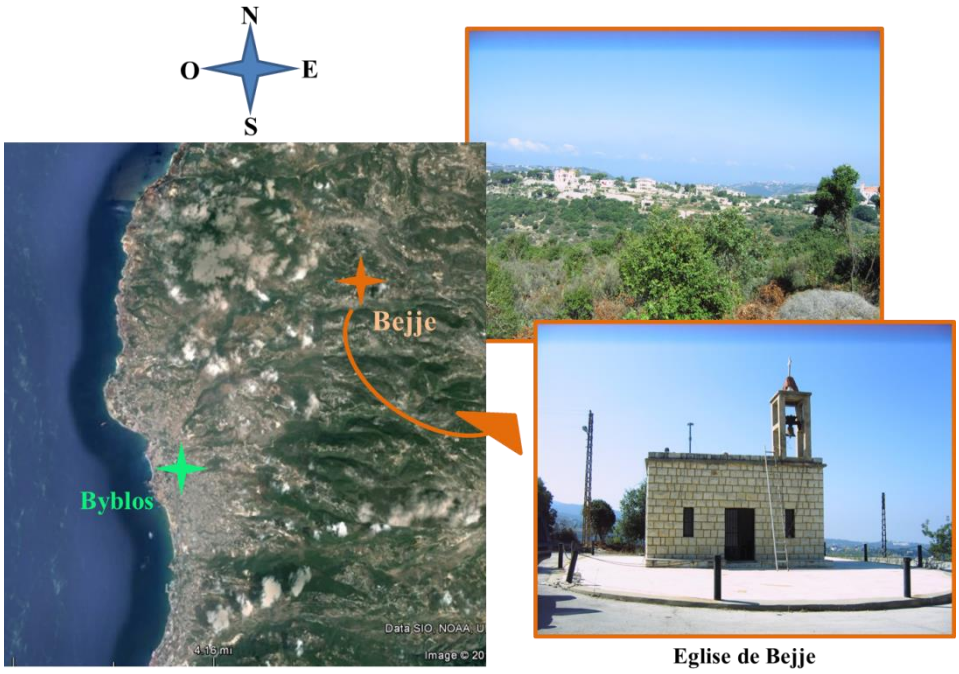


Figure II-3 : Site de Prélèvement à Bejje.

1.3. Stations météorologiques

Les données climatologiques (température, humidité, précipitation, direction et vitesse du vent) sont issues de deux stations météorologiques implantées à des endroits dont les caractéristiques sont les plus proches de celles de nos sites de référence. En effet, nous n'avions pas la possibilité

d'une station météorologique aux lieux de prélèvement. Néanmoins nous somme rassurées que les données obtenues entre différentes stations sont concordées.

1.3.1. Site urbain

La station météorologique a été localisée sur le bâtiment de l'Ecole Doctorale des Sciences et de Technologies de l'Université libanaise à Hadath (33°49'40.39"N, 35°31'18.32"E) à 46 m d'altitude et à 6 km du site de prélèvement de Sin El-Fil. Les données météorologiques ont été obtenues auprès du Dr Antoine Samarani.

1.3.2. Site rural

Aucune station météorologique n'est située à Bejje, donc nous avons considéré celles de deux sites proches et malheureusement, les mêmes paramètres ne sont pas mesurés à ces deux endroits. Nous avons ainsi considéré les données de température et de précipitation obtenues de la république libanaise (météo Liban) à partir d'une station météorologique située à Kaslik, ville côtière de 40 m d'altitude et située à 24 km au sud-sud-ouest de Bejje. Tandis que les données de vent (vitesse et direction), ont été obtenues du département de la météorologie du ministère des travaux publics et des transports de la république libanaise (direction générale de l'aviation civile de l'aéroport international de Beyrouth). La station est localisée à Tripoli (Liban-Nord) (34º27' N ; 35º53' E) à 6 m d'altitude et à environ 30 km de Bejje.

2. Les prélèvements

L'échantillonnage des PF et des PUF a été réalisé à l'aide d'une technique de prélèvement basée sur l'impaction en cascade. Cette technique a été utilisée afin de collecter une masse suffisamment importante de particules, sans support de collecte, pour pouvoir étudier à la fois leurs caractéristiques physico-chimiques et leurs effets toxiques sur des cellules pulmonaires.

2.1. Matériel

Un impacteur en cascade à haut débit a été utilisé. C'est un impacteur de 6 étages du type STAPLEX® modèle 236 (Figure II-4), développé en USA.

Figure II-4 : Photo d'un impacteur en cascade STAPLEX® 236.

L'impacteur a été mis en place à 2 mètres au-dessus de la surface du toit de la gendarmerie de Sin El-Fil et de l'église de Bejje, soit à environ 6 et 8 mètres au-dessus du niveau du sol respectivement.

L'échantillonnage des particules a été réalisé durant deux périodes différentes :

- du 18 mai au 2 septembre 2011 dans le site urbain (avec une interruption durant tout le mois de juillet puisque le bruit de la pompe gênait les voisins)
- du 5 septembre au 28 octobre 2011 dans le site rural

Les prélèvements ont été effectués de manière semi-continue (fonctionnement de la pompe environ 12h/jour) avec une récupération des échantillons toutes les 2 semaines environ (afin de récupérer suffisamment de particules sur chaque étage).

2.2. Principe de l'impaction en cascade

Cette technique de prélèvement permet un échantillonnage sélectif des particules atmosphériques en fonction de leur taille aérodynamique. Un impacteur en cascade comporte plusieurs étages d'impaction (plaques) qui sont munis des fentes dont la largeur diminue en passant d'un étage à un autre plus bas. L'impaction des particules sur chaque étage est basée sur

un principe physique de mécanique des fluides : l'inertie des particules dans un flux d'air (Figure II-5).

Les poussières dans le flux d'air sont accélérées au travers d'une fente : les particules animées d'une inertie suffisante s'écartent de la trajectoire et s'impactent sur la plaque d'impaction (Figure II-5). Les autres, donc les plus fines, se dirigent vers les étages inférieurs jusqu'à ce qu'elles acquièrent la quantité de mouvement suffisante pour se déposer. A débit d'air constant, la vitesse d'impaction pour un étage donné est supérieure à celle de l'étage précédent. On recueille ainsi les grosses particules sur le premier étage et les plus petites sur le dernier.

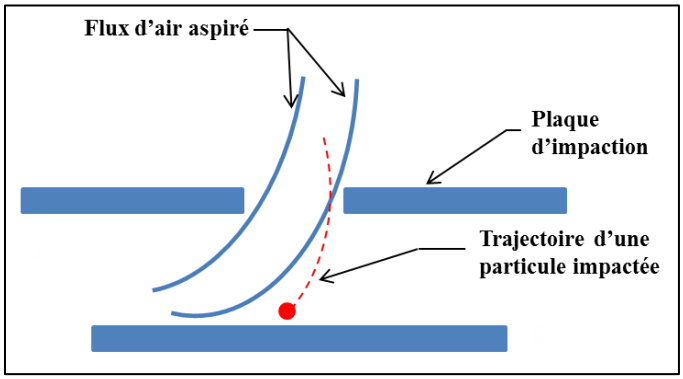


Figure II-5 : Schéma du principe de l'impaction en cascade.

L'impacteur que nous avons utilisé (Figure II-6) comporte 6 étages et un filtre d'arrêt (back-up), en fibre de verre (Staplex 8"x10"), retenant les particules non collectées sur le sixième étage. Les prélèvements sont effectués directement sur les plaques d'impaction sauf pour le premier étage, où les particules sont retenues sur un substrat de collection, un filtre en fibre de verre munies de fentes (Staplex TFAGFS810 Slotted Glass Fiber Filters, 5,63"x5,38"), qui recouvre la plaque d'impaction et ayant comme rôle d'éviter le bond des particules, de cet étage, vers les étages inférieurs (Figure II-6). Le débit d'aspiration de l'air est fixé à 42 m^3/h.

Le choix du type du filtre back-up (filtre en fibre de verre) était basé sur le type des analyses sous-jacentes : pour pouvoir analyser simultanément les composés organiques et les métaux dans les particules retenues sur le filtre. Ce dernier, est en plus capable de supporter les températures élevées pour éliminer les impuretés carbonées qui sont adsorbées sur le filtre avant son utilisation. De plus, ce type de filtre est adéquat pour les impacteurs à haut débit comme c'est le cas de notre impacteur utilisé. Toutefois, le filtre en fibre de verre présente

l'inconvénient d'avoir des teneurs élevées en certains éléments métalliques notamment dans ces fibres qui doivent être prises en compte dans le traitement des résultats.

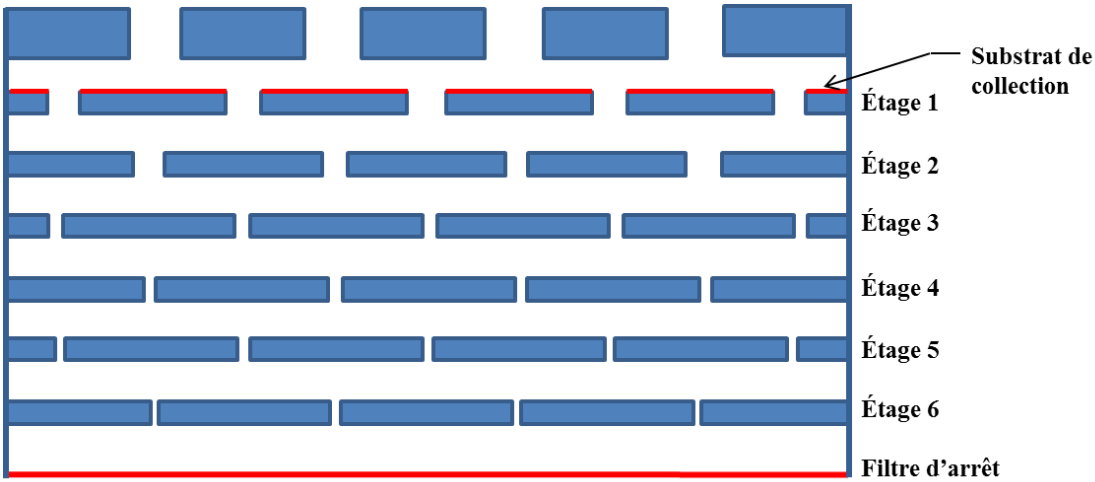


Figure II-6 : Schéma d'un impacteur en cascade de 6 étages.

La calibration des impacteurs se fait en terme de "diamètre aérodynamique équivalent" (d_{ae}), qui correspond à la taille minimale des particules collectées sur un étage avec 50% d'efficacité de collection et que l'on note $D_{p,50}$, dit également "diamètre de coupure". Pour un débit de 20 Cubic Feet Meter (CFM) = 34 m^3/h et pour une densité de 2 g/cm^3, les valeurs de $D_{p,50}$ sont reportées dans le Tableau II-1.

Tableau II-1: Diamètres aérodynamiques équivalents pour des particules de masse volumique 2 g/cm^3 (Impacteur STAPLEX® modèle 236 ; 34m^3/h)

Etage	1	2	3	4	5	6	Filtre d'arrêt
$D_{p,50}$ (µm)	7,23	2,93	1,47	0,97	0,49	0,27	0,03

Lors de nos prélèvements, un débit de 42 m^3/h a été utilisé au lieu de 34 m^3/h préconisé. Une consigne de débit supérieur permet d'augmenter la vitesse de flux d'air au niveau de la fente de la plaque d'impaction, ce qui va permettre aux particules de tailles inférieures de s'extraire de ce flux d'air et donc de collecter des particules de diamètres inférieurs sur la plaque d'impaction suivante. Ce qui a par conséquent pour effet d'abaisser les diamètres de coupure de chaque étage et ainsi d'augmenter l'efficacité de collecte des particules les plus fines. Dans notre cas, les diamètres de coupure effectifs lors de nos échantillonnages sont donc inférieurs à ceux présentés

dans le Tableau II-1 et par conséquent des particules plus fines sont récupérées sur les étages de l'impacteur.

2.3. Protocole

Avant chaque prélèvement, les plaques d'impaction en aluminium anodisé ont été lavées au détergent de laboratoire, rincées à l'eau déminéralisée puis à l'eau ultra pure et mises à sécher sous un poste de sécurité microbiologique (PSM) à flux laminaire. Quant aux filtres d'arrêt, ils ont été préalablement grillés dans un four à mouffle à 450°C (Kfoury, 2013) pendent 2 h puis enveloppés dans du papier aluminium jusqu'à utilisation (et ceci afin d'éliminer les composés organiques qui peuvent être déposés).

La tête de l'impacteur en cascade, comportant les différents étages, est assemblée au laboratoire sous le PSM, emballée dans un sac en plastique puis transportée jusqu'au site de prélèvement. Une fois le prélèvement terminé, la tête d'impaction est ramenée au laboratoire où les filtres et les plaques d'impaction sont mis à sécher pendent 48 heures sous le PSM (Figure II-7).

Après leur séchage, les PF ont été récupérées à l'aide d'un pinceau à partir des plaques d'impaction (étages 2, 3, 4, 5 et 6), mises dans un cryotube, pesées puis conservées à -20°C jusqu'à utilisation. Les filtres d'arrêt (retenant les PUF) et les substrats de collection de l'étage 1 (retenant les particules les plus grosses) ont été enveloppés par un papier aluminium après avoir été séchés, puis scellés dans un sac en plastique et conservés à -20°C.

Figure II-7 : Plaques d'impaction et filtre d'arrêt retenant les particules collectées.

Au total, nous avons obtenu dix échantillons urbains (5 échantillons de PF et 5 autres de PUF, qui seront notés par la suite PF-U_1 jusqu'à PF-U_5 et PUF-U_1 jusqu'à PUF-U_5 respectivement) et 8 échantillons ruraux (4 échantillons de PF et 4 autres de PUF qui seront notés par la suite PF-R_6 jusqu'à PF-R_9 et PUF-R_6 jusqu'à PUF-R_9 respectivement).

Le Tableau II-2, représente les échantillons urbains et ruraux collectés durant les différentes périodes de prélèvement.

Tableau II-2 : Echantillons de Particules Fines (PF) et de Particules UltraFines (PUF) collectés dans les sites urbain et rural.

	Période	**Echantillons de PF**	**Echantillons de PUF (filtres d'arrêts)**
Urbain	18-27 mai 2011	PF-U_1	PUF-U_1
	30 mai-10 juin 2011	PF-U_2	PUF-U_2
	13-24 juin 2011	PF-U_3	PUF-U_3
	05-19 août 2011	PF-U_4	PUF-U_4
	22 août-2 septembre 2011	PF-U_5	PUF-U_5
Rural	05-16 septembre 2011	PF-R_6	PUF-R_6
	20-29 septembre 2011	PF-R_7	PUF-R_7
	03-14 octobre 2011	PF-R_8	PUF-R_8
	17-28 octobre 2011	PF-R_9	PUF-R_9

Partie B :

Préparation des échantillons de particules destinées aux études toxicologiques

Les échantillons individuels de PF et de PUF collectés sur les 2 sites urbain et rural, cités dans le Tableau II-2, ont servi à la fois pour les analyses chimiques et toxicologiques. Afin d'étudier les effets toxiques des particules, nous avons constitué, à partir de ces échantillons individuels, des échantillons de particules appelés « composites » représentatifs de l'exposition en milieu urbain et rural. Dans cette partie du chapitre 2, seront donc présentés les différents protocoles que nous avons utilisés afin de préparer les échantillons de particules destinées aux études toxicologiques.

1. Particule fines

Nous avons regroupé, après analyse, les échantillons individuels PF-U (1, 2, 3, 4 et 5) d'une part et PF-R (6, 8, et 9) d'autre part. Les échantillons composites ainsi constitués seront nommés PF-U et PF-R respectivement. Chacun de ces échantillons composites a subi une caractérisation chimique très fine (développée dans la partie C) et a été utilisé pour intoxiquer une lignée de cellules pulmonaires épithéliales bronchiques humaines (BEAS-2B) afin d'évaluer les mécanismes toxicologiques sous-jacents.

Il faut noter que les échantillons de PF-R_7 et de PUF-R_7 n'ont pas été considérés dans les échantillons composites de PF-R ni de PUF-R car la période de prélèvement correspondante représente un épisode particulier que nous détaillerons par la suite.

2. Particules ultrafines

Afin d'exposer les cellules BEAS-2B aux PUF retenues sur les filtres en fibres de verre, deux types d'échantillons composites de PUF ont été préparés pour chaque site d'échantillonnage : un extrait organique et un extrait de particules récupérées dans de l'eau. D'abord, nous citons brièvement les différents protocoles utilisés dans la littérature, ensuite nous

passons à la présentation des protocoles que nous avons utilisés pour préparer les échantillons composites de PUF pour les études de toxicologie.

2.1. Protocoles utilisés dans la littérature

Afin de pouvoir exposer des cellules aux particules retenues sur des filtres, différentes méthodes sont citées dans la littérature et sont utilisées, telles que l'extraction de la fraction organique, de la fraction soluble ou de la fraction insoluble des particules, ou la récupération des particules totales retenues sur les filtres. Dans ce paragraphe, nous résumons les méthodes utilisées pour récupérer les grosses particules, les fines et les ultrafines à partir de différents types de filtre.

Afin d'exposer les cellules à la fraction organique des PM retenues sur des filtres en fibre de verre ou en nitrocellulose, une extraction des composés organiques dans un solvant a été réalisée. Les filtres ont été extraits soit dans du dichlorométhane au soxhlet (Cavanagh *et al.,* 2009) ou par la technique Accelerated Solvent extraction (ASE) (Baulig *et al.,* 2009), soit dans de l'acétone par ultrasons (Schirilo *et al.,* 2010). Les extraits ont été ensuite concentrés sous flux d'azote ou par évaporateur rotatif, et repris dans du Diméthyl Sulfoxide (DMSO) (Baulig *et al.,* 2009 ; Cavanagh *et al.,* 2009) ou dans du milieu de culture (Schirilo *et al.,* 2010).

Concernant l'exposition des cellules à la fraction soluble ou insoluble des particules, ou aux particules totales retenues sur différents types de filtre, une première étape est couramment réalisée par traitement du filtre aux ultrasons dans de l'eau (den Hartigh *et al.,* 2010 ; Gualtieri *et al.,* 2009 ; Hutchison *et al.,* 2005 ; Li *et al.,* 2009 ; Lu *et al.,* 2011 ; Manteca *et al.,* 2010 ; Nawrot *et al.,* 2009 ; Schins *et al.,* 2004) ou du méthanol (Happo *et al.,* 2007 ; Jalava *et al.,* 2010 ; Jalava *et al.,* 2007 ; Jalava *et al.,* 2006 ; Pennanen *et al.,* 2007).

Les fractions soluble ou insoluble des particules récupérées, ont été ensuite obtenues en récupérant respectivement le surnageant (Baulig *et al.,* 2009 ; Hutchison *et al.,* 2005) ou le culot de particules (Hutchison *et al.,* 2005) après les avoir fait sédimenter par centrifugation. Quant aux particules totales, la suspension des particules, obtenues suite au traitement des filtres aux ultrasons, a été concentrée (Jalava *et al.,* 2010 ; Jalava *et al.,* 2006 ; Pennanen *et al.,* 2007) ou séchée dans un dessiccateur. Dans le dernier cas, les particules sont ensuite remises en suspension dans de l'eau (Gualtieri *et al.,* 2009)

D'autres auteurs, ont choisi d'éliminer les fibres détachées du filtre en fibre de verre en filtrant, sur un filtre d'acétate de cellulose 0,2 µm, la solution de particules obtenue après traitement du filtre aux ultrasons (Happo *et al.,* 2007 ; Jalava *et al.,* 2006 ; Pennanen *et al.,* 2007).

Le problème se pose également de savoir quelle est la masse de particules récupérée par ce protocole, et différentes méthodes sont utilisées pour cette détermination. den Hartigh *et al.,* 2010, Li *et al.,* 2009 et Lu *et al.,* 2011 ont déterminé la masse des particules récupérées, par la différence des masses des filtres, en téflon ou polycarbonate, avant et après récupération des particules. D'autres, ont déterminé la concentration des particules par turbidimétrie (Baulig *et al.,* 2003 ; Schins *et al.,* 2004 ; Shi *et al.,* 2006) ou par la pesée des particules récupérées après séchage au dessicateur (Gualtieri *et al.,* 2009 ; Manteca *et al.,* 2010). Par contre, Happo *et al.,* 2007, Jalava *et al.,* 2006 et Schirilo *et al.,* 2010 ont calculé la masse des particules retenues sur les filtres en fibre de verre par la pesée du filtre avant et après échantillonnage et ils ont supposé que toutes les particules retenues sur les filtres ont été récupérées. Plusieurs auteurs sont par ailleurs d'accord pour dire que l'efficacité d'extraction ne peut pas être mesurée pour les $PM_{0,2}$ collectées sur des filtres en fibre de verre (Happo *et al.,* 2007 ; Jalava *et al.,* 2007 ; Schirilo *et al.,* 2010).

Quant à la composition chimique des particules, elle est déterminée soit en analysant des morceaux du même filtre à partir duquel les particules ont été récupérées pour réaliser les analyses toxicologiques (Hutchison *et al.,* 2005 ; Li *et al.,* 2009 ; Nawrot *et al.,* 2009), soit en analysant un autre type de filtre qui a été collecté en parallèle avec le filtre qui a servi pour récupérer les particules (Manteca *et al.,* 2010), soit en analysant les particules récupérées après leur séchage (Jalava *et al.,* 2006 ; Pennanen *et al.,* 2007).

2.2. Extraits organiques des composites de PUF

Les extraits organiques des échantillons composites de PUF-U et de PUF-R retenues sur des filtres et qui vont servir pour les analyses de toxicologie sont préparés de la manière suivante : les filtres des composites de PUF-U (1/12 de chaque filtre U_1, U_2, U_3, U_4 et U_5) et de PUF-R (1/12 de chaque filtre R_6, R_8 et R_9) sont extraits dans du dichlorométhane au soxhlet pendant 16 h. Les extraits sont ensuite concentrés sous flux d'azote jusqu'à environ 2 microlitres puis repris dans 200 µL de DMSO. La même procédure a été réalisée pour une quantité équivalente d'un filtre vierge.

2.3. Récupération des PUF retenues sur les filtres d'arrêt

Après plusieurs essais de récupération de PUF à partir du filtre en fibre de verre, et dans la mesure où un protocole standard n'existe pas et que les protocoles utilisés dans la bibliographie divergent, nous avons établi notre propre protocole en nous inspirant de ceux présents dans la bibliographie. La méthodologie utilisée fait appel à une récupération des particules par ultrasons, tous les auteurs étant d'accord sur ce point, à une filtration pour éliminer les fibres détachés du filtre, et à une étape de concentration à l'aide d'un "speed-vac". Les moitiés des filtres de PUF-U (1, 2, 3, 4 et 5) et de PUF-R (6, 8 et 9) ont été utilisées pour récupérer dans l'eau les particules ultrafines, et pour former les échantillons composites de PUF-U et de PUF-R respectivement. La Figure II-8 résume ce protocole qui est détaillé dans le paragraphe ci-dessous.

La moitié du filtre d'arrêt de chaque échantillon est pesée puis coupée en 14 morceaux environ. Chaque morceau est mis dans un tube en polypropylène de 50 mL (déjà lavé 3 fois à l'eau ultra pure par ultrasons) et couvert de l'eau ultra pure puis soumis aux ultrasons pendant 20 min à 18ºC. Après le traitement aux ultrasons, le morceau de filtre est rincé légèrement à l'eau ultra pure et la solution obtenue est filtrée sur un filtre de polycarbonate (diamètre des pores 0,45 µm ; diamètre du filtre 47 mm) Sartorius AG à l'aide d'un système de filtration (déjà lavé à l'acide puis à l'eau ultra pure) et d'une pompe à vide manuelle Nalgene®. Cette étape est indispensable pour retenir les fibres détachées du morceau du filtre lors de l'ultrason. Après chaque filtration, le filtre de polycarbonate (qui a servi pour la filtration) est rincé à l'eau ultra pure afin de ne pas perdre les particules retenues avec les fibres. La même procédure est répétée une 2ème fois avec le même morceau de filtre (back-up). Afin de récupérer les particules qui peuvent être retenues sur le filtre de polycarbonate après la filtration, la même procédure est appliquée une fois pour ce filtre.

Les filtrats issus des différents morceaux de filtre d'un même échantillon, et contenant les particules récupérées, sont groupés, puis l'eau est évaporée par l'intermédiaire d'un speed-vac (RVC 2-25 CD plus, Christ) (conditions: 60ºC ; sous-vide : 24 mbar ; 1300 tours/min), qui est un évaporateur centrifuge utilisé pour évaporer les solvants de plusieurs échantillons simultanément (Zhao *et al.*, 2012).

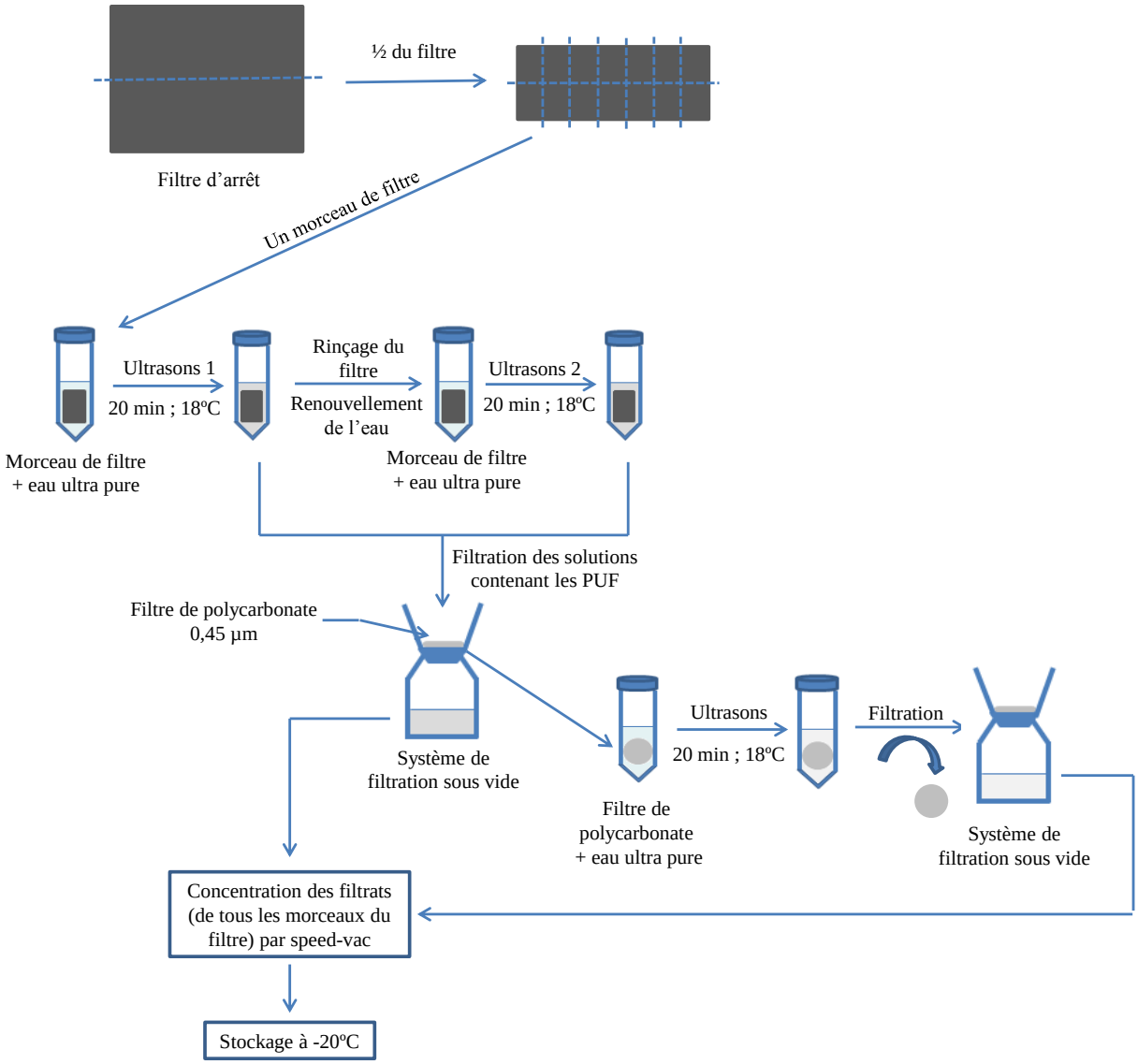


Figure II-8 : Schéma du protocole de récupération des particules ultrafines à partir du filtre d'arrêt.

Les masses des PUF retenues sur les filtres d'arrêt ont été déterminées en additionnant les concentrations déterminées pour l'ensemble des éléments analysés présents dans les particules collectées sur ces filtres (éléments majeurs et mineurs, ions inorganiques et carbone total).

Après le traitement au speed-vac, les solutions des échantillons de PUF-U (1, 2, 3, 4 et 5) d'une part, et de PUF-R (6, 8 et 9) d'autre part sont mélangées afin de former les échantillons composites de PUF-U et de PUF-R récupérées dans l'eau. Les solutions d'échantillons composites sont ensuite concentrées par le speed-vac de façon à avoir une concentration finale de 5 mg de PUF/mL et elles sont enfin stockées dans des tubes en polypropylène à -20ºC jusqu'à

leur utilisation ultérieure. Cette concentration est déterminée en considérant que toutes les particules qui étaient sur les filtres sont récupérées dans l'eau (Hutchison *et al.*, 2005 ; Jalava *et al.*, 2006 ; Schirilo *et al.*, 2010).

Un filtre en fibre de verre vierge a subi la même procédure, et le filtrat obtenu est concentré de façon à avoir une quantité équivalente à celle des échantillons composites de PUF-U et de PUF-R. Ce dernier extrait sera utilisé en témoin pour les études de cytotoxicité.

Partie C :

Caractérisation physico-chimique des particules

L'ensemble des échantillons individuels cités dans le Tableau II-2, soit 18 échantillons, ainsi que les échantillons composites de PF-U et de PF-R, ont subi différentes analyses chimiques afin de déterminer leurs compositions et d'identifier leurs caractéristiques. Le principe, le protocole et les conditions opératoires des différentes techniques utilisées sont développés dans cette partie.

Avant chaque analyse, les échantillons de particules fines (poudre) et de particules ultrafines (sur filtres) ont été mis à température ambiante pour 3 heures. Les PF ont été ensuite homogénéisées par vortex avant de prélever la masse désirée de particules pour effectuer l'analyse. Quant aux filtres d'arrêt, avant la première analyse, les contours (partie du filtre en contact avec le joint et ne retenant pas de particules) ont été coupés et éliminés et les parties de filtres chargées de particules ont été ensuite pesés. Chaque analyse a été réalisée sur une portion de filtre préalablement pesée. La stratégie de travail et les différentes informations auxquelles l'on souhaite accéder sont représentées dans la Figure II-9.

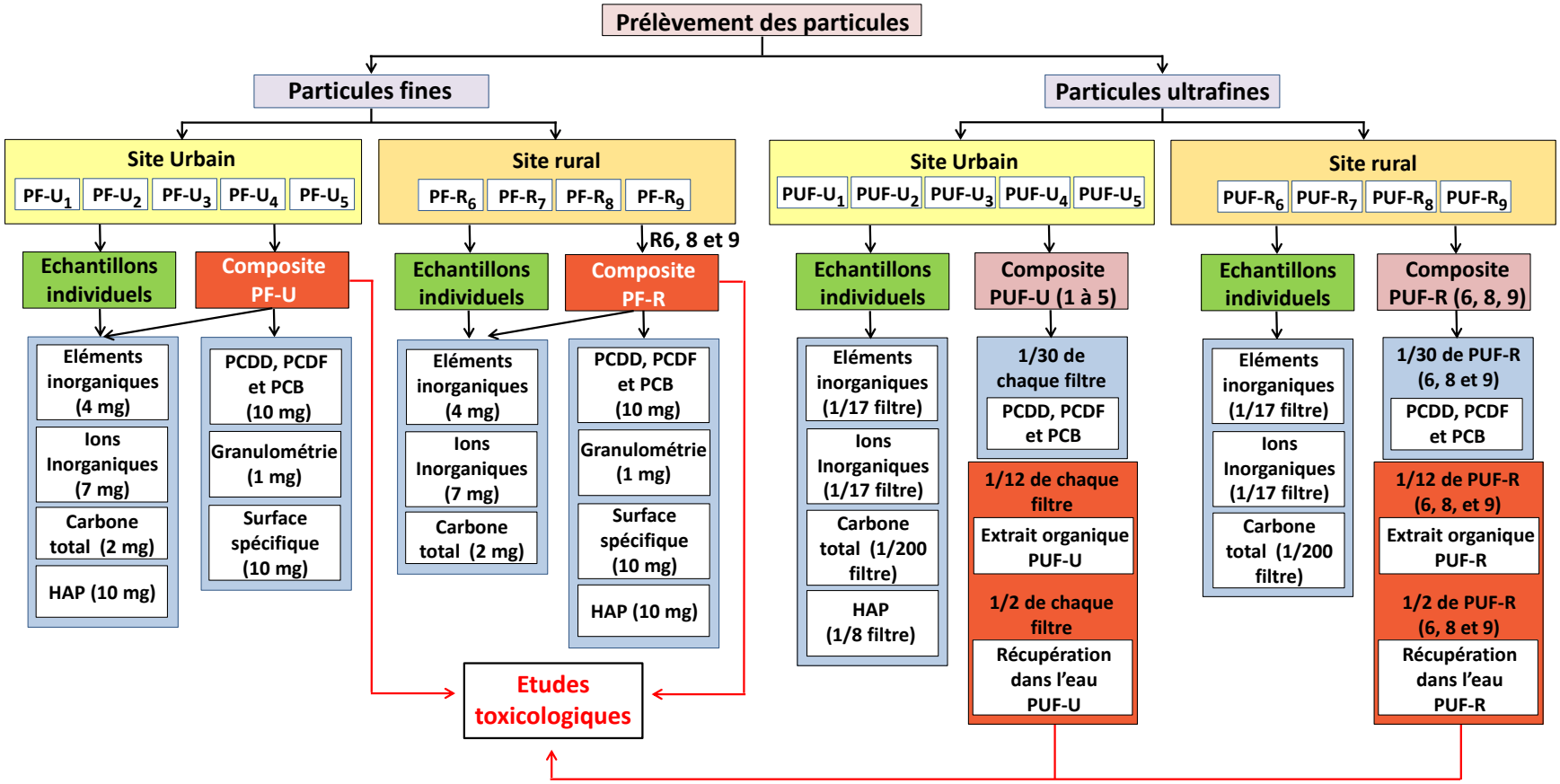


Figure II-9 : Stratégie de travail

1. Dosage des éléments inorganiques

Pour déterminer la composition des particules en éléments inorganiques, nous avons choisi d'utiliser l'ICP-MS (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry) et l'ICP-AES (Inductively coupled Plasma-Atomic Emission Spectroscopy) de façon complémentaire : l'ICP-AES pour les éléments majeurs de l'atmosphère et l'ICP-MS pour les éléments mineurs et traces. Ces techniques se sont, en effet, révélées de bonnes méthodes pour la mesure des éléments au sein des particules. Elles possèdent l'avantage de permettre l'analyse simultanée et rapide d'un grand nombre d'éléments. L'ICP-AES, ayant une grande plage de linéarité (du ppb à la centaine de ppm), a des limites de détection de l'ordre de quelques µg/l et donc se révèle très efficace pour la quantification des éléments majeurs. Les limites de détection de l'ICP-MS sont inférieures au µg/l et cette technique est très bien adaptée pour la détection des éléments traces et ultra traces (Salomon *et al.*, 2002).

Nous avons analysé une large gamme d'éléments pour caractériser au mieux les particules recueillies en milieu urbain et rural. Au total, nous nous sommes intéressés à 25 éléments dont la majorité est connue pour avoir des effets toxiques sur l'Homme (Baccarelli et Bollati, 2009 ; Poey et Philibert, 2000) : Argent (Ag), Aluminium (Al), Arsenic (As), Baryum (Ba), Bismuth (Bi), Cadmium (Cd), Cobalt (Co), Chrome (Cr), Cuivre (Cu), Fer (Fe), Manganèse (Mn), Niobium (Nb), Nickel (Ni), Phosphore (P), Plomb (Pb), Rubidium (Rb), Antimoine (Sb), Scandium (Sc), Etain (Sn), Strontium (Sr), Tellure (Te), Titane (Ti), Thallium (Tl), Vanadium (V) et Zinc (Zn).

1.1. Préparation des échantillons

Les techniques que nous avons choisies nécessitent une mise en solution préalable des échantillons.

1.1.1. Minéralisation des particules

Environ 1/17 de filtre d'arrêt (retenant les PUF) ou environ 4 mg de PF sont pesés et déposés dans un godet SAVILLEX® en PTFE (PolyTétraFluoroEthylène ou téflon) de 15 mL. Ces échantillons sont minéralisés par digestion acide en phase liquide, à chaud (120°C) durant 4 heures environ par un mélange de trois acides concentrés de qualité Suprapur® Merck, l'acide

nitrique (HNO_3), l'acide fluorhydrique (HF) et l'acide perchlorique ($HClO_4$), dans les proportions respectives de 4:1:0,5 en volume. Après évaporation quasi-totale des acides à 180°C durant près de quatre heures, la goutte résiduelle est reprise dans quelques mL d'eau ultrapure puis portée à 110°C pendant une heure afin de solubiliser tous les éléments concentrés dans la goutte restante. Après refroidissement, la solution obtenue est ajustée à 13 mL d'eau ultrapure et acidifiée à 0,2 % par le HNO_3 pour la conservation, puis filtrée sur une membrane en acétate de cellulose VWR® (0,45 µm ; 25 mm). Le filtrat obtenu, contenant les éléments à analyser, est récupéré dans un flacon en polyéthylène et stocké à -20°C jusqu'à le jour de l'analyse. Le même protocole a été appliqué d'une part sur un filtre vierge afin de déterminer la contribution des fibres du filtre à la teneur en éléments dans les échantillons et d'autre part, sur le mélange d'acide utilisé, pour prendre en considération l'éventuelle contamination durant les phases de préparation et d'analyse (Ledoux *et al.*, 2006).

Les solutions ainsi obtenues serviront à l'analyse des éléments Al, Ba, Fe, Mn, P, Sr, Ti et Zn par ICP–AES et les éléments Ag, As, Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Nb, Ni, Pb, Rb, Sb, Sc, Sn, Te, Tl, V par ICP-MS.

1.1.2. Conditionnement du matériel

L'ICP-MS permet de détecter des concentrations de l'ordre de la centaine de ng/L permettant ainsi le dosage des éléments traces présents dans les particules atmosphériques, ce qui exige en même temps l'utilisation d'un matériel propre pour éviter les contaminations et minimiser l'erreur pendant l'analyse. L'ensemble du matériel utilisé est donc préalablement rincé à l'eau ultrapure, puis rempli d'une solution d'acide chlorhydrique (HCl) 0,5M et de HNO_3 0,5M de lavage pendant 48 heures environ. Ensuite, l'ensemble est rincé abondamment à l'eau ultrapure et mis à sécher sous une hotte à flux laminaire.

1.2. Dosage par spectrométrie d'émission atomique (ICP-AES)

1.2.1. Principe

L'émission atomique utilise la propriété des atomes de passer d'un niveau d'énergie supérieur à un niveau inférieur en émettant des raies de longueurs d'ondes caractéristique de chaque atome. Cette technique repose donc sur la mesure de cette énergie émise, sous forme

d'un rayon lumineux à une longueur d'onde spécifique, par un atome qui passe d'un état excité à un état plus stable.

Afin d'être excité, l'échantillon doit arriver à la torche plasma sous forme de fines gouttelettes ne dépassant pas quelques microns de diamètre. Pour cela on utilise un nébuliseur comportant deux arrivées, l'une pour l'échantillon en solution et l'autre pour un gaz (argon, Ar) servant à rompre le liquide en gouttelettes et donc à générer l'aérosol primaire. Ce dernier sera transformé en micro-gouttelettes de quelques micromètres, après élimination des grosses gouttelettes par gravité, dans la chambre de nébulisation. L'aérosol ainsi formé est envoyé par le flux de gaz dans une torche à plasma d'argon à très haute température (entre 6 000 et 10 000 °C), suffisante pour vaporiser, dissocier et atomiser la plupart des éléments. Le plasma produit une double action sur les atomes : il les excite ce qui leur fait émettre des photons (ces photons sont détectés lorsque l'on utilise l'ICP-AES) et il les fait passer à l'état d'ions positifs mono-chargés (ces ions sont alors dirigés et identifiés grâce à un spectromètre de masse dans le cas de l'ICP-MS). Le plasma est entretenu par un champ magnétique induit par une bobine. Chaque élément excité dans le plasma, en revenant à son état fondamental, émet alors des photons de longueurs d'onde caractéristiques de l'élément et dont l'intensité lumineuse est proportionnelle à la concentration de l'élément dans l'échantillon. Les rayons émis sont détectés dans notre cas par un détecteur à injection de charge (CID = Charge Injection Device).

Les limitations de cette technique sont essentiellement liées à des phénomènes d'interférences spectrales, c'est-à-dire à la superposition de raies d'émission atomique d'éléments différents. Les spectromètres sont conçus afin d'offrir la plus grande possibilité de séparation des longueurs d'onde, mais les interférences sur certaines raies ne peuvent être résolues. Il faut donc analyser, pour un élément chimique, les raies d'émission les moins sensibles à de possibles interférences.

1.2.2. <u>Conditions opératoires</u>

Les analyses ont été réalisés à l'aide d'un spectromètre d'émission Thermo Fisher® iCAP série 6000. La mesure de l'émission des éléments étudiés a été effectuée prioritairement dans l'axe du plasma (mode axial) pour améliorer les limites de détection et augmenter la sensibilité. Dans le cas de l'analyse de filtre, la présence de certains éléments à des teneurs élevées (Al par

exemple) a nécessité d'effectuer la mesure de l'émission en visée radiale sur ces éléments de manière à ne pas saturer le détecteur.

Pour chaque élément, différentes raies d'émission donc différentes longueur d'onde sont disponibles. Ces raies ont été judicieusement choisies afin de pouvoir analyser l'ensemble des éléments dans le même échantillon et minimiser les éventuels phénomènes d'interférence.

L'appareil est calibré à partir d'une gamme étalon multi-élémentaires pour pouvoir déterminer la concentration des éléments présents dans les échantillons analysés. Les raies choisies, la gamme d'étalonnage retenue et les limites de quantification (LDQ) de chaque élément figurent dans le Tableau II-3.

Tableau II-3 : Caractéristiques de la méthode de dosage des éléments par ICP-AES.

Eléments	Longueur d'onde (nm)	Gamme d'étalonnage (ppb)	Limites de quantification (ppb)
Al	3961	50-20000	4
Ba	4554	0,5-50	0,4
Fe	2382 ; 2599	50-20000	21
Mn	2605 ; 2576	5-500	1
P	1782	5-500	3
Sr	4077	0,5-50	0,2
Ti	3234	5-500	4
Zn	2138	5-500	2

1.3. Dosage par spectrométrie de masse (ICP-MS)

1.3.1. Principe

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse reposant sur la séparation, l'identification et la quantification des différents isotopes des éléments constitutifs d'un échantillon en fonction de leur masse. L'ICP-MS est basée sur le couplage d'une torche à plasma générant des ions positifs mono-chargés et d'un spectromètre de masse quadripolaire séparant ces ions en fonction de leur masse.

Les ions formés dans le plasma (voir paragraphe 1.2.1) sont extraits par une interface constituée de 2 cônes (échantillonneur et écorceur) permettant le passage de ces ions vers le système de séparation. Un système de vide différentiel accélère les ions vers un système optique (ensemble de lentilles et de miroir électrostatiques) qui rend homocinétique le faisceau d'ions extraits et le focalise vers le quadripôle tout en éliminant les photons et éléments neutres

indésirables. Le quadripôle est constitué de 4 barres cylindriques séparées en 2 paires polarisées de signe opposé. Par application de tensions ayant des composantes continues et alternatives, seuls les ions ayant le rapport masse/charge (m/z) désiré passent à travers le quadripôle et seront transmis au détecteur. Souvent il y a formation des ions positifs mono chargés donc la séparation sera en fonction de la masse des espèces. La modification de ces tensions au niveau du quadripôle permet une analyse successive des différents rapports m/z. La détection des ions positifs s'effectue grâce à un multiplicateur d'électrons à dynodes discrètes (DDEM = Discrete Dynode Electron Multiplier). Les dynodes sont soumises à une tension négative de quelques milliers de volts. A la sortie du quadripôle, un ion positif, attiré par la tension négative, heurte la surface semi-conductrice de la première dynode. Cet ion provoque l'émission d'un ou de plusieurs électrons secondaires qui heurtent à nouveau la paroi de la deuxième dynode : un effet « boule de neige » se produit. Les électrons émis atteignent à la fin un collecteur équipé d'un préamplificateur. Le signal se traduit en nombre de coups, proportionnel au nombre d'ions, et une interface informatique assure le transfert des données afin qu'elles soient traitées. Les nombres de coups sont convertis en concentrations grâce à l'utilisation des solutions étalons. Cependant on ne peut doser que les éléments pour lesquels l'étalonnage a été soigneusement réalisé.

L'ICP-MS n'est cependant pas exempte de problèmes. Au sein du plasma ou du faisceau ionique sortant du plasma, des recombinaisons peuvent avoir lieu entre les éléments provenant du plasma (Ar), de l'air (O_2, N_2, CO_2), du solvant, et même de l'échantillon lui-même. Ceci abouti à la formation des ions polyatomiques (oxydes, hydroxydes, argides, hydrures, halogénures) ayant un rapport m/z identique à celui des éléments recherchés et donc leur présence entraine une surestimation de ces éléments. En plus des ions polyatomiques, des interférences isobariques peuvent avoir lieu quand 2 isotopes de 2 éléments différents ont le même rapport m/z. Le plus souvent, il est possible de trouver un isotope ne représentant pas d'éventuel recouvrement. Concernant les interférences dues aux ions polyatomiques, une cellule de collision réaction (Interface Collision Reaction, CRI) est utilisée en ajoutant de gaz (hélium ou dihydrogène) au niveau des cônes de l'interface pour réduire ces interférences. De plus, des ions doublements chargés, ayant des rapports m/z identiques à ceux des ions mono-chargés des éléments recherchés, peuvent être générés dans le plasma. Ce type d'interférence peut être réduit par optimisation des conditions de plasma lors de l'optimisation initiale de l'appareil.

1.3.2. Conditions opératoires

Les analyses sont réalisées en utilisant un spectromètre de masse avec un plasma à couplage inductif modèle Varian® 820-MS.

Pour la plupart des isotopes analysés, il existe une ou plusieurs interférences polyatomiques. Ceci a exigé un choix précis du gaz de collision qui minimisait les interférences, mais en même temps permettais de conserver une bonne sensibilité de détection des éléments. Afin de pouvoir déterminer la concentration des éléments présents dans les échantillons analysés, l'appareil a été calibré par une gamme étalon multi-élémentaires. L'isotope, le gaz de collision et la gamme d'étalonnage retenus, ainsi que la LDQ pour chaque élément sont présentés dans le Tableau II-4.

Tableau II-4 : Caractéristiques de la méthode de dosage des éléments par ICP-MS.

Eléments	isotope	Gaz de collision	Gamme d'étalonnage (ppb)	Limites de quantification (ppb)
Ag	^{107}Ag	Air	0,2-50	0,077
As	^{75}As	Air	0,2-50	0,162
Bi	^{209}Bi	Air	0,2-50	0,145
Cd	^{110}Cd	Air	0,2-50	0,038
Co	^{59}Co	Air	0,2-50	0,059
Cr	^{52}Cr	Hélium	0,2-50	0,006
Cu	^{65}Cu	Hélium	0,2-50	0,039
Nb	^{93}Nb	Air	0,2-5	0,087
Ni	^{60}Ni	Hélium	0,2-50	0,032
Pb	^{208}Pb	Air	0,2-50	0,072
Rb	^{85}Rb	Air	0,2-50	0,059
Sb	^{121}Sb	Air	0,2-50	0,112
Sc	^{45}Sc	Air	0,2-10	0,084
Sn	^{118}Sn	Air	0,2-50	0,105
Te	^{128}Te	Air	0,2-10	0,084
Tl	^{205}Tl	Air	0,4-20	0,121
V	^{51}V	Hélium	0,2-50	0,005

2. Dosage des ions inorganiques

Nous nous sommes intéressés également à l'analyse des ions majeurs hydrosolubles tels que les chlorures Cl^-, les nitrates NO_3^-, les sulfates SO_4^{2-}, les phosphates PO_4^{3-}, l'ammonium NH_4^+, le sodium Na^+, le magnésium Mg^{2+}, le potassium K^+ et le calcium Ca^{2+}. Ceci nous permet d'identifier les sources d'émission des particules collectées et de déterminer leur composition

afin de comprendre leurs effets sur les cellules pulmonaires. Une mise en solution préalable des échantillons est indispensable.

2.1. Préparation des échantillons

2.1.1. Lixiviation

L'analyse des ions inorganiques nécessite leur mise en solution. Ils ont été extraits en utilisant le protocole suivant : une portion du filtre d'arrêt (environ 1/17 de filtre) ou environ 7 mg de PF sont pesés et déposés dans un bécher puis sont recouverts de 5 mL d'eau ultra pure. Après un traitement aux ultrasons de 30 min, le lixiviat est aspiré à l'aide d'une seringue et filtré sur une membrane en acétate de cellulose Sartorius® (0,2 µm ; 25 mm), déjà rincée 3 fois à l'eau ultra pure. Le filtrat contenant les ions solubilisés est récupéré dans un flacon en polyéthylène. La membrane d'acétate de cellulose (retenant les particules après filtration) est remise dans le bécher avant de procéder à deux nouvelles extractions aux ultrasons avec la même portion de filtre ou de particules de départ, en suivant le même protocole. Enfin, les filtrats obtenus sont rassemblés et conservés à 4^0C jusqu'à l'analyse par chromatographie ionique. Le matériel utilisé (bécher, seringues, filtres, flacons de polyéthylène) est lavé 3 fois à l'eau ultra pure avant son utilisation (Ledoux *et al.*, 2006). Des blancs, de solvant et matériel et de filtre vierge, ont subi le même protocole appliqué pour les échantillons, pour prendre en considération l'éventuelle contamination durant les phases de préparation et d'analyse des échantillons et celle provoquée par les fibres des filtres.

2.2. Dosage par chromatographie ionique

Cette technique a été utilisée pour l'identification et la quantification des différentes espèces anionique et cationiques déjà citées.

2.2.1. Principe

La chromatographie ionique repose sur les différences d'affinité des ions pour une phase stationnaire. C'est un solide échangeur d'ions constitué d'un substrat portant des groupements ionisables. Ces derniers, ont la propriété d'échanger de façon réversible certains de leurs ions au contact d'autres ions de charge opposée provenant d'une solution. Les ions présents dans

l'échantillon sont fixés sur les groupements ionisables de la phase stationnaire. Ensuite, ils sont entraînés par l'éluant qui est constitué d'un milieu aqueux ionique qui entre en compétition avec les ions d'intérêts pour le nombre limité de sites ioniques de la phase stationnaire. L'élution des espèces dépend de leur affinité au solide échangeur d'ions. Plus grande est la densité de charge d'un soluté, plus il se retrouve retenu par la phase stationnaire.

La détection des composés ioniques, basée sur la mesure de leur conductivité, est rendue difficile par leur faible concentration, en regard de l'abondance des ions présents dans la phase mobile. L'emploi d'un suppresseur est alors nécessaire. Ce dernier a pour rôle de convertir l'éluant fortement ionique en une espèce électriquement neutre de façon à ne détecter que les ions de l'échantillon. Son utilisation permet un gain considérable de sensibilité avec une diminution du bruit de fond et une augmentation du signal des espèces à analyser.

2.2.2. Conditions opératoires

Une analyse simultanée des anions (Cl^-, NO_3^-, PO_4^{3-} et SO_4^{2-}) et des cations (Na^+, NH_4^+, K^+, Mg^{2+} et Ca^{2+}) a été réalisée à l'aide d'un chromatographe de modèle Dionex® DX 100 couplé à Dionex® ICS 900, muni de suppresseurs électrochimiques et d'une détection conductimétrique. La méthode analytique que nous avons appliquée, a été adaptée des préconisations DIONEX.

Pour l'analyse des anions, une solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) et du bicarbonate de sodium ($NaHCO_3$) de concentrations respectives de 3,5 mM et 1 mM a été utilisée comme phase mobile avec un débit de 1,2 mL/min. Un suppresseur électrochimique ASRS-ULTRA II® a été utilisé pour diminuer le signal de la phase mobile. D'autre part, la phase mobile utilisée pour l'analyse des cations est une solution d'acide méthane sulfonique (CH_3SO_3H) 20 mM à 1,2 mL/min. Afin de neutraliser les ions de la phase mobile, le suppresseur électrochimique CSRS 300® a été utilisé.

La quantification des ions est effectuée à l'aide des courbes d'étalonnage, obtenues en analysant des standards contenant les différentes espèces analysées. En effet, une solution mère d'anions et une autre de cations de 500 mg/L ont été préparées respectivement à partir des sels de NaCl, $NaNO_3$, Na_2SO_4 et Na_3PO_4 et de NaCl, KCl, NH_4Cl, $MgCl_2(6H_2O)$ et $CaCl_2$ (EMSURE® MERCK). L'étalonnage a été réalisé pour la gamme de concentration 0,2 - 50 ppm (0,2 ; 0,5 ; 1 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; 25 et 50 ppm). Les LDQ sont calculées pour chaque ion, à partir de l'écart-type de 10 blancs d'eau ultra pure Milli-Q® analysés en chromatographie ionique en utilisant les mêmes

conditions que celles des échantillons. La formule utilisée est la suivante : LDQ = 10 x Ecart-type. Les LDQ pour l'ensemble des ions analysés sont présentées dans le Tableau II-5.

Tableau II-5 : Limites de détection (ppm) des ions analysés

Ions	Na^+	NH_4^+	K^+	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Cl^-	NO_3^-	PO_4^{3-}	SO_4^{2-}
LDQ (ppm)	0,01	0,01	0,02	0,003	0,003	0,01	0,003	0,01	0,003

3. La microanalyse élémentaire CHNS-O

3.1. Principe

La microanalyse élémentaire permet de déterminer les teneurs des éléments tels que le carbone (C), l'hydrogène (H), l'azote (N) le soufre (S) et l'oxygène (O) dans un échantillon. Son principe est basé sur des réactions d'oxydo-réduction des éléments à doser, aboutissant à la formation des gaz qui seront ensuite séparés et analysés par chromatographie en phase gazeuse.

Pour l'analyse CHNS, les échantillons enroulés par une capsule d'étain, sont introduits à l'aide d'un injecteur dans un four à 950°C en présence d'un excès d'oxygène. A cette température, l'étain s'atomise aboutissant à une élévation de la température du four jusqu'à 1800ºC environ, ce qui entraîne alors l'atomisation des éléments à doser (C, H, N et S). Ces derniers sont entrainés par un flux d'hélium, le gaz vecteur, vers une colonne d'oxydo-réduction qui contient de l'oxyde de cuivre et du cuivre. En présence du dioxygène (O_2), le dioxyde de cuivre assure l'oxydation du C, H, N et S en CO_2, vapeur d'eau (H_2O), NO_x (avec x = 1, 2 ou 3) et SO_2 respectivement (dans ce dernier cas, l'ajout d'un catalyseur vanadium pentoxyde est nécessaire). Alors que le cuivre de la colonne d'oxydo-réduction sert à réduire d'une part les oxydes d'azote en N_2 et d'autre part l'excès d'O_2. Les gaz formés (CO_2, H_2O, N_2 et SO_2) sont séparés par la suite à l'aide d'une colonne de chromatographie en phase gazeuse, puis quantifiés par un détecteur à conductivité thermique (TCD : Thermal Conductivity Detector), encore appelé catharomètre.

3.2. Conditions opératoires

Les analyses sont réalisées à l'aide d'un analyseur élémentaire organique Thermo Fisher® Flash 2000 selon les préconisations du constructeur. Cet analyseur est équipé d'une colonne en

quartz d'oxydo-réduction et de deux colonnes chromatographiques : une pour l'analyse CHNS et une autre colonne pour l'O. Les résultats sont analysés par le logiciel EagerXperience. Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à doser le carbone total (C total) dans les PF et les PUF. Environ 2 mg de PF et 1 cm^2 (1/200 du filtre) du filtre d'arrêt retenant les PUF sont enroulés dans deux capsule d'étain et introduits dans le four de l'analyseur. Pour prendre en considération l'éventuelle contamination durant les phases de préparation et d'analyse des échantillons de PF, et afin de déterminer la contribution des filtres à la teneur en C total dans les échantillons de PUF, les mêmes analyses ont été réalisées pour des capsules d'étain vides et pour un filtre vierge.

Afin de déterminer la teneur du C total dans chaque échantillon, le microanalyseur est calibré par l'intermédiaire des standards de référence certifiés : la sulfanilamide ($C_6H_8N_2O_2S$; 41,77% de C) pour les PF et la cystine ($C_6H_{12}NO_4S_2$; 30,05% de C) pour les PUF. Les détails de la calibration sont résumés dans le Tableau II-6. La limite de quantification du microanalyseur pour le C total a été calculée à partir de l'écart-type des mesures du C total de 10 capsules d'étain vides analysées : LDQ = 10 x écart-type. La LDQ de notre microanalyseur était de 12,23 µg de carbone qui est inférieure à la quantité de carbone détectée dans les échantillons analysés.

Tableau II-6 : Les gammes d'étalonnage pour l'analyse du C total

Sulfanilamide	Masse du C (µg)	Cystine	Masse du C (µg)
Standard 1	111	Standard 7	19
Standard 2	202	Standard 8	60
Standard 3	623	Standard 9	138
Standard 4	875	Standard 10	155
Standard 5	1449	Standard 11	256
Standard 6	2163		

4. Dosage des composés organiques

L'identification et la quantification des composés organiques HAP, PCDD, PCDF et PCB présents dans les particules collectées ont été réalisées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de Masse (Gaz Chromatography Mass Spectrometry, GC-MS). Notons que les analyses des HAP ont été réalisées aux Centre Commun de Mesure et micropolluant alors que les analyses des PCDD, PCDF et PCB ont été réalisées chez micropolluant.

Tout d'abord, une étape de préparation des échantillons est indispensable. Un schéma résumant les traitements qu'ont subi les PF et les PUF pour déterminer leur composition en composés organiques est présenté sur la Figure II-10.

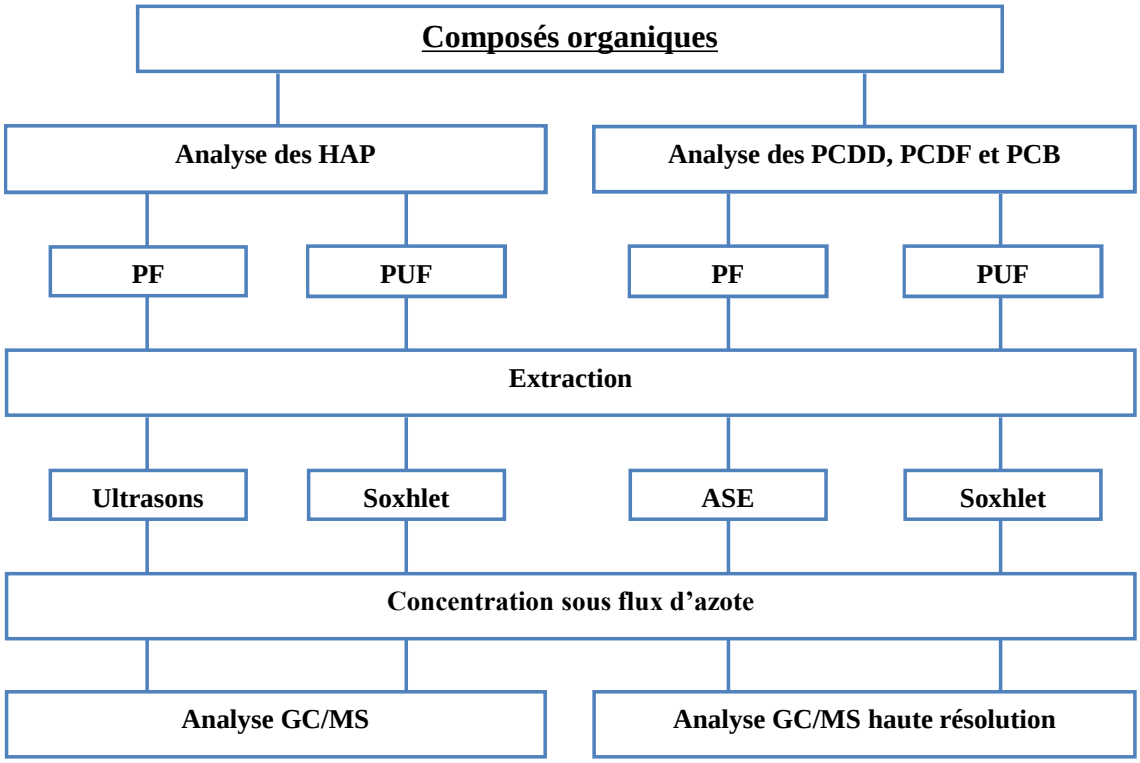


Figure II-10 : Schéma récapitulatif des analyses des composés organiques des PF et des PUF.

4.1. Préparation des échantillons

4.1.1. Extraction des particules pour les analyses des HAP

Cas des particules fines : 10 mg de PF sont extraits dans du dichlorométhane aux ultrasons pendant 1 h après addition d'une solution de standard interne (mélange de HAP deutérés). Les extraits sont ensuite concentrés jusqu'à 20 mL. 1 mL de toluène est ajouté avant de concentrer sous flux d'azote jusqu'à 1 mL environ.

Cas des particules ultrafines : 1/8 des filtres d'arrêt retenant les PUF sont extraits dans du dichlorométhane au soxhlet pendant 16 h après addition d'une solution de standard interne (mélange de HAP deutérés). Les extraits sont ensuite concentrés jusqu'à 20 mL. 1 mL de toluène est ajouté avant de concentrer sous flux d'azote jusqu'à 1 mL environ.

4.1.2. Extraction des particules pour l'analyse des PCDD, PCDF et PCB

Cas des particules fines : 10 mg de PF sont agités magnétiquement pendant 2h dans 4 mL de HCl M/10 puis filtrés sur un filtre en fibre de verre. Après séchage, les marqueurs d'extraction (mélanges de dioxines, furanes et PCB-C^{13}) sont ajoutés et le filtre retenant les PF est extrait à l'ASE avec du toluène. L'extrait est ensuite concentré, sous flux d'azote, jusqu'à environ 20 mL, puis purifiée sur une première colonne de silice en éluant à l'hexane. L'éluat est à nouveau concentré à environ 20 mL avant qu'il ne soit purifié et séparé sur une colonne d'alumine : les PCBs sont élués avec du toluène et concentrés jusqu'à 100 µL, alors que les PCCDs et PCDFs sont élués avec un mélange de dichlorométhane/hexane et concentrés jusqu'à 10 µL.

Cas des particules ultrafines : Le filtre est imbibé avec 1 mL de HCl 12N puis laissé à sécher pendant une nuit. Ensuite, les marqueurs d'extractions (mélanges de dioxines, furannes et PCB-C^{13}) sont ajoutés et les composés sont extraits du filtre en présence de toluène au soxhlet pendant 24h. Les étapes de purification et de séparation sont identiques à celles décrites pour les PF.
Les extraits obtenus sont ensuite analysés par GC-MS pour identifier et quantifier leurs contenus en composés organiques.

4.2. Dosage par GC-MS

4.2.1. Principe

L'analyse chromatographique permet de séparer les analytes suivant leurs caractéristiques physico-chimiques en jouant sur leur différence de partage entre une phase stationnaire et une phase mobile et en appliquant un gradient de température au niveau de la colonne chromatographique. Les composés sont portés à l'état gazeux au niveau du système d'injection et sont transportés par un gaz vecteur inerte (l'hélium dans notre cas) dans la colonne chromatographique où ils sont retenus par la phase stationnaire. Le temps de rétention des composés est plus ou moins long suivant leurs affinités pour celle-ci et dépend aussi de la température de la colonne ; ce temps de rétention est ainsi caractéristique d'un composé, et est répétable et fiable au cours d'une série d'analyse.

Les composés sont ensuite identifiés grâce à un spectromètre de masse, détecteur universel et très sensible. Son principe réside dans l'ionisation des composés sous vide, par

impact électronique émis par un filament. Les ions formés sont ensuite séparés suivant leurs rapports m/z dans un champ électrique quadripolaire, puis, détectés par un multiplicateur d'électron qui permet la conversion du courant ionique en signal électrique. Un chromatogramme, représentant l'abondance du courant ionique total en fonction des temps de rétention chromatographique, est obtenu à l'issu de l'analyse. Les ions de rapport m/z caractéristiques des composés recherchés peuvent ensuite être extraits du signal total, et l'identification du pic du composé se fait sur la base du temps de rétention.

4.2.2. Conditions opératoires

-**Analyse des HAP** : les analyses ont été réalisées avec un chromatographe Agilent Technologies 6890, équipé d'une colonne capillaire Rxi®-XLB Agilent Technologies (longueur 30 m, diamètre interne 0,25 mm, épaisseur de film 0,25 µm) et couplé à un spectromètre de masse Agilent Technologies 5973 dans le cas des HAP.

-**Analyse des extraits organiques des échantillons composites des PUF** : les extraits organiques ont été analysés à l'aide d'un chromatographe Varian 3400 équipé d'une colonne capillaire FactorFour™ Varian, VF-5ms (longueur 30 m, diamètre interne 0,25 mm, épaisseur de film 25 µm) et couplé à un spectromètre de masse 1200 Triple Quad, Varian.

-**Analyse des PCDD, PCDF et des PCB** : un chromatographe Agilent Technologies 7890A, équipé d'une colonne capillaire DB 5MS Agilent Technologies (longueur 40 m, diamètre interne 0,18 mm, épaisseur de film 0,18 µm) et couplé à un spectromètre de masse à haute résolution Agilent Technologies P800 est utilisé.

Pour une analyse, 1µL d'échantillon est injecté. La quantification des analytes est basée sur le principe de l'étalonnage interne. Des étalons internes, mélange de HAP deutérés ou des mélanges de dioxines, furanes et PCB-C13 sont ajoutés en quantité connue dans l'échantillon en début de manipulation afin de quantifier respectivement les teneurs en HAP ou en dioxines, furanes et PCB extraits des particules. Les étalons internes doivent avoir un comportement similaire aux composés natifs qu'ils servent à quantifier. Ainsi toute perte d'un composé natif est compensée par une perte équivalente en son étalon interne, et la quantification du composé natif est juste. Lors de chaque série d'analyse, des solutions standards de composés natifs mélangés

aux solutions de standards internes sont analysés afin de pouvoir déterminer les teneurs en composés organiques cherchés.

Dans le cas des extraits organiques qui ont servi pour les tests de toxicologie, les solutions de standards internes n'ont pas été ajoutées pour ne pas contaminer nos extraits. La quantification est donc réalisée par étalonnage externe par l'injection d'un mélange de standards certifiés.

5. Mesure de la surface spécifique

5.1. La surface spécifique

La surface spécifique représente la surface totale en m^2 par unité de masse d'un solide. Elle est déterminée d'une part, à partir de la surface géométrique des grains (fonction de la distribution granulométrique et de leur forme) et d'autre part, à partir de la surface développée par les parois des pores. Il s'agit donc de considérer toute la surface de chaque particule, porosité ouverte comprise.

5.2. Principe

La technique de Brunauer, Emmet et Teller (BET) est largement utilisée pour la détermination de la surface spécifique d'un aérosol. Cette méthode repose sur l'évaluation de la quantité d'un gaz inerte physisorbée à la surface des particules ce qui permet d'obtenir une information sur leur surface spécifique. L'échantillon dégazé (chauffé pour éliminer les composés adsorbés à sa surface) est soumis à un mélange de gaz constitué de 70% d'hélium (le gaz vecteur) et 30% du diazote (N_2, le gaz adsorbé). La mesure se déroule en deux étapes : l'adsorption et la désorption, au cours desquelles la variation de la conductivité thermique du mélange gazeux est mesurée. L'adsorption se déroule à la température de l'azote liquide (-196°C) ce qui permet au N_2 gazeux d'être physisorbé à la surface des particules. Lorsque cette étape est terminée, l'échantillon est remis à température ambiante favorisant ainsi la désorption du N_2. La quantité du N_2 adsorbée et désorbée est quantifiée par un catharomètre.

5.3. Conditions opératoires

Les mesures sont réalisées à l'aide d'un appareil ANKERSMIT Quanta Sorb Junior selon les préconisations du constructeur. Environ 10 mg de PF sont pesées dans des cellules en verre et sont ensuite dégazés pendant 30 minutes à 150°C sous flux de N_2 pur (N60 : 99,99990 %). Afin de pouvoir déterminer la surface spécifique des particules à partir du signal donné par le détecteur, une calibration était faite en injectant 0,5 mL de N_2. Chaque analyse a été réalisée deux fois et une surface spécifique moyenne a été représentée. Sachant que la surface occupée par une molécule de N_2 est de $16{,}2.10^{-20}$ m², le nombre de molécules adsorbées peut être évalué pour déterminer l'aire spécifique totale (en m^2/g) qui pourra être déterminée en appliquant la formule suivante :

$$S\,(m^2/g) = \frac{S_{\text{échantillon}}}{m_{\text{échantillon}}}$$

$$\text{avec} \quad S_{\text{échantillon}}\,(m^2) = 3{,}98\left(1-\frac{P}{P_0}\right)\left(\frac{A^{*}V_{cal}}{A_{cal}}\right)$$

Où S = surface spécifique par unité de masse ; $S_{\text{échantillon}}$ = surface spécifique totale ; P = pression en N_2 ; P_0 = pression de vapeur saturante en N_2 ; A = aire du pic en désorption ; A_{cal} = aire du pic de calibration ; V_{cal} = volume de calibration ; $m_{\text{échantillon}}$ = masse de l'échantillon dégazé.

6. Analyse par MEB - EDX

La Microscopie Electronique à Balayage associée à une microanalyse par Energie Dispersive de rayons X (MEB-EDX) a été utilisée pour déterminer la morphologie et la granulométrie des particules recueillies mais aussi pour accéder à leur composition individuelle.

6.1. Principe

Un faisceau électronique de quelques nanomètres de diamètre balaie la surface de l'échantillon. Lorsque les électrons viennent frapper l'échantillon, ils provoquent plusieurs phénomènes :

- l'échantillon émet lui-même des électrons secondaires.

- une partie des électrons primaires est réfléchie (rétrodiffusion).
- les électrons sont absorbés par l'échantillon.
- l'échantillon émet des rayons X.

Tous ces phénomènes sont interdépendants de la topographie, du numéro atomique et de l'état chimique de l'échantillon. Les électrons secondaires sont ainsi exploités pour l'obtention d'images topographiques, tandis que les électrons rétrodiffusés permettent d'obtenir une image basée sur la différence de numéro atomique des éléments composant l'échantillon (image par contraste chimique). Les rayons X émis permettent, quant à eux, d'accéder à la composition chimique de l'échantillon.

6.2. Préparation de l'échantillon

Environ 1 mg de particules sont mis en suspension dans un solvant inerte (n-hexane) à l'aide d'un traitement aux ultrasons de 5 minutes. La solution est ensuite filtrée sur une membrane de polycarbonate (Nucléopore, 0,22 µm). Cette dernière est ensuite fixée sur un plot en aluminium de 1 cm de diamètre à l'aide d'une pastille de carbone autocollante. L'échantillon est ensuite métallisé au carbone de manière à le rendre conducteur et est placé dans la chambre du microscope.

6.3. Conditions opératoires

Les analyses par MEB-EDX ont été réalisées sur un appareil LEO 438 VP muni d'un détecteur X Gresham piloté par le système ISIS de la société Oxford. Les analyses ont été effectuées à la Maison de Recherche en Environnement Naturel de l'ULCO.

Le Tableau II-7 suivant résume les analyses chimiques qui ont été faites sur les PF et les PUF (échantillons individuels et composites).

Tableau II-7 : Tableau récapitulatif des analyses chimiques réalisés sur les échantillons individuels et les échantillons composites de PF et de PUF urbains et rurals.

	Echantillons individuels de PF		Composites de PF-U et PF-R	PUF sur filtre			PUF récupérées dans l'eau
				Echantillons individuels de PUF		Composites de PUF-U et PUF-R	
	PF-U_1 à U_5	PF-R_6 à R_9		PUF-U_1 à U_5	PUF-R_6 à R_9		
Eléments majeurs	×	×	×	×	×		
Eléments mineurs	×	×	×	×	×		
Ions	×	×	×	×	×		
Carbone total	×	×	×	×	×		
HAP	×		×	×		×	
PCDD, PCDF et PCB			×			×	
Surface spécifique			×				
Granulométrie			×				

Partie D :

Etude toxicologique des particules atmosphériques

1. Matériel biologique et méthode de culture cellulaire

1.1. Choix du matériel biologique

L'étude de la toxicité des aérosols atmosphériques collectés au Liban a été réalisée sur une lignée de cellules pulmonaires humaines nommées BEAS-2B (European Collection of Cell Cultures ECACC, Wiltshire, UK - référence 95102433) (Figure II-11). Ce sont des cellules épithéliales bronchiques humaines obtenues à partir d'autopsie de personnes non cancéreuses puis transformées suite à une infection par le virus hybride Ad12-SV40. Ces cellules sont alors immortalisées tout en conservant les caractéristiques des cellules épithéliales bronchiques (Reddel *et al.,* 1988) dont leurs caractéristiques métaboliques ont été déjà prouvées (Garcia-Canton *et al.,* 2013 ; Uppstad *et al* ., 2010).

La lignée cellulaire BEAS-2B est considérée comme étant un modèle approprié et adéquat pour l'étude de la toxicité des substances inhalables *in vitro* (Garcia-Canton *et al.,* 2013). De nombreux composés chimiques simples ou en mélanges plus ou moins complexes ont ainsi été étudiés, notamment le B[a]P, le TétraChloro Dibenzo-*p*-Dioxine (TCDD), des extraits organiques de PM, des nanoparticules manufacturées et des PM (Dergham *et al.,* 2012 ; Dieme *et al.,* 2012 ; Fuentes-Mattei *et al.,* 2010 ; Garcia-Canton *et al.,* 2013 ; Kim *et al.,* 2011 ; Park *et al.,* 2008 ; Uppstad *et al.,* 2010).

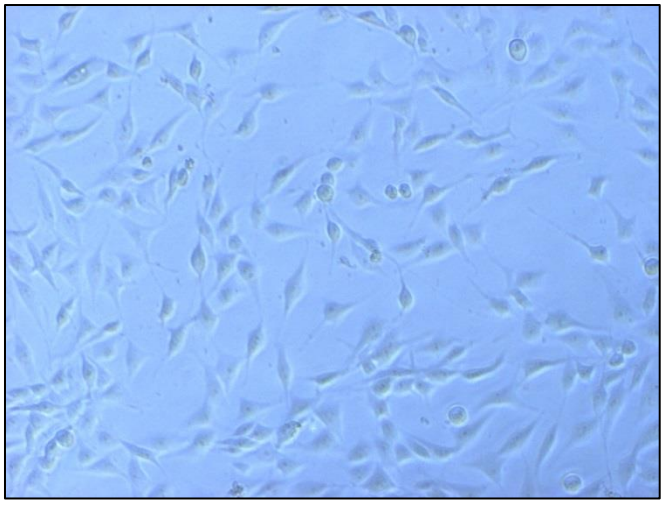


Figure II-11 : Cellules BEAS-2B en culture observées au microscope optique inversé (x100)

1.2. Culture des cellules BEAS-2B

Les cellules BEAS-2B ont été ensemencées, selon les paramètres étudiés, dans des flacons de culture stériles de 75 cm^2 (Corning® CellBIND®, ThermoFisher Scientific ; Illkirch, France) ou dans des microplaques de culture stériles à 96 ou à 12 puits (Corning® CellBIND®). Le milieu de culture utilisé est le Bronchial Epithelial cell Growth Medium (BEGM) qui est un milieu défini obtenu après supplémentation du Bronchial Epithelial cell Basal Medium (BEBM ; Lonza ; USA de 500 mL) avec de l'insuline (0,5 mL), de l'extrait de l'hypophyse de bœuf (2 mL), de l'hydrocortisone (0,5 mL), du sulfate de gentamicine (0,5 mL), de l'amphotéricine GA-100 (0,5 mL), de l'acide rétinoïque (0,5 mL), de la transferrine (0,5 mL), de la triiodothyronine (0,5 mL), de l'épinéphrine (0,5 mL) et du facteur de croissance épidermique recombinant humain (hEGF) (0,5 mL). Le milieu de culture a de plus été supplémenté avec de la fongizone 1 %. Les cellules en culture ont été incubées dans des conditions de culture classiques (Température = 37 ºC, CO_2 = 5 % et humidité = 100 %).

Afin d'appliquer nos protocoles d'exposition, des repiquages successifs des cellules ont été réalisés à partir d'une même ampoule de cellules afin d'obtenir un nombre suffisant de cellules en phase exponentielle de croissance. Ces cultures de cellules BEAS-2B nécessitent un repiquage avant d'atteindre 80% de confluence, puisque les cultures confluentes subissent rapidement la différentiation terminale épidermoïde.

2. Méthodes d'analyse toxicologique

2.1. Détermination de la cytotoxicité globale

La détermination de la cytotoxicité des particules atmosphériques collectées au Liban consiste à exposer les cellules BEAS-2B à différentes concentrations de particules pendant différents temps d'exposition afin d'évaluer leur toxicité par l'intermédiaire de deux tests complémentaires de cytotoxicité.

Rappelons que pour les analyses toxicologiques, seuls les échantillons composites de particules (des deux origines : urbaine et rurale) ont été utilisés. Donc pour les particules fines, deux échantillons ont été étudiés : le composite de PF-U et celui de PF-R. Quant aux particules ultrafines, deux types d'échantillons composites ont été utilisés pour chaque site : les composites de PUF-U et de PUF-R récupérées dans l'eau ainsi que leurs extraits organiques.

Les tests de cytotoxicité ont été réalisés dans des microplaques de culture à 96 puits (Corning® CellBIND®, ThermoFisher Scientific ; Illkirch, France) et les cellules ont été ensemencées de manière homogène (100 µL/puit) de façon à avoir le jour du test environ $4x10^4$ cellules/puit.

2.1.1. Particules fines

La cinétique d'exposition choisie était de 24, 48 et 72h. Cette cinétique nous a conduit à utiliser 3 plaques pour chaque échantillon de PF. Les cellules ont été exposées à 7 concentrations différentes de PF : 1,5 ; 3 ; 6 ; 12 ; 24 ; 48 et 96 µg/cm^2 (volume final est de 200 µL/puit). En effet, une solution mère de 96 µg de particules /cm^2 a été préparée dans du milieu de culture en homogénéisant la préparation par traitement aux ultrasons. Des dilutions successives ont été réalisées à partir de la solution mère afin d'obtenir la gamme de concentrations voulue. Le schéma des plaques dans le cas des particules fines est représenté dans la Figure II-12.

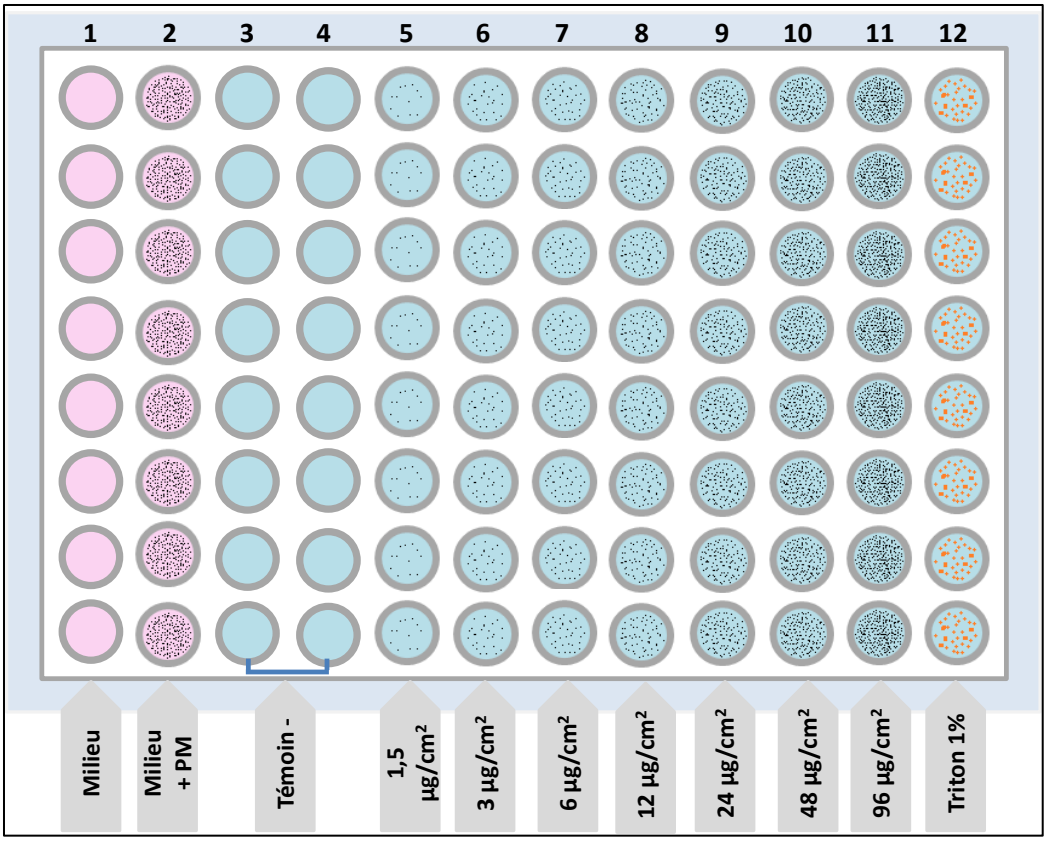


Figure II-12 : Schéma de microplaque pour l'étude de la cytotoxicité des particules fines.

Dans chacune des microplaques, chaque condition a été représentée par 8 puits (8 réplicats par condition) à l'exception du témoin négatif, où 16 puits ont été ensemencés par des cellules BEAS-2B dans du milieu de culture en l'absence de polluant. De plus, 8 puits contenant des cellules ont été exposés au triton X100 (concentration finale de 1 %) et ont servis de témoins positifs de mortalité. D'autre part, les puits des deux premières colonnes de chaque microplaque contiennent respectivement du milieu de culture seul ou additionné de PM à 96 µg/cm^2 en suspension dans du milieu de culture.

2.1.2. <u>Particules ultrafines</u>

Dans le cas des échantillons composites de PUF-U et de PUF-R récupérées dans l'eau, les cellules ont été exposées à la gamme de concentrations suivante : 0,375 ; 0,75 ; 1,5 ; 3 ; 6 ; 12 ; 24 ; 48 et 96 µg/cm^2 selon une cinétique de 24, 48 et 72 h. Tandis que, pour les extraits organiques de PUF-U et de PUF-R, une cinétique d'exposition de 24, 48 et 72 h a été étudiée pour une gamme de concentration de 0,003 ; 0,006 ; 0,125 ; 0,025 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,4 et 0,8 ng

d'HAP/cm^2. Cette dernière gamme a été choisie de façon à couvrir les teneurs en HAP présentes dans 3 µg/cm^2 et 12 µg/cm^2 de PF-U (le choix de ces deux dernières concentrations de PF, sera détaillé ultérieurement). Un schéma de plaque identique à celui des PF a été réalisé pour les PUF mais en remplaçant les deux premières colonnes par les deux concentrations supplémentaires de PUF. Notons que la même procédure a été réalisée en exposant les cellules pendant 48 h aux extraits de filtre vierge ayant subi les mêmes traitements que les filtres retenant les PUF et qui ont servis comme blancs de filtre. Ces derniers seront notés par la suite « filtre blanc-aqueux, FB_{aq} » et « filtre blanc-organique, FB_{org} » correspondant respectivement aux filtres vierges ayant subi les mêmes protocoles de récupération de PUF dans l'eau et d'extraction des composés organiques au soxhlet, que ceux utilisés pour les échantillons composites de PUF-U et de PUF-R.

2.1.3. Tests de Cytotoxicité

La cytotoxicité des particules a été évaluée par deux méthodes colorimétriques complémentaires visant à étudier la perméabilité membranaire et l'activité métabolique mitochondriale.

2.1.3.a. Activité de la Lactate DésHydrogénase (LDH)

- Principe

C'est un test colorimétrique permettant la quantification de la lyse et de la mort cellulaire. Ce test est basé sur la mesure de l'activité de la LDH, une enzyme cytosolique stable, libérée du cytosol des cellules endommagées, dans le milieu de culture.

Dans une première étape, le Nicotineamide Adénine Dinucléotide (NAD^+) est réduit en $NADH/H^+$ par la conversion du lactate en pyruvate catalysée par la LDH libérée à partir des cellules. Ensuite durant la deuxième étape, l'enzyme diaphorase assure le transfert de deux atomes d'hydrogène à partir du $NADH/H^+$ vers le sel de tétrazolium qui sera réduit en sel de formazan dont l'absorbance, mesurée par spectrophotométrie, est proportionnelle à la quantité de lactate déshydrogénase libérée (Figure II-13).

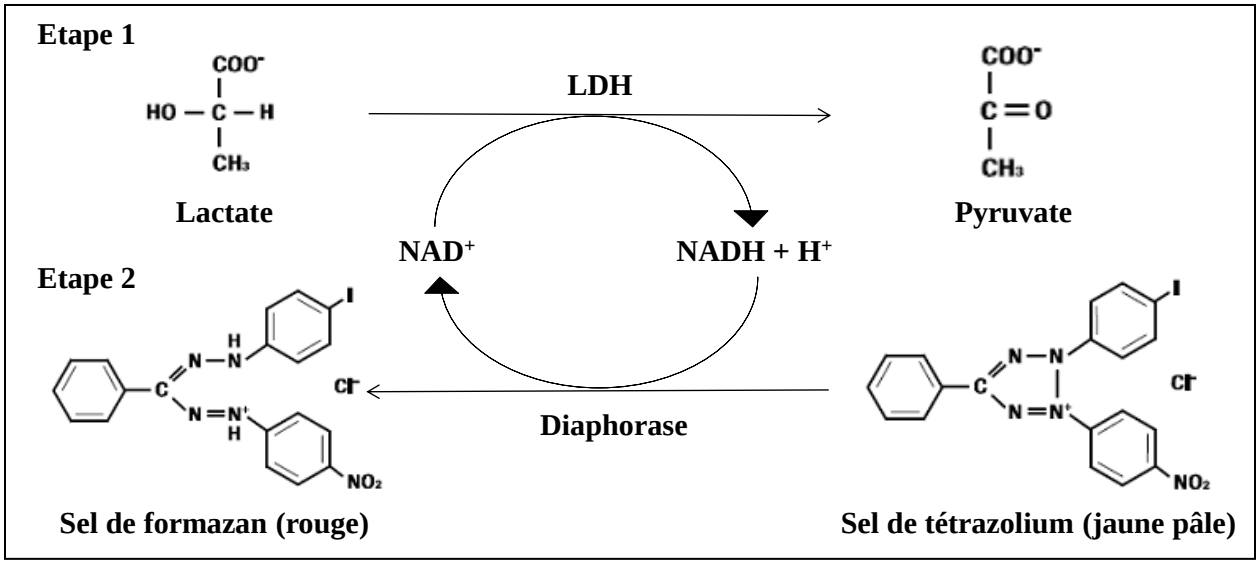


Figure II-13 : Principe du test de l'activité du lactate déshydrogénase.

➢ Protocole expérimental

100 µL/puit de surnageant des cellules ont été transférés dans une microplaque et incubés (à température ambiante et à l'abri de la lumière) avec le mélange réactionnel du kit « cytotoxicity detection kit (LDH) » (Roche Applied Science, Allemagne) en suivant les instructions du fabricant. L'absorbance du formazan formé a été mesurée par spectrophotométrie après 20 puis 30 min d'incubation à la longueur d'onde de 490 nm (longueur d'onde de référence = 630 nm) à l'aide d'un lecteur de microplaque (multiskan spectrum, Thermo Fisher Scientific, Saint Herblain, France). Une augmentation de l'absorbance du formazan reflète l'augmentation de l'activité de la LDH et par conséquent sa libération à partir des cellules, mettant en évidence la perturbation et/ou la perméabilité membranaire en présence du composé toxique étudié.

2.1.3.b. Activité de la DésHydrogénase mitochondriale (DHm)

➢ Principe

C'est un test colorimétrique permettant la quantification de la prolifération et de la viabilité cellulaire. Il est basé sur le clivage du sel de tétrazolium WST-1 (le 1,3-disulfonate de 4-[3-(4-iodophényle)-2-(4-nitrophényle)-2H-5-tétrazolio]-benzène) par la DHm dans les cellules vivantes. Le sel de tétrazolium sera transformé en formazan (rouge foncé) dont l'absorbance,

mesurée par spectrophotométrie, est proportionnelle à l'activité de la DHm et par conséquent à l'activité mitochondriale et la viabilité cellulaire.

- Protocole expérimental

L'activité enzymatique de la déshydrogénase mitochondriale a été déterminée dans les puits des microplaques contenant les cellules après avoir prélevé une partie du surnageant pour le test de la LDH. Le réactif WST-1 du kit (Roche Applied Science ; Allemagne) a été ajouté aux cellules puis incubé à 37 ºC à l'obscurité en suivant les instructions du fabricant. L'absorbance du formazan formé a été mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaque après 2h, 2h30 et 3h d'incubation. Cette absorbance est proportionnelle à l'activité de la DHm dans les cellules vivantes.

2.2. Exposition des cellules aux particules

Après avoir déterminé la cytotoxicité des particules atmosphériques et pour pouvoir évaluer leurs effets toxicologiques sous-jacents, une étape d'exposition des cellules BEAS-2B aux concentrations de particules déjà choisies à partir des tests de cytotoxicité est indispensable. L'exposition des cellules aux particules a été réalisée soit dans des flacons de culture de 75 cm^2, soit dans des plaques de 12 puits, selon les paramètres à étudier.

A partir d'une même ampoule de cellules mères, des repiquages successifs ont été effectués afin d'obtenir suffisamment de cellules en phase exponentielle de croissance pour ensemencer les flacons de culture (75 cm^2) et les plaques de 12 puits. L'ensemencement a été réalisé de façon à avoir le jour de la récupération des cellules, quelque soit la durée d'exposition, environ $8x10^6$ cellules dans les flacons de culture et $4x10^5$ dans les puits des plaques à 12 puits.

Afin d'évaluer l'activité de la télomérase, l'expression des miARNs et la phosphorylation de l'histone H2AX dans les cellules BEAS-2B, l'exposition de ces cellules aux particules a été réalisée dans les flacons de culture de 75 cm^2, tandis que l'évaluation de l'activation métabolique de la fraction organique des particules atmosphériques a été étudiée sur les cellules exposées dans les plaques à 12 puits.

2.2.1. Particules fines

A partir des tests de cytotoxicité, deux concentrations de particules ont été choisies pour chaque échantillon de PF. Les cellules BEAS-2B ont été exposées à ces concentrations pour une cinétique de 24, 48 et 72 h.

Pour chaque temps d'exposition, 4 flacons de culture ou 4 puits des plaques ont été exposés à la même concentration de particules (4 réplicats par condition). D'autre part, les flacons de culture ou les puits des plaques ne contenant que des cellules et du milieu de culture sont considérés comme témoins négatifs (n = 8 flacons de culture et n = 12 puits par temps). De plus, le dioxyde de titane (TiO_2, anatase ; d_{ae} < 2 µm ; pureté : 99 % ; Acros Organics, Noisy Le Grand, France) a été utilisé comme témoin particulaire et les cellules ont été exposées dans des flacons de culture (n = 4 flacons/temps) ou dans des plaques à 12 puits (n = 4 puits/temps) à une concentration en TiO_2 équivalente à la plus grande concentration de PF utilisée. Finalement, les puits des plaques (n = 4 puits/temps) exposés à 1µM de B[a]P (Acros Organics (Noisy-Le- 110 Grand, France) ont servis comme témoins positifs des HAP adsorbés à la surface des particules.

2.2.2. Particules ultrafines

Les cellules BEAS-2B ont été exposées aux particules ultrafines seulement dans les plaques à 12 puits selon une cinétique de 24, 48 et 72 h pour les échantillons composites de PUF-U et de PUF-R récupérées dans l'eau et pour une cinétique de 3, 6, 12, 24, 48 et 72 h dans le cas des extraits organiques de ces composites. Comme dans le cas des PF, deux concentrations de chaque échantillon de particules ultrafines ont été choisies à partir des tests de cytotoxicité.

Pour chaque temps d'exposition, 4 puits par plaques ont été exposés à la même concentration de particules (n = 4 réplicats par condition). De plus, les cellules ont été exposées aux échantillons de FB_{aq} et de FB_{org} (n = 4 puits pour chacun/temps) à une concentration équivalente à la plus grande concentration utilisée respectivement pour les PUF récupérées dans l'eau et pour les extraits organiques des PUF.

Des puits contenants des cellules exposées à 1 µM de B[a]P (n = 4 puits) et d'autres contenants seulement des cellules et du BEGM (n = 8 puits) ont servis respectivement comme témoins positifs des HAP et comme témoins négatifs.

2.2.3. Récupération des cellules

A la fin de chaque temps d'exposition, les milieux de culture des plaques ont été éliminés puis les cellules ont été lavées avec 1 mL du tampon phosphate (1X ; pH = 7,2 ; par dilution du tampon 10X) (PBS ou Phosphate Buffer Saline ; Fisher Scientific, Illkirch, France) avant qu'elles soient stockées en culot sec à -80ºC. Ces cellules ont été utilisées pour étudier l'activation métabolique de la fraction organique des particules atmosphériques.

D'autre part, les cellules contenues dans chaque flacon de culture (environ $8x10^6$ cellules/flacon) ont été récupérées puis lavées avec du PBS 1X. Ces cellules ont été réparties dans des microtubes pour les différents paramètres à étudier de la manière suivante :

- Deux culots secs de $1x10^6$ de cellules chacun, conservés à -80ºC pour l'étude de l'activité de la télomérase et l'expression des miARNs.
- $2x10^6$ de cellules pour l'étude de la phosphorylation de l'histone H2AX. Ces cellules ont été fixées puis perméabilisées avant d'être conservées à -20ºC (voir protocole de fixation et de perméabilisation, paragraphe 2.6.2).
- Le reste des cellules a été conservé -80ºC en stock de réserve.

2.3. Activation métabolique de la fraction organique des aérosols atmosphériques

L'activation métabolique de la fraction organique a été étudiée par l'évaluation de l'expression des gènes de quelques enzymes impliquées dans le métabolisme des HAP (*CYP1A1*, *CYP1B1* et NQO1), des gènes de leur récepteur (AhR) et de leur translocateur nucléaire (ARNT) ainsi que du gène du répresseur d'AhR (AhRR), par la méthode de RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction) en temps réel.

2.3.1. Principe de la RT-PCR en temps réel (technologie TaqMan®)

La PCR conventionnelle ou réaction de polymérisation en chaîne, permet d'obtenir par amplification *in vitro* plusieurs copies d'un fragment d'ADN (appelé aussi amplicon) à partir d'un nombre restreint de copies initiales et cela par l'intermédiaire d'une ADN polymérase ADN-dépendante thermorésistante (la taq polymérase dans notre cas).

La réaction, qui sera détaillée plus tard, se déroule dans un mélange réactionnel contenant des désoxyriboNucléotides TriPhosphates (dNTP), une taq polymérase, du magnésium et un tampon. A ce mélange sont ajoutées des amorces, courtes séquences nucléotidiques encadrant la séquence d'intérêt. Chaque cycle d'amplification se déroule en trois étapes : la dénaturation de l'ADN double brin par chauffage, l'hybridation des amorces et finalement la synthèse de la séquence complémentaire au brin matrice. Ce cycle est répété n fois.

Si la matrice de départ est l'ARN, une étape de transcription inverse sera indispensable, étape durant laquelle une ADN polymérase ARN-dépendante synthétise, à l'aide des dNTP, un brin d'ADN complémentaire (ADNc) de l'ARNm. L'amorce dans ce cas est une séquence de plusieurs 2'-désoxy-Thymidine-5'-TriPhosphates (dTTP), encore dénommée oligo (dT), qui est complémentaire à l'extrémité 3' polyadénylée de l'ARNm, aussi appelée queues poly(A). La RT-PCR est alors une PCR classique précédée par une étape de transcription inverse.

La PCR en temps réel est une PCR conventionnelle nous permettant de suivre la quantité d'ADN synthétisée en continu. Elle repose donc sur la détection et la quantification d'un fluorochrome pendant le processus d'amplification. L'augmentation du signal d'émission fluorescente est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits durant la réaction. Il existe deux systèmes de détection quantitatifs des amplicons : la détection par des agents se liant à l'ADN double brin (exemple : SYBR Green I ; voir les détails dans le paragraphe 2.3.1) et la détection par des sondes fluorescentes. Pour cette dernière catégorie, il existe quatre technologies principales : hydrolyse de sondes (technologie TaqMan®, détaillée dans ce paragraphe), hybridation de deux sondes (HybProbes), balises moléculaires (Molecular Beacons) et amorces scorpion (Scorpion primers ; voir les détails dans le paragraphe 2.5.1). Celle utilisée pour l'étude de l'activité métabolique est la technologie TaqMan®.

Cette technologie est basée sur l'activité 5'-exonucléasique de la Taq polymérase. Cette dernière est capable d'hydrolyser, durant l'étape d'élongation de la PCR, une sonde hybridée à la séquence de l'ADN cible. Cette sonde possède sur son extrémité 5' un fluorochrome émetteur (reporter) dont la fluorescence est inhibée par un second fluorochrome suppresseur (quencher) présent à l'extrémité 3' de la sonde. En effet, le spectre d'émission du reporter chevauche le spectre d'excitation du quencher. Donc une fois stimulé, la fluorescence du reporter est atténuée ou « quenchée » par sa proximité au fluorochrome suppresseur. Durant l'étape d'élongation, la taq polymérase hydrolysera la sonde hybridée sur l'ADN cible, ce qui permettra la libération du

reporter, permettant ainsi l'émission de sa fluorescence qui augmentera à chaque cycle proportionnellement au taux d'hydrolyse de la sonde, et par conséquent au nombre de copies polymérisées durant chaque cycle de PCR (Figure II-14).

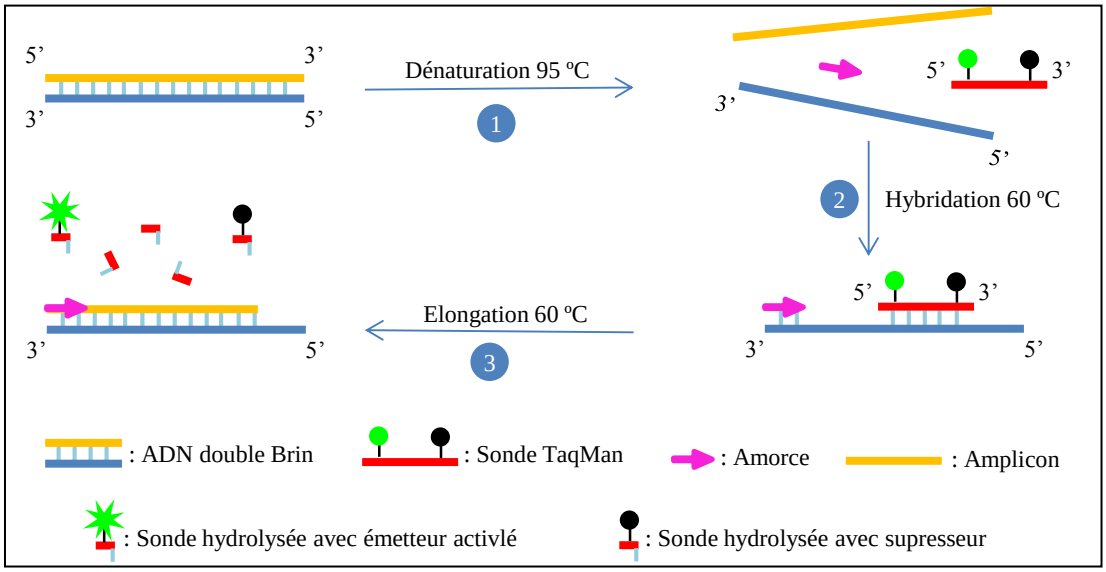


Figure II-14 : Schéma du principe de la PCR en temps réel avec détection par une sonde fluorescente (technologie TaqMan®).
(1) Durant l'étape de dénaturation, la sonde est libre en solution et le fluorochrome émetteur est inhibé par la proximité du suppresseur. (2) À la température d'appariement, la sonde et les amorces s'hybrident à la séquence cible et la proximité des fluorochromes permet l'inhibition de la fluorescence. (3) La polymérase se déplace et hydrolyse la sonde. Le fluorochrome émetteur est libéré de l'environnement du suppresseur permettant ainsi l'émission de la fluorescence. Plus on a des sondes hydrolysées et donc de cible plus on a de fluorescence (adaptée de Poitras et Houde, 2002).

2.3.2. Protocole expérimental

Afin de pouvoir évaluer l'expression des gènes de *CYP1A1*, *CYP1B1*, NQO1, AhR, ARNT et AhRR dans les cellules BEAS-2B par la RT-PCR, une première étape d'extraction des ARN totaux est indispensable. Cette étape sera suivie par une transcription inverse de l'ARNm d'intérêt en son ADNc simple brin. Ensuite le second brin de l'ADNc sera synthétisé par la taq polymérase qui assure l'amplification de l'ADN double brin formé.

L'expression des gènes d'intérêts a été réalisée à l'aide du TaqMan® Gene Expression Cells-to-CT™ Kit (Life Technologies ; St Aubin, France) et des essais prédéfinis (amorces) du TaqMan® Gene Expression Hs00153120_m1 pour *CYP1A1*, Hs00164383_m1 pour *CYP1B1*, Hs00168547_m1 pour NQO1, Hs00169233_m1 pour AhR, Hs01121918_m1 pour ARNT et Hs01005075_m1 pour AhRR (Life Technologies, St Aubin, France). Les protocoles ont été

appliqués en suivant les préconisations du fabricant. L'appareil de PCR en temps réel utilisé est de type 7500 Fast Real-Time PCR (Life Technologies, St Aubin, France).

2.3.2.a. Extraction des ARN totaux

A l'issu de chaque temps d'exposition des cellules BEAS-2B aux particules atmosphériques dans les plaques à 12 puits, c'est-à-dire après 3, 6, 12, 24, 48 et 72h d'exposition, ces dernières ont été stockées à -80 ºC. Après leur décongélation, 100 µL/puit de PBS froid (1X) ont été ajoutés et les cellules ont ensuite été décollées par grattage à l'aide d'un grattoir stérile, puis la suspension cellulaire (environ $4x10^5$ cellules) a été transférée dans un microtube. 2,5 µL de cette solution ont été mélangés à 25 µL de la solution de lyse contenant de la DésoxyriboNucléase I (DNase I) diluée au 1/100. L'ensemble a été incubé à température ambiante pendant 5 min. Cette étape assure la lyse des cellules et la dégradation de l'ADN génomique. Ensuite la réaction a été stoppée par addition de 2,5 µL de la solution stop et incubée durant 3 min à température ambiante. La solution obtenue contenant les ARN totaux est prête à être utilisée ou peut être conservée à -80ºC pendant une longue durée. Toutes les étapes de l'extraction des ARN totaux ont été réalisées dans la glace à l'exception des étapes d'incubation à température ambiante. Le reste de la solution contenant la suspension cellulaire obtenue après grattage a été stocké à -80 ºC.

2.3.2.b. Transcription inverse

8 µL d'eau ultrapure autoclavée ou 8 µL de solutions contenant les ARN totaux déjà extraits des cellules exposées sont déposés dans les puits d'une plaque PCR à 96 puits (Life Technologies, St Aubin, France) auxquels sont ajoutés 32 µL du mélange réactionnel de la Reverse Transcriptase (RT) (volume final de 40 µL) constitué de 20 µL de tampon RT (2X), 2 µL de mélange d'enzyme de RT (20X) et 10 µL d'eau ultrapure autoclavée. Les puits contenant de l'eau ultra pure à la place des ARN ont servi de contrôles pour mettre en évidence toute contamination des réactifs de la RT. Un mélange réactionnel ne contenant pas le mélange d'enzyme de la RT est ajouté à 8 µL d'ARN et a servi d'un control négatif de la RT démontrant que la matrice de départ pour la réaction de PCR, qui suit la RT, est l'ADNc et non pas de l'ADN génomique.

La plaque est ensuite couverte par un film adhésif (Life Technologies, St Aubin, France) et centrifugée brièvement à l'aide d'une centrifugeuse à microplaque (Eppendorf France S.A.S., Le Pecq, France) pour faire descendre le milieu réactionnel au fond de la plaque et éliminer les bulles. Le programme du thermocycleur utilisé afin de réaliser cette réaction enzymatique est le suivant : une phase de synthèse des brins ADNc à partir des ARNm (90 min à 37 ºC), suivie d'une phase d'inactivation (dénaturation) de l'enzyme de la RT (5 min à 95 ºC) et si besoin une phase de conservation des ADNc simples brins à 4 ºC. Les ADNc ainsi formés sont prêts à être utilisés ou conservés à -20 ºC.

2.3.2.c. PCR en temps réel

Les ADNc de chaque échantillon ayant subi la RT ont été déposés dans 7 puits d'une plaque PCR (4 µL/puit) correspondant aux 6 gènes étudiés et à un 7ème gène de référence : l'ARN 18S (Hs99999901_s1 ; Life Technologies ; St Aubin, France). 16 µL de mélange réactionnel (volume final de 20 µL) contenant : 10 µL de TaMan® Gene Expression Master Mix (2X), 1 µL de TaqMan® Gene Expression Assay et 5 µL d'eau ultrapure autoclavée, ont été ajoutés (un mélange réactionnel pour chaque gène étudié). Afin de pouvoir détecter toute contamination possible à partir des réactifs de la PCR, de l'eau ultra pure a été utilisée à la place des produits de RT.

La plaque est ensuite couverte par un film adhésif et centrifugée brièvement avant de lancer la PCR. Le programme d'amplification est constitué des 4 étapes suivantes :

- L'incubation de l'UDG (Uracil DNA Glycosylase) (2 min à 50 ºC) pour hydrolyser les liaisons N-Glycosylique entre l'uracile et le sucre de l'ADN afin de contrôler le transfert des contaminations.
- L'activation de l'enzyme (10 min à 95 ºC)
- La dénaturation des brins d'ADN (15 secondes à 95 ºC)
- L'hybridation des amorces et des sondes suivie de l'élongation (1 min à 60 ºC)

Les deux dernières étapes constituent 1 cycle d'amplification qui sera répété 45 fois.

2.3.2.d. Quantification relative

La RT-PCR en temps réel est une PCR quantitative permettant de déterminer la quantité d'ARN initialement présente dans les cellules. La quantification de la fluorescence émise par un

fluorochrome durant les cycles d'amplification de l'ADN permet de fixer un seuil de fluorescence (durant la phase exponentielle de l'amplification). Le nombre de cycle d'amplification pour lequel ce seuil est atteint est appelé cycle seuil ou C_T (Cycle Threshold). Le C_T d'un échantillon dépend du nombre initial de copies d'ARNm. Si le nombre de copies est élevé, cela nécessite un nombre de cycles d'amplification plus petit pour atteindre le seuil de fluorescence fixé, et par conséquent un C_T plus petit.

L'évaluation des résultats peut se faire par une quantification absolue ou relative. Cette dernière, qui est utilisée pour évaluer les changements dans l'expression génique d'un échantillon donné par rapport à un autre échantillon de référence (par exemple un échantillon témoin non exposé), a été utilisée dans notre cas. Le C_T de tous les échantillons ont été calculés par le logiciel « Sequence Detection 7500 Software v2.0.3 » (Life Technologies, St Aubin, France). Pour chaque échantillon, nous avons rapporté la valeur du C_T des gènes cibles à celle de l'ARN 18S : $\Delta C_T = C_{T\ cible} - C_{T\ 18s}$, cela correspond à la normalisation par rapport à la quantité de cellules de départ. Puis, pour chaque type d'exposition, nous avons rapporté le ΔC_T à celui du témoin, cela correspond à l'expression relative par rapport aux cellules non exposées : $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T\ expo} - \Delta C_{Ttémoin}$. Par conséquent, la quantification relative (RQ ou Relative Quantitation) pour un échantillon est déterminée par la formule suivante : $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$.

2.4. Expression Génique des miARNs

La détermination des effets des particules atmosphériques collectées au Liban sur l'expression des miARNs (miR-21, miR-26b et miR-27a) dans les cellules BEAS-2B a été étudiée en évaluant l'expression génique de ces miARNs par la méthode de RT-PCR en temps réel.

2.4.1. Principe de la RT-PCR en temps réel (technologie SYBR Green I)

Le principe de cette technique a été détaillé dans le paragraphe 2.3.1II.2.3.1 de cette partie. Brièvement, la RT-PCR en temps réel est une réaction de polymérisation en chaîne, précédée par une étape de transcription inverse, permettant de suivre à tout instant la synthèse de plusieurs copies d'un fragment d'ADN à partir d'un nombre restreint de copies initiales d'ARN. Dans ce cas, la matrice initiale est le miARN ne possédant pas une queue poly (A). Donc une enzyme supplémentaire sera utilisée pour assurer la polyadénylation des miARNs qui seront

utilisés par la suite par la transcriptase inverse comme une matrice pour synthétiser les brins d'ADNc.

Comme nous l'avons déjà mentionné, cette technique repose sur la détection et la quantification d'un fluorochrome pendant le processus d'amplification. La PCR en temps réel que nous avons réalisée pour étudier l'expression des miARNs s'est basée sur le système de détection par des agents se liant à l'ADN double brin, la technologie SYBR Green I.

La Technologie SYBR Green I utilise le colorant SYBR Green I, un agent intercalant, pour détecter les produits de la PCR par sa liaison à l'ADN double brin, formé durant les réactions d'amplification. Lors de la réaction d'amplification par PCR, le colorant libre en solution exhibe peu de fluorescence. Son émission fluorescente augmente lorsque qu'il est lié à l'ADN double brin. Durant l'étape d'élongation, une augmentation de la fluorescence est associée à la quantité de colorant se fixant à l'ADN double brin qui se forme (Figure II-15). En comparant avec les autres agents se liant à l'ADN double brin, le SYBR Green I possède la sensibilité la plus élevée sans inhibition de la PCR (Poitras et Houde, 2002).

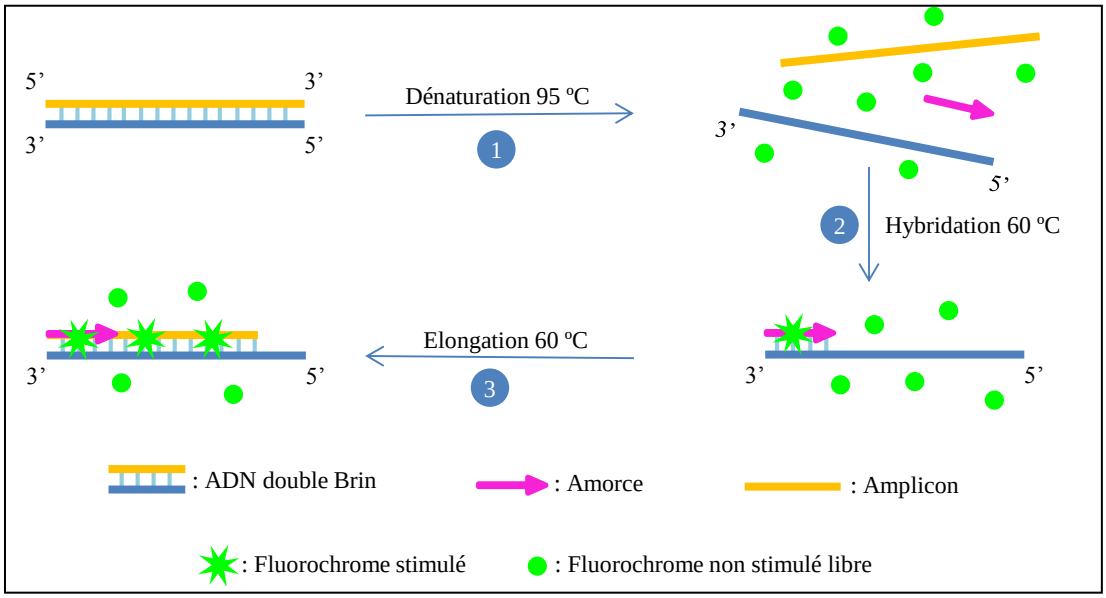


Figure II-15 : Schéma du principe de la PCR en temps réel avec détection par des agents se liant à l'ADN double brin (technologie SYBR Green I).
(1) Durant la dénaturation, le SYBR Green I libre exhibe peu de fluorescence. (2) À la température d'appariement, quelques molécules se lient au double brin d'ADN naissant provoquant une émission de fluorescence lors de l'excitation. (3) Durant la phase de polymérisation, de plus en plus de molécules se lient au brin naissant et l'accroissement de la fluorescence peut-être suivi en temps réel (adaptée de Poitras et Houde, 2002).

Étant donné que le SYBR Green I se fixe à n'importe quelle molécule d'ADN double brin, ceci peut générer des signaux faux positifs en se liant à des séquences doubles brins non spécifiques. Par conséquent, les analyses des courbes de fusion doivent toujours être réalisées à la suite de la PCR en temps réel afin d'analyser la spécificité de la réaction. En effet, pour chaque miARN, les séquences d'ADN double brin synthétisés par PCR possèdent une température de fusion spécifique. Si la température de fusion attendue pour une séquence d'ADN donnée est atteinte, ceci indique la spécificité de la PCR.

2.4.2. Protocole expérimental

L'évaluation de l'expression des gènes des miARNs (miR26-b, miR-27a et miR21) dans les cellules BEAS-2B a été réalisée à l'aide des kits suivants : NCode™ VILO™ miRNA cDNA Synthesis Kit et NCode™ Express SYBR® GreenER™ miRNA qRT-PCR Kit Universal (Life Technologies, St Aubin, France). Les références et les séquences des amorces spécifiques des miARNs d'intérêts et du miARN de référence (RNU6B) que nous avons utilisées sont les suivantes : miR-26b (référence : 2162009 ; séquence : TTC AAG TAA TTC AGG ATA GGT), miR-27a (référence : 2162010 ; séquence : TTC ACA GTG GCT AAG TTC CGC), miR-21 (référence 2162011 ; séquence : TAG CTT ATC AGA CTG ATG TTG A) et RNU6B (référence : 2162012 ; séquence : CGC AAG GAT GAC ACG CAA ATT CGT GAA GCG TTC CAT ATT TTT) (Applied Biosystems, UK).

Les protocoles de la RT-PCR ont été appliqués en suivant les préconisations du fabricant. L'appareil de PCR en temps réel utilisé est de type 7500 Fast Real-Time PCR (Life Technologies, St Aubin, France).

2.4.2.a. Extraction des ARN

Le miRNeasy mini Kit (QIAGEN France S.A.S., Courtaboeuf, France) a été utilisé pour extraire et purifier les ARN à partir des cellules BEAS-2B. Ce kit est conçu pour la purification des ARN totaux y compris les miARNs ainsi que d'autres molécules d'ARN de petites tailles. Les ARN ont été extraits à partir de culots cellulaires d'environ $1x10^6$ cellules. Avant de procéder à l'extraction, les cellules ont été décongelées jusqu'à ce que le culot cellulaire puisse être délogé en secouant délicatement le tube. Le protocole expérimental appliqué est celui fourni dans le kit.

Le culot cellulaire a été homogénéisé dans 700 µL de solution de lyse QIAzol® par vortex pendant 1 min. L'ensemble a été ensuite incubé à température ambiante pendant 5 min pour favoriser la dissociation des complexes nucléoprotéiques. 140 µL de chloroforme (Flandre Chimie, Villeneuve d'Ascq, France) ont ensuite été ajoutés et le mélange obtenu a été homogénéisé par vortex pendant 15 sec puis incubé à température ambiante pendant 3 min. Une étape de centrifugation (12000 g pendant 15 min à 4 ºC) a été ensuite réalisée pour extraire les ARN. La centrifugation permet la séparation de l'échantillon en 3 phases : une phase supérieure aqueuse et incolore, une interphase de couleur blanche et une phase organique inférieure de couleur rouge. Alors que les ARN sont retenus dans la phase aqueuse supérieure, les ADN sont retenus dans l'interphase et les protéines dans la phase inférieure ou l'interphase. La phase supérieure (350 µL) a été ensuite transférée dans un nouveau tube à laquelle ont été ajoutés 525 µL d'éthanol 100 % (Flandre Chimie, Villeneuve d'Ascq, France) puis l'ensemble a été mélangé par pipetage. L'échantillon a été ensuite appliqué, en 2 reprises, sur une colonne de purification (RNeasy® Mini Spin Column) reliée à un tube collecteur, où les ARN totaux se lient à la membrane de la colonne et le reste a été éliminé par centrifugation (8000 g pendant 15 s à 25ºC). Les ARN fixés à la membrane de la colonne ont ensuite été lavés successivement avec 700 µL du tampon RWT puis 2 fois avec 500 µL du tampon RPE. Après chaque lavage, une centrifugation (8000 g pendant 15 sec à 25 ºC) a eu lieu pour éliminer les solutions, à l'exception du dernier lavage où la centrifugation a duré 2 min pour bien sécher la membrane de la colonne. Finalement, les ARN ont été élués dans un nouveau tube, par 30 µL d'eau RiboNucléase-Free (RNase-Free) fournie dans le kit après centrifugation à 8000 g pendant 1 min à 25 ºC. A ce stade, les ARN sont prêts à être utilisés ou conservés à -80 ºC.

2.4.2.b. Dosage des ARN

Après extraction et purification, les ARN totaux ont été dosés par spectrophotométrie à l'aide de l'appareil MultiSkan Go (Thermo Fisher Scientific, Saint Herblain, France). L'absorbance (A) des ARN a été mesurée à la longueur d'onde $\lambda = 260$ nm. Etant donné que chaque unité d'absorbance d'ARN correspond à 40 µg d'ARN / mL, la concentration (C) des ARN a été calculée par la formule suivante : $C = A \times 40 \times (10/0{,}51)$; le rapport 10/0,51 correspond au facteur de correction de la plaque de mesure. De plus, des mesures de

l'absorbance à λ = 280 nm et λ = 230 nm ont été réalisées afin de s'assurer de la pureté des ARN extraits.

2.4.2.c. Transcription inverse

2 µL des solutions contenant les ARN totaux (environ 100 ng d'ARN / µL) déjà extraits ont été déposés dans les puits d'une plaque PCR à 96 puits auxquels ont été ajoutés 8 µL de mélange réactionnel de RT (volume final de 10 µL) constitué de 2 µL de Reaction Mix (5X), 1 µL de SuperScript® Enzyme Mix (10X) et 5 µL d'eau traitée au DEPC (DiEthyl PyroCarbonate). La plaque a été ensuite couverte par un film adhésif (Life Technologies, St Aubin, France) et brièvement centrifugée. Le programme du thermocycleur utilisé est le suivant : une phase de synthèse d'une queue poly (A) pour les miARNs et de synthèse des brins d'ADNc à partir de ces miARNs polyadénylés (60 min à 37 ºC), suivie d'une phase d'inactivation (dénaturation) de l'enzyme de RT (5 min à 95 ºC) et enfin une phase de conservation des ADNc simples brins à 4 ºC. Les ADNc formés sont prêts à être utilisés ou conservés à -20 ºC.

2.4.2.d. PCR en temps réel

Pour chaque échantillon, les ADNc ont été dilués 20 fois avant d'être déposés dans 4 puits d'une plaque PCR (1 µL/puit) correspondant aux 3 gènes étudiés et à un 4ème gène de référence. 9 µL de mélange réactionnel (volume final de 10 µL) ont été ajoutés. Le mélange réactionnel contient : 5 µL d'EXPRESS SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix Universal, 0,2 µL d'amorce « sens » spécifique du miARN (10 µM), 0,2 µL d'amorce « anti-sens » Universal qPCR (10 µM), 0,02 µL de colorant de référence ROX et 3,58 µL d'eau traitée au DEPC. Afin de pouvoir détecter toute contamination possible à partir des réactifs de PCR, les produits de RT ont été remplacés par de l'eau traitée au DEPC. La plaque a ensuite été couverte par un film adhésif et brièvement centrifugée avant de démarrer le programme de PCR. Un programme d'amplification à cycle rapide (fast cycling program) a été utilisé avec le mode rapide de l'appareil 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems). Les étapes de ce programme sont regroupées dans le Tableau II-8.

Tableau II-8 : Programme d'amplification à cycle rapide de la PCR en temps réel utilisé dans l'étude de l'expression génique des miARNs.

Etapes de la PCR	Répétitions	Température	Durée
1-Activation de l'enzyme	1	95 ºC	20 sec
2-Cycle de PCR : -Dénaturation des brins d'ADN -Hybridation des amorces et élongation	45	95 ºC 60 ºC	1 sec 30 sec
4-Courbe de fusion	1	95 ºC 60 ºC 95 ºC 60 ºC	15 sec 1 min 15 sec 15 sec

2.4.2.e. Quantification relative

L'évaluation des résultats a été réalisée, comme dans le cas de l'activation métabolique, par quantification relative. Pour chaque échantillon, la valeur du C_T des gènes cibles a été rapportée à celle du miARN de référence RNU6B : $\Delta C_T = C_{T\ cible} - C_{T\ (RNU6B)}$, cela correspond à la normalisation par rapport à la quantité de cellules de départ. Puis, pour chaque type d'exposition, nous avons rapporté le ΔC_T à celui du témoin, cela correspond à l'expression relative par rapport aux cellules non exposées : $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T\ expo} - \Delta C_{t\ témoin}$. Par conséquent, la quantification relative pour un échantillon est déterminée par la formule suivante : $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$.

2.5. Activité de la télomérase

L'évaluation de l'activité de la télomérase dans les cellules BEAS-2B exposées aux particules atmosphériques a été réalisée par l'intermédiaire du kit TRAPEZE® RT Telomerase Detection Kit (Millipore S.A.S., Saint Quentin en Yvelines, France). C'est une analyse *in vitro* très sensible pour la détection et la quantification fluorométrique en temps réel de l'activité de la télomérase.

2.5.1. Principe de la RT-PCR en temps réel (cas des amorces Amplifluor®)

Rappelons que la télomérase est une ribonucléoprotéine constituée d'une sous-unité protéique à activité transcriptase inverse et d'une sous-unité ribonucléique (ARN). En utilisant cet ARN comme matrice, la télomérase est capable d'ajouter une séquence répétée de 6

nucléotides (TTAGGG) sur l'extrémité 3' du chromosome pour maintenir la longueur des télomères.

En se basant sur cela, et afin de déterminer l'activité des télomérases dans les cellules par RT-PCR en temps réel, une première étape de transcription inverse est réalisée. Durant cette étape, la télomérase à activité transcriptase inverse assure l'ajout des séquences télomériques répétées sur l'extrémité d'une amorce spécifique (substrat de la télomérase ou SuT) en utilisant comme matrice de départ le brin d'ARN de sa sous-unité ribonucléique. Ensuite, après une étape de dénaturation, une Taq polymérase catalyse la synthèse du brin complémentaire de la séquence d'ADN obtenue et assure l'amplification de l'ADN double brin ainsi formé.

Un suivi en temps réel de la réaction d'amplification est réalisé par la détection et la quantification des sondes fluorescentes (technologie des amorces scorpions, dans notre cas l'amorce Amplifluor®). En effet, l'amorce Amplifluor® joue le double rôle d'une amorce et d'une sonde fluorescente. Elle est constituée, sur son extrémité 3', d'une séquence complémentaire à la séquence cible, et sur son extrémité 5' d'une structure d'épingle à cheveux comportant un fluorochrome émetteur et un suppresseur (quencher) (Figure II-16). A l'état libre, la structure d'épingle à cheveux, maintient les 2 fluorochromes à proximité pour une suppression de l'émission de la fluorescence.

Durant les réactions d'amplification, deux amorces sont mises en jeu : une amorce « sens » et une amorce fluorescente Amplifluor® anti-sens. Après hybridation de cette dernière sur la séquence d'ADNc synthétisée par la télomérase, la Taq polymérase assure la synthèse de son brin complémentaire sans modifier la structure d'épingle à cheveux. Suite à cette incorporation de l'amorce Amplifluor dans une séquence d'ADN double brin, sa structure d'épingle à cheveux est ouverte par l'action de la Taq polymérase polymérisant le brin incorporant l'amorce Amplifluor (suite à une dénaturation suivie d'une hybridation de l'amorce « sens »). Dans cette conformation étendue, la distance entre le fluorochrome et le suppresseur est augmentée et un signal de fluorescence est généré (Figure II-16).

Les amorces Amplifluor® sont conçues pour émettre le signal de fluorescence seulement quand elles sont incorporées dans les produits de PCR. Par conséquent, l'augmentation de la fluorescence est directement corrélée à la quantité d'ADN amplifié produit.

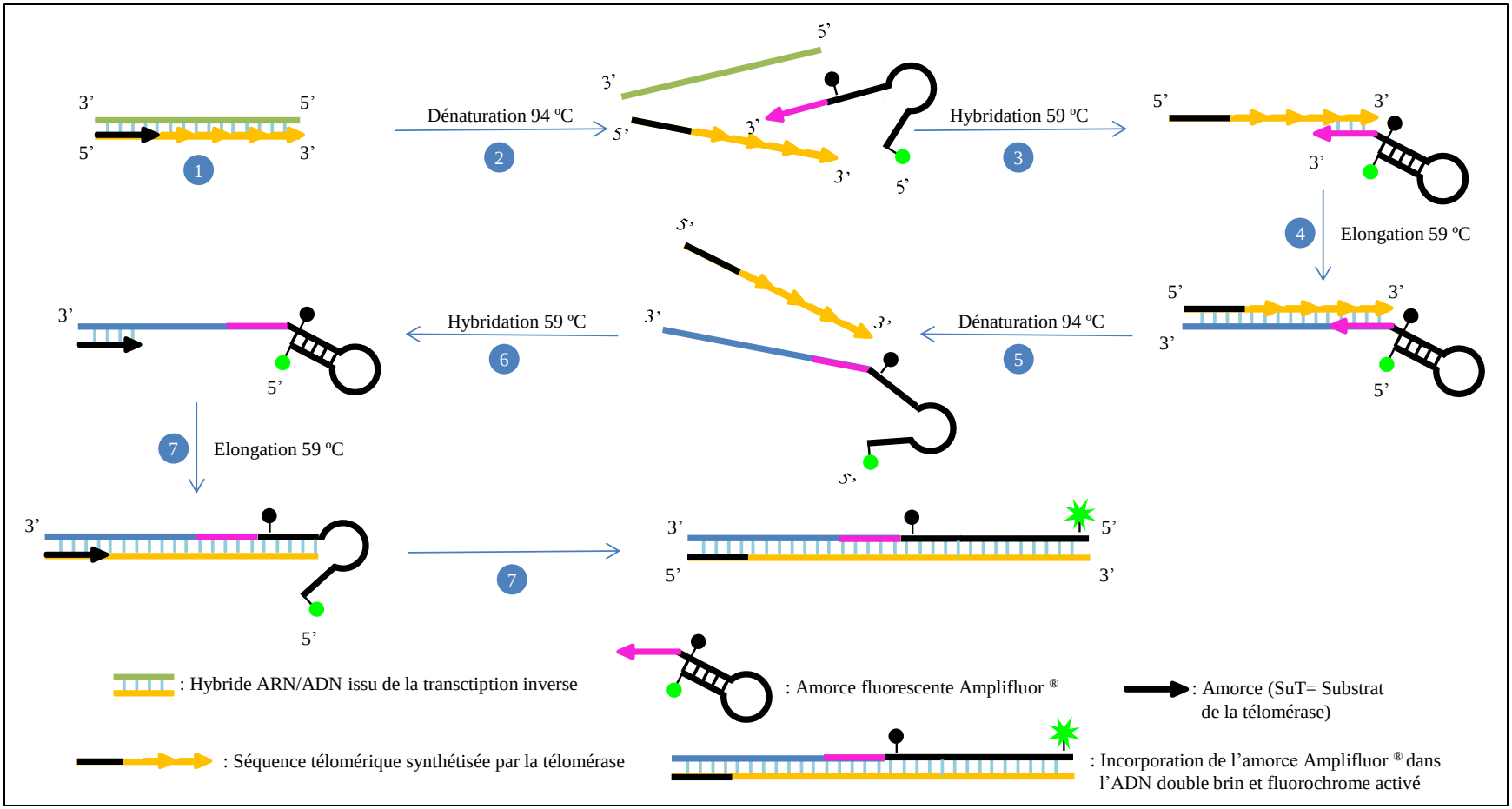


Figure II-16 : Schéma du principe de la PCR en temps réel avec détection par les amorces Amplifluor® pour la détermination de l'activité de la télomérase. (1) La télomérase à activité transcriptase inverse assure l'ajout des séquences télomériques répétées sur l'extrémité d'une amorce spécifique (Substrat de la Télomérase, SuT) en utilisant comme matrice de départ le brin d'ARN de sa sous-unité ribonucléique. (2) Durant l'étape de dénaturation, l'amorce Amplifluor® est sous forme relaxée et libre en solution mais la proximité des fluorochromes permet l'inhibition de la fluorescence. (3) L'amorce Amplifluor se fixe à sa séquence complémentaire cible. (4) Polymérisation du brin complémentaire par la Taq polymérase. (5) Dénaturation des brins d'ADN. (6) L'amorce SuT se fixe à sa séquence complémentaire cible qui a déjà incorporée l'amorce Amplifluor®. (7) Polymérisation du brin complémentaire par la Taq polymérase et ouverture de la structure épingle à cheveux de l'amorce Amplifluor incorporée dans l'ADN double brin permettant l'émission de la fluorescence.

2.5.2. Protocole expérimental

Le kit « TRAPEZE® RT Telomerase Detection Kit » (Millipore S.A.S., Saint Quentin en Yvelines, France) a été utilisé afin de d'évaluer l'activité de la télomérase dans les cellules BEAS-2B exposées aux PF. Le protocole que nous avons suivi est celui fourni par le fabricant. Etant donné que les télomérases sont des protéines, une étape de dosage des protéines totales après la lyse des cellules est indispensable afin de pourvoir rapporter les résultats à la quantité initiale de protéines cellulaires.

2.5.2.a. Lyse des cellules

Les culots contenant environ $1x10^6$ cellules ont été homogénéisés par vortex dans 200 µL de tampon de lyse CHAPS puis incubés dans la glace pendant 30 min. Une centrifugation à 12000 g pendant 20 min à 4 ºC a été ensuite réalisée. 60 µL de surnageant obtenu ont été transférés dans un nouveau tube pour la détermination de la concentration en protéines totales. Le reste du surnageant a été aliquoté dans des microtubes RNase et DNase free (Eppendorf France S.A.S., Le Pecq, France) en raison de 20 µL/tube et directement conservés à -80 ºC jusqu'à analyse ultérieure.

2.5.2.b. Dosage des protéines totales

Le dosage des protéines totales dans les lysats cellulaires obtenus, a été réalisé en utilisant la méthode de l'acide bicinchoninique (BCA, Bicinchoninic Assay).

- Principe

Le dosage des protéines totales par la méthode BCA, repose sur la réaction de réduction de l'ion cuivrique Cu(II) en ion cuivreux Cu(I) par les protéines en milieu alcalin. L'acide bicinchoninique, qui est un sel de sodium stable en milieu aqueux, forme avec le Cu(I) un complexe pourpre ayant une absorbance maximale à 562 nm proportionnelle à la concentration de protéines totales.

- Protocole expérimental

Le dosage des protéines totales a été réalisé en utilisant le kit Bicinchoninic Acid Protein Assay (Sigma-Aldrich ; Saint-Quentin Fallavier, France) (Smith *et al.*, 1989). La première étape consiste à préparer une gamme étalon de protéines (50-1000 µg/mL) à partir d'une solution mère d'albumine du sérum bovin (1 mg/mL) (BSA ou Bovine Serum Albumin) diluée dans le même tampon que les échantillons de protéines à doser. 25 µL de chaque échantillon de protéines extraites et des solutions protéiques de la gamme étalon ont été déposés en double dans une microplaque à 96 puits. Un blanc d'analyse a été obtenu en remplaçant l'échantillon par 25 µL du même tampon utilisé pour diluer les échantillons. 200 µL du mélange réactionnel, formé en mélangeant 19,5 mL de la solution d'acide bicinchoninique et 0,39 mL d'une solution de sulfate de Cu(II), ont été ajoutés aux puits de la plaque qui a été ensuite incubée à 37 ºC pendant 30 min avec une légère agitation. Finalement, l'absorbance a été mesurée à 562 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque (multiskan spectrum, Thermo Fisher Scientific, Saint Herblain, France). Pour chaque échantillon, la concentration en protéines totales a été déterminée en reportant sa mesure en absorbance à la courbe d'étalonnage obtenue à partir de la gamme étalon.

2.5.2.c. RT-PCR en temps réel

Les échantillons de lysats cellulaires ont été dilués dans le CHAPS (le tampon de lyse) de façon à avoir environ 350 µg de protéines / mL. 2 µL de chaque échantillon dilué ont été déposés en double dans une microplaque de PCR à 96 puits. Ensuite, 23 µL de mélange réactionnel (volume final de 25 µL), formé de 5 µL du 5X TRAPEZE® RT Reaction Mix, 0,5 µL de Titanium™ Taq Polymerase (Ozyme, Saint-Quentin en Yvelines, France) et 17,5 µL d'eau nucléase free, ont été ajoutés.

Différents types de contrôles ont été réalisés afin de valider les résultats :

- Témoins négatifs

-MTC ou Minus Telomerase Control : 2 µL de tampon de lyse CHAPS ont été utilisés en remplaçant des échantillons de lysat cellulaire. Ce témoin permet de déterminer la présence des contaminations à partir d'autres échantillons des tests précédents ou la formation des dimères d'amorces.

-NTC ou No Template Control : les 2 µL des échantillons de lysat cellulaire ont été remplacés par 2 µL d'eau nucléase free. En effet, la formation de dimères d'amorce se produit inévitablement avec les amorces Amplifluor en l'absence d'activité télomérase. Le témoin NTC se produit en dessous du niveau de détection le plus bas du test, et n'aura aucune incidence sur l'analyse de données lorsque l'activité de l'échantillon est détectée au-dessus de cette limite la plus basse.

-Echantillons traités à la chaleur : 2 µL d'échantillons traités à la chaleur ont été utilisés à la place des échantillons de lysat cellulaire. En effet, 10 µL de chaque échantillon ont été chauffés à 85°C pendant 30 min pour inactiver les télomérases.

- Témoin positif

Nous avons utilisé comme témoin positif le culot des cellules « télomérase positives » fourni dans le kit. Ces cellules ont été traitées de la même manière que les cellules de nos échantillons. 2 µL de lysat des cellules « télomérase positives » (dilué au 1/10 dans le CHAPS) ont été déposés dans la microplaque.

Pour les témoins positifs et négatifs, 23 µL du mélange réactionnel utilisé dans le cas des échantillons ont été ajoutés dans les puits contenant déjà 2 µL de chaque témoin. Ces réactions ont été effectuées en duplicat.

- Gamme TSR8

TSR8 est un oligonucléotide formé d'une séquence identique à l'amorce SuT (Substrat de la télomérase), étendue avec 8 répétitions télomériques $AG(GGTTAG)_7$. A partir de la solution stock de TSR8 (20 amoles/ µL) fournie dans le kit, des dilutions successives (au 1/10 dans le CHAPS) ont été réalisées afin d'obtenir une gamme de TSR8 de 0,02 ; 0,2 ; 2 et 20 amole/ µL. Cette gamme a été utilisée pour tracer la courbe d'étalonnage qui permet de calculer la quantité d'amorces SuT possédant des répétitions télomériques étendues par les télomérases dans un échantillon donné. 2 µL de chaque solution de la gamme étalon ont été déposés en double dans la microplaque, auxquels ont été ajoutés 23 µL de mélange réactionnel (le même qui a été utilisé pour les échantillons de lysat cellulaire).

- Contrôle facultatif TSK

Pour évaluer la performance de la PCR et la présence d'inhibiteurs de PCR dans les échantillons de lysats cellulaires (ce qui aboutirait à des résultats faux négatifs), un contrôle TSK a été réalisé.

TSK est une séquence modèle artificielle mise en quantité connue en présence des échantillons de lysats cellulaires et des amorces amplifluor spécifiques de la séquence TSK. La Taq polymérase assure l'amplification de cette séquence en utilisant l'amorce amplifluor spécifique du TSK. 2 µL de chaque échantillon de lysat cellulaire ont été déposés dans la microplaque auxquels ont été ajoutés 23 µL du mélange réactionnel contenant 5 µL du 5X TRAPEZE® Control Reaction Mix, 0,5 µL de Titanium™ Taq Polymerase, 2 µL du TSK 0,02 amol/µL et 15,5 µL d'eau nucléase free.

Une fois remplie, la plaque a été couverte par un film adhésif et brièvement centrifugée avant de procéder au lancement du programme de RT-PCR. Ce dernier est constitué de 3 étapes représentées dans le Tableau II-9.

Tableau II-9 : Programme d'amplification de la RT-PCR en temps réel utilisé pour l'évaluation de l'activité des télomérases.

Etapes de la PCR	Répétition	Température	Durée
1- Activité des télomérases (transcription inverse)	1	30 ºC	30 min
2-Activation de la Taq polymérase	1	95 ºC	2 min
2-Cycle de PCR : -Dénaturation des brins d'ADN -Hybridation des amorces et élongation -Collecte des données	45	94 ºC 59 ºC 45 ºC	15 sec 1 min 10 sec

2.5.2.d. Quantification des résultats

Après la RT-PCR en temps réel, le C_T de chaque échantillon a été déterminé et la quantité d'amorces SuT possédant des répétitions télomériques étendues par les télomérases a été déduite à partir de la droite d'étalonnage du TSR8. Les résultats ont ensuite été rapportés à la quantité de protéines totales dans chaque échantillon. Ceci correspond à la normalisation par rapport à la quantité de cellules de départ. Puis, pour chaque type d'exposition, nous avons rapporté le résultat (moyennes des réplicats) à celui du témoin, ce qui correspond à une normalisation par rapport aux cellules non exposées.

2.6. Phosphorylation de l'histone H2AX

L'évaluation de la phosphorylation de l'histone H2AX, dans les cellules exposées aux particules collectées en zones urbaine et rurale, a été réalisée à l'aide d'un cytomètre en flux en utilisant le kit « Flow Cellect™ Histone H2AX Phosphorylation Assay Kit » (Millipore S.A.S., Saint Quentin en Yvelines, France).

2.6.1. Principe de la cytométrie en flux

La cytométrie en flux consiste à analyser les signaux optiques ou physiques émis par des cellules individualisées entraînées par un liquide vecteur (flux liquide), en traversant une source d'excitation lumineuse (souvent un laser). Son principe est représenté dans la Figure II-17.

C'est une méthode largement utilisée pour analyser l'expression des molécules intracellulaires ou de surface, la caractérisation et la définition des différents types de cellules dans des populations cellulaires hétérogènes, et l'analyse de la taille et la granulosité des cellules. De plus, la cytométrie en flux permet une analyse multiparamétrique simultanée des cellules. Elle est principalement utilisée pour mesurer l'intensité de la fluorescence émise par des anticorps marqués par des fluorochromes, détectant des protéines ou des ligands d'intérêts dans les cellules.

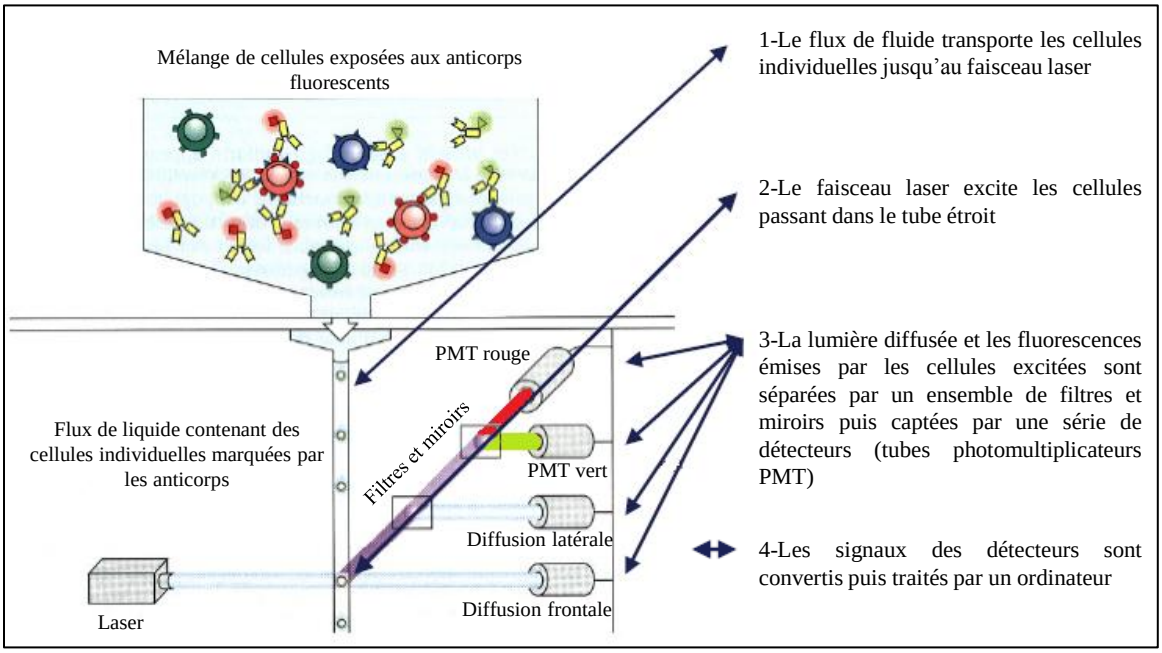


Figure II-17 : Principe général de la cytométrie en flux.

Cette technique comporte trois composantes principales : fluidique, optique et électronique Figure II-17 :

La composante fluidique consiste à transporter les cellules en suspension, dans un courant de fluide jusqu'au faisceau laser. Pour un éclairage optimal, le flux de transport des particules doit se trouver au centre du faisceau. La focalisation (ici acoustique ; Attune® Acoustic Focusing Cytometer, Life Technologies, St Aubin, France) permet, grâce à des ondes ultrasonores, un alignement des cellules même si le flux d'échantillons est élevé (atteignant souvent des milliers d'évènements par seconde), et par conséquent les cellules passent une à une devant le faisceau laser.

Quant à la composante optique du cytomètre, elle comporte une source lumineuse (le laser), des détecteurs photomultiplicateurs (dans notre cas) et une série de filtres et de miroirs dichroïques. En passant à travers le faisceau laser, les cellules diffusent la lumière vers l'avant (Forward Scatter ou FS) et latéralement (perpendiculairement au faisceau) (Side Scatter ou SS), et les fluorochormes, fixés sur les anticorps spécifiques des protéines cibles, seront excités, émettant alors de la fluorescence. La lumière diffusée, ainsi que la fluorescence émise par les cellules sont séparées selon leurs longueurs d'onde par un ensemble de filtres et de miroirs dichroïques de la composante optique. La lumière fluorescente est filtrée de sorte que chaque capteur permet de détecter une seule fluorescence à une longueur d'onde spécifique. Ces capteurs sont appelés tubes photomultiplicateurs (PMT). Un PMT placé devant le faisceau laser capte la lumière diffusée vers l'avant (FS). Quant aux fluorescences émises et la lumière diffusée latéralement (SS), elles sont captées par des PMT situés de côté Figure II-17.

Notons que le FS est en corrélation avec la taille des cellules alors que SS dépend de leur densité (nombre de granules cytoplasmiques). De cette manière, des populations cellulaires peuvent souvent être distinguées sur la base de différences dans leur taille et leur densité.

Finalement, les PMT convertissent les photons captés en signaux électroniques. Ces derniers seront convertis à leur tour en un signal digital assimilable par l'ordinateur qui le traite et nous représente les résultats sous forme d'histogrammes et des tableaux (Figure II-17).

2.6.2. Protocole Expérimental

2.6.2.a. Fixation et perméabilisation des cellules

Après leurs expositions aux particules atmosphériques dans les flacons de culture de 75 cm^2, les cellules BEAS-2B ont été récupérées puis lavées avec du PBS (1X). Ces cellules ont été ensuite réparties dans des microtubes pour les différents paramètres à étudier. Pour l'étude de la phosphorylation de H2AX, $2x10^6$ cellules ont été récupérées après centrifugation (200 g pendant 5 min à 4 ºC) puis remises en suspension dans 1 mL de PBS (1X). 54 µL de formaldéhyde 37 % (Flandre Chimie, Villeneuve d'Ascq, France) ont ensuite été ajoutés (concentration finale de 2 %) et les cellules ont été incubées pendant 20 min à température ambiante. Cette étape permet la fixation des cellules grâce au formaldéhyde qui réagit avec les acides aminés des protéines membranaires pour ensuite produire des ponts méthyléniques avec d'autres protéines, ce qui a pour but de conserver la structure des cellules même si elles sont mortes.

Les cellules ont été ensuite mises dans la glace pendant 2 min avant de procéder à l'étape de perméabilisation, durant laquelle les cellules ont été centrifugées (300 g pendant 5 min à 4 ºC). 900 µL du surnageant ont ensuite été éliminés puis les cellules ont été mises en suspension dans 900 µL du méthanol froid (Flandre Chimie, Villeneuve d'Ascq, France) (concentration finale = 90 %). Les cellules ont ensuite été incubées dans la glace pendant 30 min. Le méthanol assure la perméabilisation des cellules déjà fixées en dissolvant les lipides membranaires, facilitant ainsi la pénétration des anticorps anti-γH2AX dans les cellules, tout en conservant leur structure. Les cellules en suspension dans le méthanol 90 % sont prêtes à être utilisées ou sont conservées à -20 ºC (Lepers, 2013).

2.6.2.b. Marquage immunologique des γH2AX des cellules

Deux fois 100 µL des cellules en suspension dans du méthanol 90 % (environ $2x10^5$ cellules) ont été placés dans 2 microtubes puis centrifugés à 300 g pendant 5 min à 4 ºC. Après élimination du surnageant, 95 µL de tampon de réaction (1X ; dilué à partir de la solution 10X dans de l'eau ultrapure) ont été ajouté dans chaque tube. 5 µL d'anticorps fluorescents Anti-γH2AX (20X) : mouse IgG1-Alexa Fluor® 488 (fourni dans le kit) ont ensuite été ajoutés dans un des 2 tubes et 5 µL de contrôle isotypique (dilué au centième dans du tampon de réaction 1X) :

mouse IgG1-Alexa Fluor ® 488 (Life Technologies, St Aubin, France) ont été mis dans le 2ème tube puis incubés à température ambiante pendant 30 min à l'abri de la lumière.

Le contrôle isotypique est un anticorps de même type que l'anticorps anti-γH2AX que nous avons utilisé, mais qui ne reconnait aucune structure dans la cellule. Il est utilisé comme contrôle pour déterminer le bruit de fond et donc toute fixation non spécifique de l'anticorps anti-γH2AX.

Après incubation, les cellules ont été récupérées par centrifugation (à 300 g pendant 5 min à 4 ºC) puis remises en suspension dans 0,5 mL de PBS (1X) (Lepers, 2013).

2.6.2.c. Marquage de l'ADN : analyse du cycle cellulaire

Ensuite 0,5 µL de FxCycle™ violet DNA stain (1µg/µL) (Life Technologies, St Aubin, France) ont été ajoutés à chaque tube puis incubés à température ambiante pour au moins 30 min à l'obscurité (Lepers, 2013). C'est un colorant fluorescent qui reconnait spécifiquement l'ADN double brin dans les cellules fixées. Il est utilisé pour quantifier l'ADN dans les cellules permettant ainsi une analyse du cycle cellulaire (phases G0/G1, S et G2/M).

Le même protocole a été réalisé en utilisant des culots de cellules BEAS-2B exposées pendant 20 min à 1 µM de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), utilisé comme contrôle positif. Tous les échantillons ont ensuite été analysés par cytométrie en flux en utilisant le Attune® Acoustic Focusing Cytometer (Life Technologies, St Aubin, France) (flux = 25 à 100 µL/min ; mode sensibilité élevée) et le logiciel Attune® Cytometric Software v1.2.5.

2.6.2.d. Quantification des résultats

Après avoir analysé les échantillons par cytométrie en flux, la quantification des résultats a été réalisée en utilisant le logiciel Flowing Software v.2.4.1. Pour chaque évènement (ou cellule) d'un échantillon, les fluorescences de l'anti-γH2AX ou du contrôle isotypique (noté par la suite iso) ont été rapportées à celle du FxCycle (γH2AX/ADN ou iso/ADN) pour chaque phase du cycle cellulaire. Ceci correspond à la normalisation de la fluorescence par rapport à la quantité d'ADN de chaque cellule. Ensuite, les médianes de γH2AX/ADN ou de iso/ADN de tous les évènements d'un même échantillon ont été déduites. Afin d'éliminer le bruit de fond de la fluorescence, et donc de la fixation non spécifique de l'anti-γH2AX, la médiane du iso/ADN de chaque échantillon a été retranchée de celle du γH2AX/ADN du même échantillon. Nous

obtiendrons alors pour chaque échantillon : γH2AX = médiane$_{(\gamma H2AX/ADN)}$ - médiane$_{(iso/ADN)}$. Finalement, pour chaque type d'exposition, nous avons rapporté le résultat (moyenne des réplicats) de γH2AX à celui du témoin (moyenne des réplicats), correspondant à une normalisation par rapport aux cellules non exposées.

3. Analyses statistiques

Les variables aléatoires quantitatives continues (LDH, DHm, CYP1A1, CYP1B1, NQO1, AhR, ARNT, AhRR, miR-21, miR-26b, miR-27a, télomérase et γH2AX) sont décrites par leurs moyennes et leurs écart-types. Les valeurs des variables aléatoires de chaque groupe (contrôles négatifs, contrôles positifs, concentrations croissantes d'aérosol) ont été comparées à celles du groupe témoin grâce au test non paramétrique U de Mann-Whitney. De plus, les valeurs des variables aléatoires de chaque groupe (concentrations croissantes de l'aérosol) ont été comparées entre elles afin de mettre en évidence des différences dose-dépendante ou site-dépendante. Le traitement des données a été réalisé avec le logiciel d'analyses statistiques SPSS pour Windows, v.12.0.1 Nov. 2003 (SPSS France, Paris, France).

- En comparant les effets entre les cellules témoins négatifs et les celles exposées (quelque soit le type d'exposition) : a : $p<0,05$; b : $p<0,01$; c : $p<0,001$
- En comparant les effets entre les deux concentrations de particules (C1 et C2) pour un même site d'échantillonnage (urbain ou rural) : * : $p<0,05$; ** : $p<0,01$; *** : $p<0,001$
- En comparant les effets entre les deux sites d'échantillonnage (urbain et rural) pour une même concentration de particules (C1 ou C2) : 1 : $p<0,05$; 2 : $p<0,01$; 3 : $p<0,001$
- En comparant les effets entre les PUF récupérées dans l'eau et les extraits organiques des PUF, pour un même site d'échantillonnage (urbain ou rural) : † : $p<0,05$; †† : $p<0,01$; ††† : $p<0,001$

III. Chapitre 3

Caractéristiques physico-chimiques des particules fines et ultrafines collectées en milieu urbain et rural

Dans ce chapitre, nous présentons les résultats et la discussion des analyses physico-chimiques des échantillons individuels de particules fines et ultrafines collectées en milieu urbain ou rural durant les différentes périodes d'échantillonnage. Ensuite, une comparaison sera réalisée entre les résultats obtenus dans notre étude et ceux obtenus dans d'autres pays du bassin méditerranéen, pour clôturer enfin avec une conclusion des résultats.

1. Données météorologiques durant les périodes d'échantillonnage

Les données climatologiques (température, précipitation, direction et vitesse du vent) ont été obtenues à partir des stations météorologiques citées dans le chapitre 2. Ces données ont été notamment utilisées pour le tracé des roses des vents. Les vitesses du vent sont divisées en 4 classes majeures qui sont représentées dans le Tableau III-1.

Tableau III-1: Classification des vitesses du vent rencontrées lors de nos campagnes de prélèvement.

Vitesse du vent (m/s)	Type de vitesse	Description
> 8	Elevée	Brise fraiche et vent frais
4 à 8	Modérée	Brise douce et modérée
2 à 4	Faible	Brise légère et douce
< 2	Très faible	Air calme et léger

Pour les vents de vitesse très faible (< 2 m/s), il est difficile de définir une direction bien spécifique ; ces conditions de vent se rapportent à des atmosphères plutôt stagnantes.

1.1. Site Urbain : Sin El-Fil

L'échantillonnage du site urbain s'est déroulé à Sin El-Fil, du 18 mai au 2 septembre 2011 durant 5 périodes différentes : 18-27 mai ; 30 mai-10 juin ; 13-24 juin ; 05-19 août et 22 août-2 septembre.

La Figure III-1 représente les roses des vents obtenues à Hadath pour les différentes périodes d'échantillonnage que l'on extrapole pour le site de Sin El-Fil distant de 6 km uniquement. Nous pouvons remarquer que les conditions de vent sont quasi similaires pour les 5 échantillons collectés : la direction de vent la plus fréquente est le sud-ouest (fréquence entre 30 et 70%) suivie par l'ouest et l'ouest-sud-ouest (fréquence moyenne de 11%). Ces directions de vent majoritaires sont associées à des vitesses de vent modérées ou élevées. De plus, pour les 3 premières périodes d'échantillonnage, un vent de secteur Nord de faible fréquence, à vitesse modérée ou élevée, est remarqué. Enfin, les directions de vent de secteur sud-est, associées à des vitesses de vent faibles et très faibles (fréquence de 7% et 3 % respectivement), n'ont été observées de manière significative pour la 1ère et la 5ème période de prélèvement.

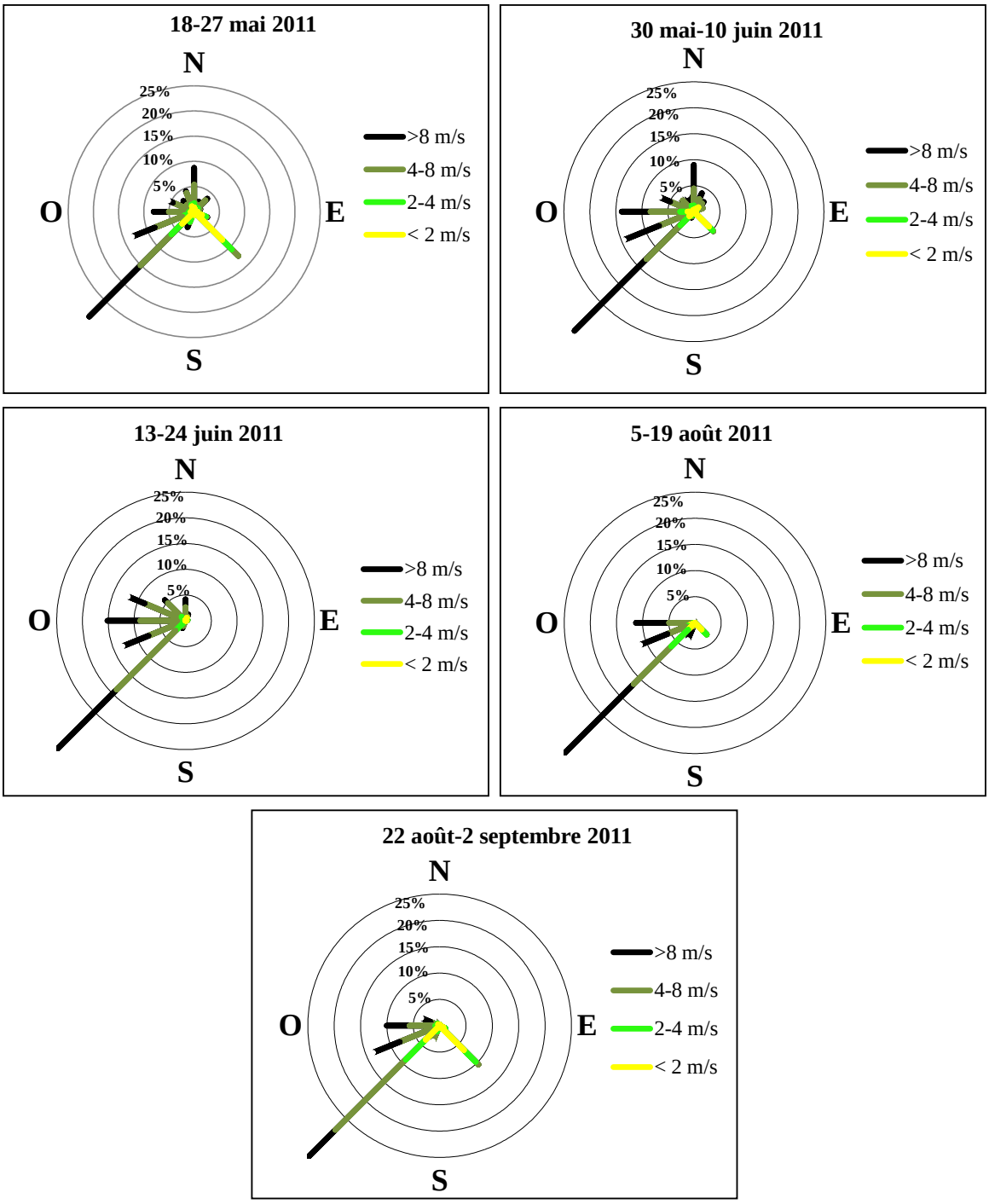


Figure III-1: Roses des vents (enregistrées à Hadath) pour les différentes périodes d'échantillonnage de particules à Sin El-Fil (site urbain).

Durant la campagne d'échantillonnage, la température à Sin El-Fil était relativement stable durant la campagne d'échantillonnage et était comprise entre 21 et 29 ºC ; le niveau total de précipitation durant toute la période était de 14 mm, ce qui correspond à des conditions globalement sèches. Le niveau de précipitation le plus élevé (7 mm) a été observé durant la troisième période de prélèvement. Pour la dernière période, un niveau de 5 mm a été noté tandis que 2 mm de pluie ont été enregistrées pour la première période de prélèvement. Aucune précipitation n'a été observée durant la deuxième et la quatrième période de prélèvement des particules à Sin El-Fil.

Afin de déterminer l'origine des masses d'air durant l'échantillonnage des particules à Sin El-Fil, des rétrotrajectoires ont été tracées en utilisant le modèle HYbrid Single-Particles Lagrangian Integrated Trajectory (HYSPLIT) avec les paramètres suivants :

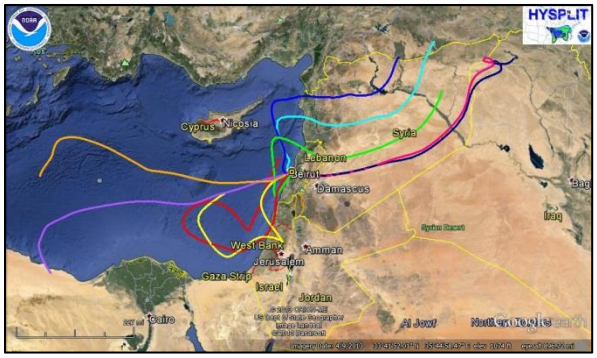
- 100 m au-dessus du niveau du sol
- Durée : 48 heures
- Vertical Motion Calculation Method: Isobaric
- Météorologie : 0000Z 15 mai-02 septembre 2011–bases de données GDAS1

HYSPLIT est un modèle de transport et de dispersion accessible sur le site web du laboratoire des ressources sur l'air NOAA (Draxler et Rolph, 2013).

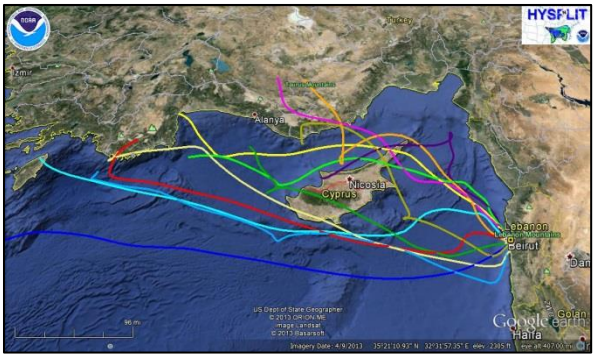
Pour chacune des 5 périodes d'échantillonnage, nous avons retenu 1 à 3 rétrotrajectoires représentatives de chaque journée de prélèvement (Figure III-2). Concernant la première période allant de 18 à 27 mai 2011, les rétrotrajectoires représentatives des trois premiers jours (Figure III-2 A1) ont été distinguées de celles des autres jours (Figure III-2 A2) puisqu'elles représentent des origines des masses d'air totalement différentes de celles rencontrées durant le reste de la période. En effet, les rétrotrajectoires des 18 et le 19 mai, montrent que les masses d'air ont traversé la Syrie et l'Iraq ; une "tempête de poussières" a été observée durant ces jours. Le 20 mai 2011, les masses d'air échantillonnées avaient traversé la Palestine. Pour la 2ème, 3ème, 4ème et 5ème période d'échantillonnage, les rétrotrajectoires ont été regroupées dans la Figure III-2 B, C, D et E respectivement. Pour ces échantillons, les masses d'air présentent des origines assez similaires, en ayant suivi un trajet essentiellement marin avant d'atteindre par l'ouest notre site d'échantillonnage. Il faut peut être précisé qu'en général, ces masses d'air provenaient sur le Sud

de l'Europe (Grèce) ou de la Turquie, descendaient sur la Mer Méditerranée avant d'atteindre le Liban.

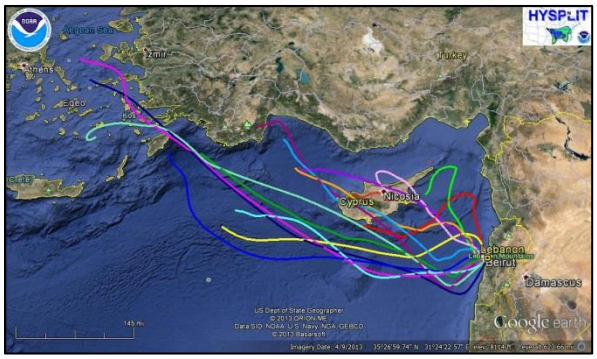
-A1-1ère période : 18-20 mai 2011



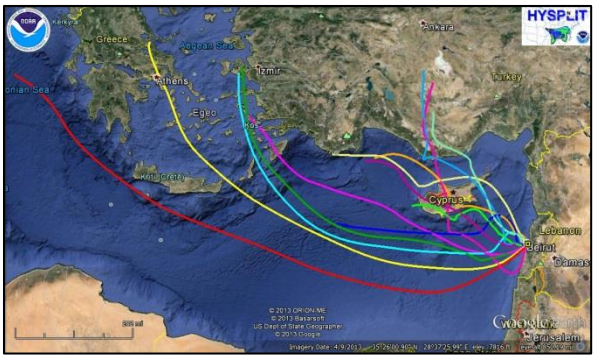
-A2-1ère période : 21-27 mai 2011



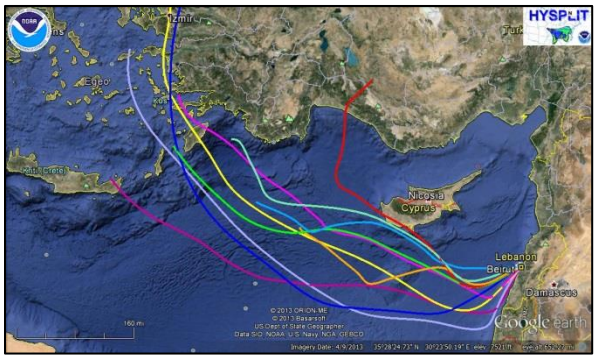
-B-2ème période : 30 mai-10 juin 2011



-C-3ème période : 13-24 juin 2011



-D-4ème période : 5-19 août 2011



- E-5ème période : 22 août-2 septembre 2011

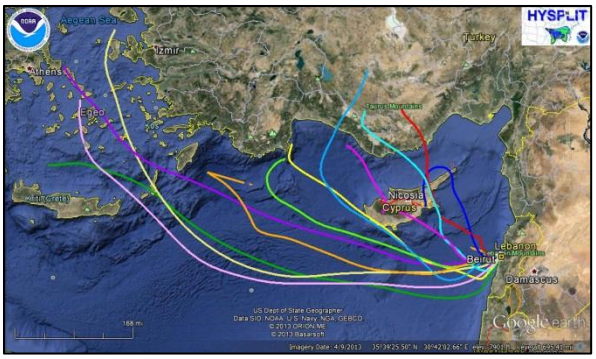


Figure III-2 : Rétrotrajectoires de masse d'air, représentatives de chaque période d'échantillonnage de la campagne de Sin El-Fil issues du modèle HYSPLIT (Draxler et Rolph, 2013).

1.2. Site rural : Bejje

L'échantillonnage sur le site rural s'est déroulé à Bejje, du 5 septembre au 28 octobre 2011 durant 4 périodes différentes : 5-16 septembre ; 20-29 septembre ; 3-14 octobre et 17-28

octobre. La Figure III-3 représente les roses des vents obtenues à Tripoli pour les différentes périodes d'échantillonnage que l'on extrapole pour le site de Bejje distant de 30 km. Nous pouvons remarquer que les conditions de vents présentes des différences pour les quatre échantillons collectés. De plus, les directions de vent majoritaires pour les quatre périodes d'échantillonnage sont associées à des vitesses de vents faibles et à une moindre mesure à des vitesses de vents modérées à l'exception des 3 dernières périodes d'échantillonnage, où un vent sud-sud-est majoritaire est associé à une vitesse de vent très faible.

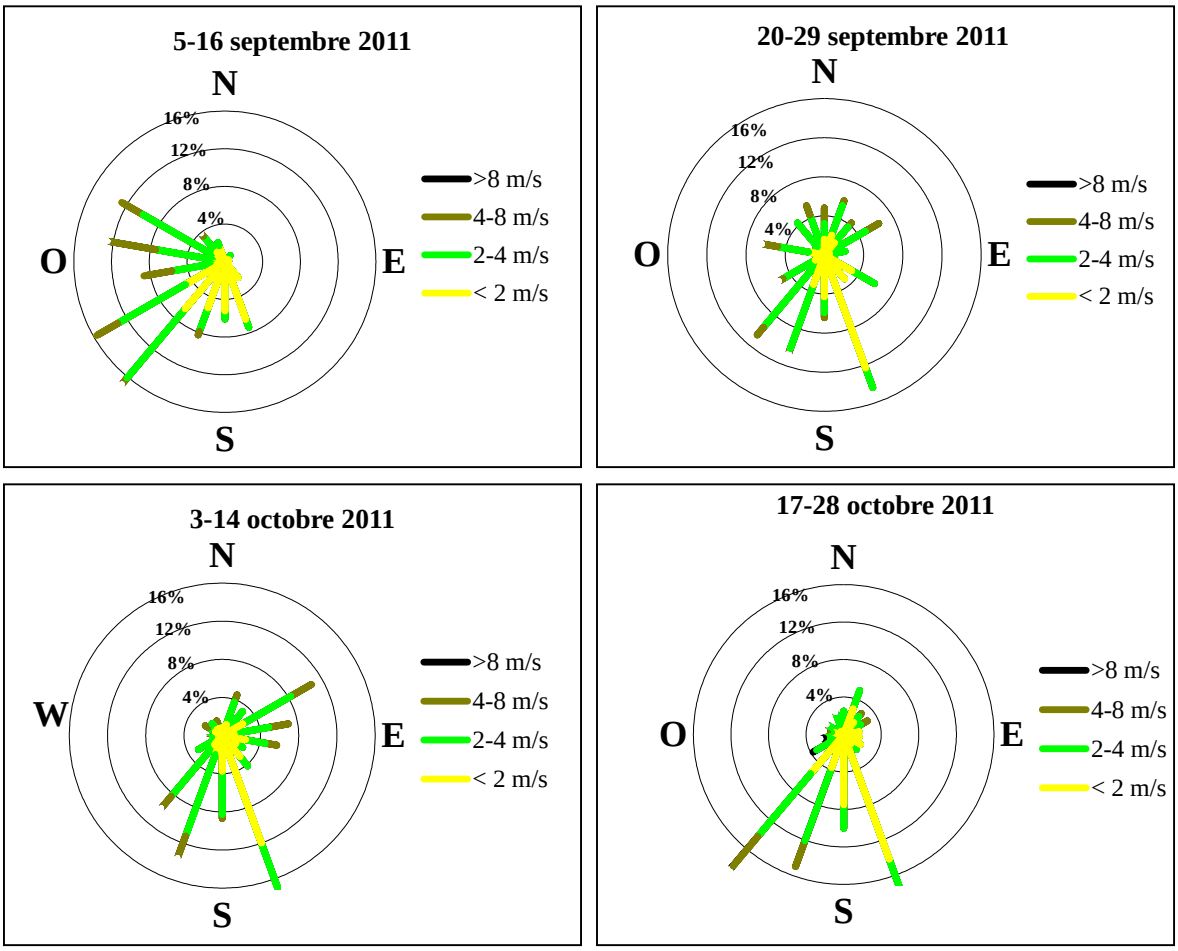


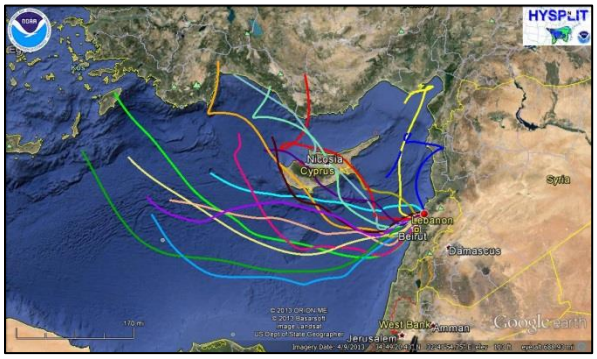
Figure III-3 : Roses des vents (enregistrées à Tripoli) pour les différentes périodes d'échantillonnage de particules à Bejje (site rural).

La température était comprise entre 20 à 32 ºC durant toute la campagne de prélèvement. Elle était en moyenne de 28 ; 26 ; 25 et 23 ºC durant les 4 périodes considérées, à savoir pour la première jusqu'à la dernière période, respectivement.

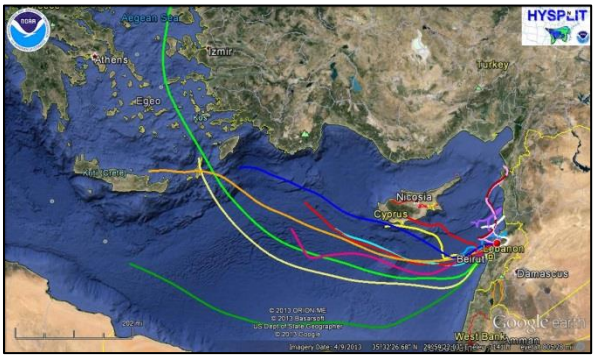
Le cumul de précipitation durant la campagne d'échantillonnage à Bejje s'élevait à 33 mm environ. L'essentiel de ces pluies (28 mm) a été observé durant la 7ème période de prélèvement. Des niveaux de précipiation nettement moindre ont été observés durant les 6ème, 8ème et 9ème périodes avec des niveaux de 0,2 ; 2 et 3 mm environ.

Comme dans le cas du site urbain, afin de déterminer l'origine des masses d'air à Bejje durant la campagne de prélèvement, des rétrotrajectoires ont été tracées. Deux rétrotrajectoires représentatives de chaque journée de prélèvement ont été tracées. Les rétrotrajectoires relatives à chacune des périodes d'échantillonnage ont été regroupées sur la Figure III-4. Pour cette campagne, les rétrotrajectoires de masse d'air apparaissent également essentiellement marine, avec toutefois une intrusion plus marquée à l'intérieur des terres pour le 8ème et 9ème période.

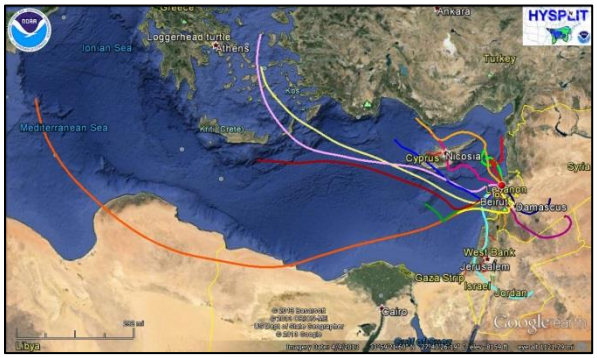
-A- 6ème période : 05-16 septembre 2011



-B- 7ème période : 20-29 septembre 2011



-C- 8ème période : 03-14 octobre 2011



-D- 9ème période : 17-28 octobre 2011

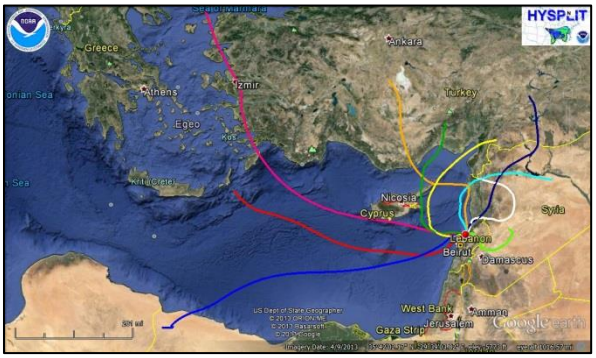


Figure III-4 : Rétrotrajectoires de masse d'air, représentatives de chaque période d'échantillonnage de la campagne de Bejje issues du modèle HYSPLIT (Draxler et Rolph, 2013).

2. Concentrations en PF et PUF collectées

Les concentrations de PF dans l'air ont été calculées en considérant les masses de particules recueillies sur les plaques selon le protocole décrit dans le chapitre 2, paragraphe 2.3 et les volumes d'air ayant traversé l'impacteur. Il faut mentionner ici que ces concentrations peuvent apparaitre sous estimées car des pertes existent lors de la récupération des particules sur les plaques d'impaction.

Les concentrations de PF (dans notre cas les $PM_{2,5-0,3}$) dans l'atmosphère ainsi estimées varient entre 14 et 46 µg/m^3 pour les 5 échantillons du site urbain et entre 7 et 24 µg/m^3 pour les 4 échantillons du site rural à l'exception du PF-R_7 pour lequel la concentration est élevée et atteint 73 µg/m^3 (Tableau III-2). L'occurrence soudaine d'une tempête sèche durant quelques heures explique cette valeur élevée : ce phénomène météorologique a entrainé la remise en suspension de particules du sol de cet espace naturel.

Tableau III-2 : Concentrations (µg/m^3) de PF et de PUF des échantillons collectés à Sin El-Fil (site urbain) et à Bejje (site rural).

	Période	Echantillons de PF	Concentration de PF (µg/m^3)	Echantillons de PUF (filtres d'arrêt)	Concentration de PUF (µg/m^3)
Urbain : Sin El-Fil	18-27 mai	PF-U_1	46	PUF-U_1	19
	30 mai-10 juin	PF-U_2	28	PUF-U_2	-*
	13-24 juin	PF-U_3	21	PUF-U_3	13
	05-19 août	PF-U_4	20	PUF-U_4	18
	22 août-2 septembre	PF-U_5	14	PUF-U_5	10
Rural : Bejje	05-16 septembre	PF-R_6	7	PUF-R_6	10
	20-29 septembre	PF-R_7	73	PUF-R_7	6
	03-14 octobre	PF-R_8	6	PUF-R_8	10
	17-28 octobre	PF-R_9	24	PUF-R_9	11

*Filtre inexploitable

Concernant les PUF, rappelons que les masses des PUF retenues sur les filtres d'arrêt ont été déterminées en additionnant les concentrations déterminées pour l'ensemble des éléments analysés présents dans les particules collectées sur ces filtres (éléments majeurs et mineurs, ions inorganiques et carbone total). Par cette méthode, il a été obtenu des concentrations de PUF variant de 10 à 19 µg/m^3 pour le site urbain et de 6 à 11 µg/m^3 pour le site rural. Ces valeurs apparaissent relativement élevées. Cependant, il faut rappeler que dans notre cas, les échantillons

de PUF intègrent des particules recueillies sur filtre back-up et de taille < 0,3 µm, qui correspond au diamètre de coupure $D_{p,50}$ du dernier étage de l'impacteur. Cette précision est importante, car il est admis le plus souvent pour les particules ultrafines, un diamètre de coupure de 0,1 µm. Or, dans notre cas, les échantillons PUF renferment également des particules de taille comprise entre 0,1 et 0,3 µm ; ceci explique donc les concentrations élevées de PUF.

En revanche, il est tout à fait possible de déterminer les concentrations de $PM_{2,5}$, qui correspondent à la somme des concentrations de PF ($PM_{2,5-0,3}$) et de PUF ($PM_{0,3}$). Bien qu'estimées par défaut en raison de pertes liées au mode de collecte, les résultats obtenus montrent que ces valeurs dépassent dans les milieux urbain (Sin El-Fil) et rural (Beije) la norme annuelle fixée par l'OMS de 10 µg/m^3.

3. Composition chimique des aérosols particulaires

3.1. Ions inorganiques, métaux et carbone total

La composition des PF et des PUF en ions inorganiques, métaux et carbone total a été déterminée en analysant les échantillons par chromatographie ionique (Cl^-, NO_3^-, SO_4^{2-}, PO_4^{3-}, NH_4^+, Na^+, Mg^{2+}, K^+ et Ca^{2+}), par ICP-AES (Al, Ba, Fe, Mn, P, Sr, Ti et Zn), par ICP-MS (Ag, As, Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Nb, Ni, Pb, Rb, Sb, Sc, Sn, Te, Tl, V) ainsi que par la microanalyse élémentaire (C total) en suivant les protocoles détaillés dans le chapitre 2.

L'analyse des PF a été réalisée directement sur les particules (poudre) tandis que celle des PUF a été réalisée sur les filtres d'arrêt en fibre de verre retenant ces particules. Les fibres du filtre ont des teneurs significativement élevées en certains éléments insolubles dans l'eau, rendant parfois impossible l'exploitation de certaines teneurs associées aux PUF :

- Les espèces insolubles présentes à des teneurs élevées dans les fibres du filtre tels que le Ca, Na, Mg et K n'ont pas été analysées ; dans ce cas, les teneurs en ions hydrosolubles correspondants ont été exploitées (Ca^{2+}, Na^+, Mg^{2+}et K^+).
- Les espèces présentes dans les filtres à des teneurs relativement élevées et variables ne permettant pas leur analyse tels que l'Al, As, Nb, Rb et Sc n'ont pas été présentées pour les échantillons de PUF, et Ba, Sr, Ti, Tl et Zn pour les PUF-U (1,2 et 3)
- Les autres espèces insolubles sont présentes dans le filtre à des teneurs moindres que dans les particules et apparaissent constantes. Pour ces espèces, les teneurs obtenues

pour des filtres vierges ont été soustraites aux concentrations mesurées dans les échantillons de PUF sur filtre.

Pour la clarté de présentation des résultats, nous avons choisi dans un premier temps de regrouper les espèces suivantes Ag, As, Ba, Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Nb, Ni, P, Pb, Rb, Sb, Sc, Sn, Sr, Te, Ti, Tl, V et Zn en éléments traces (ET). Ces éléments traces seront plus spécifiquement étudiés dans un second temps.

3.1.1. Site Urbain

Le Tableau III-3 représente les concentrations en ng/m^3 des ions inorganiques, éléments majeurs, C total et éléments traces présents dans les échantillons de PF et de PUF collectés à Sin El-Fil. La répartition de ces espèces (en pourcentage) est représentée dans les Figures III-5 et III-6.

Nous remarquons que les concentrations de particules fines urbaines (PF-U) diminuent tout au long de la campagne alors que celles des PUF évoluent différemment. D'autre part, la composition relative des PF-U demeure relativement constante durant la campagne (Figure III-5).

Pour le site urbain, les espèces NO_3^-, SO_4^{2-}, C total et Ca^{2+} constituent en moyenne 72 % des espèces analysées dans les particules fines PF-U (Figure III-5). Les espèces dominantes dans les PUF-U sont le SO_4^{2-} et le C total constituant en moyenne environ 77 % des espèces totales analysées (Figure III-6).

Tableau III-3 : Concentrations (ng/m^3) en ions inorganiques, éléments majeurs, éléments traces et carbone total dans les échantillons de particules fines et ultrafines collectées à Sin El-Fil (site urbain).

(ng/m^3)	Particules fines urbaines (PF-U)					Particules ultrafines urbaines (PUF-U)				
Espèces	**U1**	**U2**	**U3**	**U4**	**U5**	**U1**	**U2**	**U3**	**U4**	**U5**
Na^+	825	838	841	983	753	359		200	548	308
NH_4^+	180	348	160	141	265	1342		1384	212	383
K^+	88,45	55,08	47,24	56,90	49,88	122		73,92	76,99	75,06
Mg^{2+}	178	129	112	125	81,82	43,14		23,96	65,72	36,98
Ca^{2+}	2497	1957	1113	1074	756	1325		637	760	548
Cl^-	983	427	634	1002	379	20,27		10,65	320	119
NO_3^-	4070	2700	2556	1809	1635	954		338	1084	792
PO_4^{3-}	< LDQ	< LDQ	< LDQ	< LDQ	< LDQ	<LDQ		<LDQ	<LDQ	<LDQ
SO_4^{2-}	2293	3132	1411	1292	1420	7413		6571	11233	4654
Ag	0,04	0,03	0,02	0,01	0,02	0,06		0,02	ND	ND
Al	1212	543	510	194	217	ND		ND	ND	ND
As	0,31	0,31	0,20	0,19	0,18	ND		ND	ND	ND
Ba	23,90	39,58	57,35	11,66	22,33	ND		ND	9,49	17,73
Bi	0,31	0,18	0,17	0,10	0,10	0,17		0,16	0,12	0,12
Cd	0,08	0,08	0,05	0,03	0,09	0,18		0,17	0,24	0,05
Co	0,48	0,23	0,18	0,13	0,11	0,24		0,09	0,22	0,07
Cr	3,33	1,71	1,66	0,86	0,82	2,34		0,15	0,54	0,14
Cu	53,97	38,31	19,38	13,96	35,71	34,75		17,23	8,68	18,26
Fe	996	478	471	229	213	375		135	85,38	59,60
Mn	15,55	7,13	7,35	3,29	3,40	6,33		2,13	2,32	1,08
Nb	0,62	0,45	0,20	0,13	0,10	ND		ND	ND	ND
Ni	4,29	3,10	3,02	1,40	1,11	9,68		3,40	1,70	2,02
P	54,49	19,40	23,65	19,12	11,35	30,30		14,28	20,84	7,91
Pb	4,96	5,23	4,15	1,98	2,58	4,01		3,60	6,10	3,55
Rb	1,15	0,49	0,34	0,29	0,26	ND		ND	ND	ND
Sb	1,41	0,98	0,71	0,41	0,54	1,14		0,33	0,75	0,76
Sc	0,24	0,11	0,07	0,04	0,03	ND		ND	ND	ND
Sn	1,27	1,01	0,92	0,32	0,68	3,05		0,84	0,63	1,04
Sr	10,66	5,57	5,96	3,50	2,69	ND		ND	0,69	0,96
Te	< LDQ	< LDQ	< LDQ	< LDQ	< LDQ	< LDQ		<LDQ	<LDQ	<LDQ
Ti	110	53,90	155	24,74	36,69	ND		ND	34,79	33,53
Tl	0,16	0,12	0,16	0,10	0,20	ND		ND	0,005	0,003
V	3,94	2,35	1,49	0,91	1,38	23,19		9,77	5,24	5,84
Zn	26,58	50,28	46,11	15,30	17,26	ND		ND	16,34	15,95
C total	3712	2871	2300	1986	1623	7512		4406	3794	3339

ND = non déterminé ; <LDQ = inférieur à la limite de quantification.

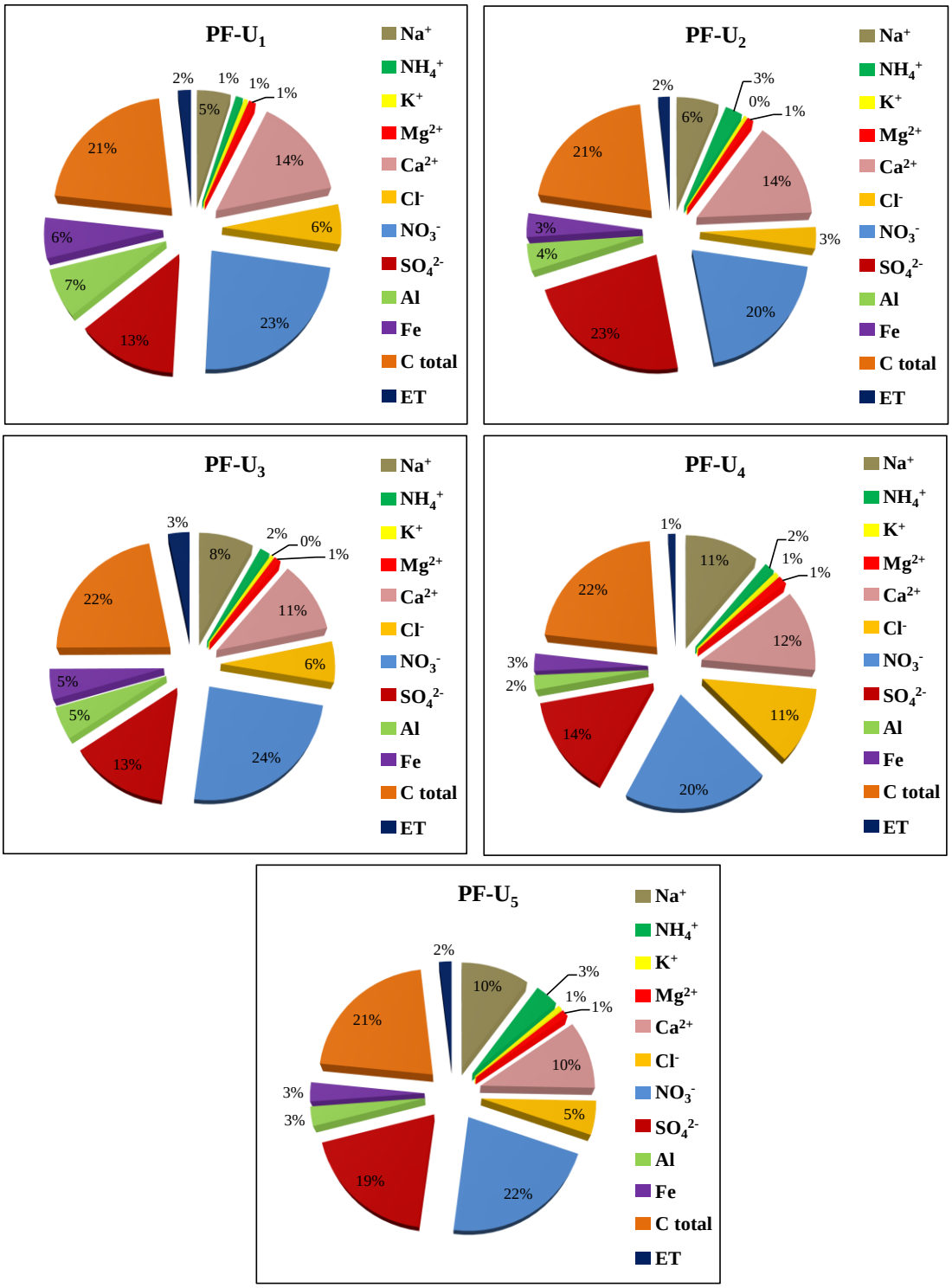


Figure III-5 : Répartition des ions inorganiques, du carbone total et des éléments majeurs et traces dans les particules fines (PF) des échantillons du site urbain.

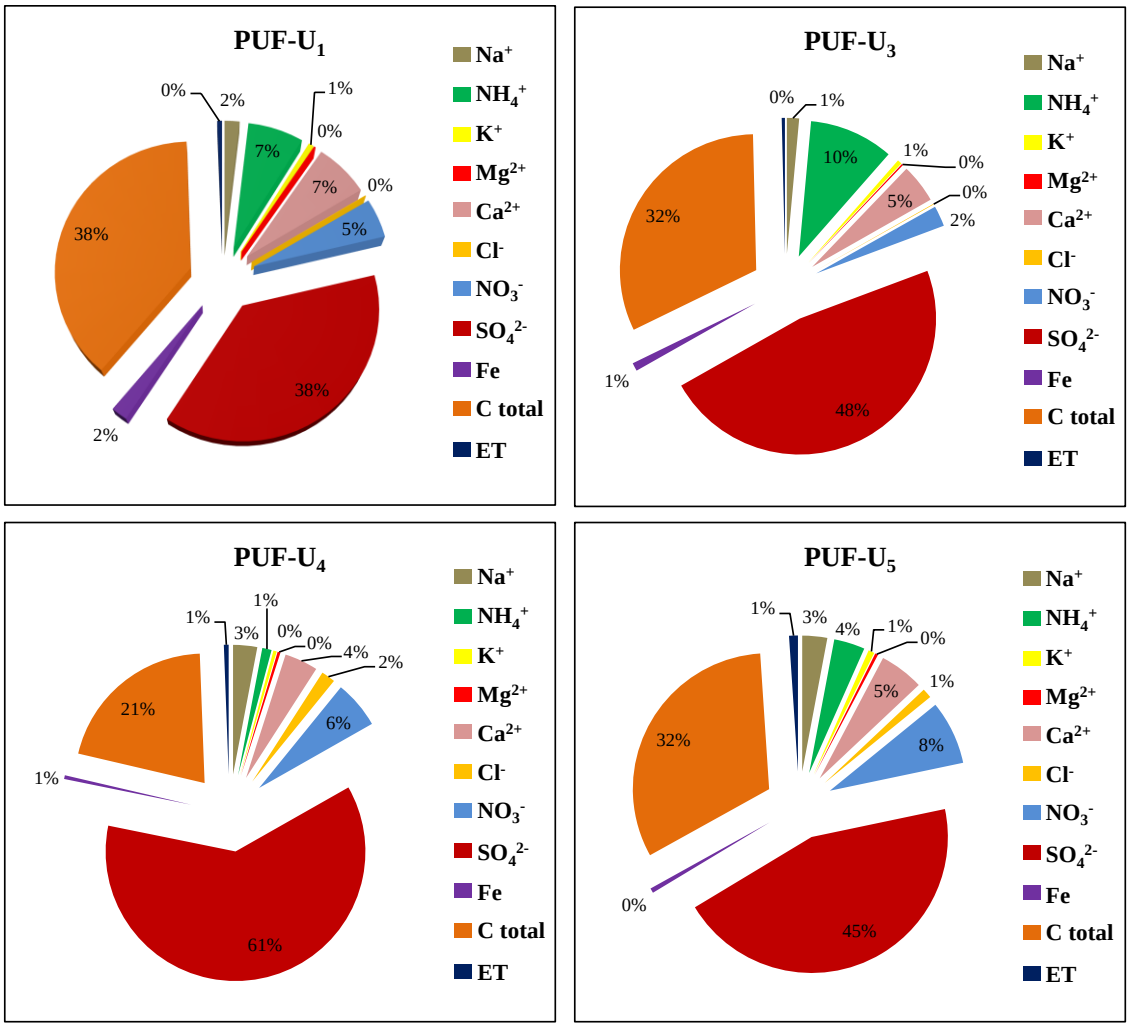


Figure III-6 : Répartition des ions inorganiques, du carbone total et des éléments majeurs et traces dans les particules ultrafines (PUF) des échantillons du site urbain.

Les teneurs des éléments de la croûte terrestre (Ca^{2+}, Mg^{2+} et Fe) sont plus élevées dans les particules fines que dans les particules ultrafines. Parmi les métaux présents dans les PF-U, l'Al et le Fe sont les plus abondants (environ 8%). Concernant les teneurs en ions inorganiques secondaires, une dominance des ions nitrates est observée pour tous les échantillons de PF urbains, avec $[NO_3^-] > [SO_4^{2-}] > [NH_4^+]$ à l'exception de PF-U_2 ayant $[SO_4^{2-}] > [NO_3^-] > [NH_4^+]$. Par contre, pour les PUF-U les ions SO_4^{2-} dominent avec $[SO_4^{2-}] > [NO_3^-] > [NH_4^+]$ à l'exception de PUF-U_1 et PUF-U_3 ayant $[NH_4^+] > [NO_3^-]$.

Les PUF contiennent une plus grande proportion de particules inorganiques secondaires surtout le sulfate par rapport aux échantillons de PF-U. De plus, le carbone total, apparait présent dans les PUF-U à des concentrations environ deux fois plus élevées que dans les PF-U (entre

3339 et 7512 ng/m^3 dans les PUF contre 1623-3712 ng/m^3 dans les PF). Ces valeurs élevées pourraient s'expliquer par l'utilisation largement développée au Liban de carburant soufré (diesel) dans les bus, les camions et les groupes électrogènes dont la combustion entraîne la formation de suies carbonées riches en soufre. Ce type de suies a par ailleurs pu être observé dans nos échantillons par microscopie électronique (voir chapitre 4, Figure IV-4).

L'influence marine dans les échantillons de PF urbaines a été mise en évidence par la présence de teneurs élevées en ions Na^+, Cl^- et Mg^{2+}. Cette influence est moins significative dans les échantillons de PUF-U, en cohérence avec la littérature qui décrit les aérosols marins comme des particules de taille majoritairement supérieure au µm. Les échantillons de PF-U_1 et PF-U_4 possèdent un rapport [Cl^-] / [Na^+] de 1,19 et 1,02 respectivement, soit une valeur inférieure à celle dans l'eau de mer ([Cl^-] / [Na^+] =1,789) (Seinfeld et Pandis, 2006). Ce rapport est encore plus faible 0,51 ; 0,75 et 0,50 pour les échantillons de PF-U_2, PF-U_3 et PF-U_5 respectivement. L'obtention de rapports [Cl^-] / [Na^+] plus faible que celui rencontré dans l'eau de mer est un phénomène connu. Il s'explique par la réaction de l'acide nitrique (HNO_3) et l'acide sulfurique (H_2SO_4), issus respectivement des oxydes d'azote et du dioxyde de soufre, avec le NaCl présent dans les particules aboutissant à la formation de HCl et par la suite à un déficit en Cl^- dans les particules. Ce déficit est compensé par l'association d'ions NO_3^- et SO_4^{2-} avec les ions Na^+. Ce phénomène illustre un phénomène de vieillissement de l'aérosol marin. Enfin, il apparaît que la part d'aérosols marins la plus élevée est détectée dans l'échantillon PF-U_4, échantillon pour lequel non seulement la masse d'air présente une origine marine, mais aussi des vents > 8m/s ont été relevés.

Durant la première période d'échantillonnage des particules à Sin El-Fil, une tempête de poussières provenant de l'Iraq et de la Syrie s'est déroulée du 18 au 20 mai 2011 (Figure III-2 A1). Un échantillon de sable, retombée sèche du 18 mai 2011, a été recueilli et analysé pour sa composition en ions inorganiques, éléments majeurs et éléments traces (Tableau III-4).

Tableau III-4 : Concentrations (µg/g) des métaux et des ions inorganiques dans l'échantillon de sable (retombée sèche) collecté à Sin El-Fil le 18 mai 2011.

Eléments	µg/g	Eléments	µg/g
Ag	1,73	P	1 529
Al	52 299	Pb	20,99
As	6,23	Rb	46,19
Ba	288	Sb	1,25
Bi	0,34	Sc	11,83
Ca	129 734	Sn	2,94
Cd	2,47	Sr	316
Co	15,14	Ti	4 519
Cr	95,58	Tl	0,32
Cu	24,98	V	99,14
Fe	33 177	Zn	111
K	13 311	NH_4^+	22,37
Mg	26 885	Na^+	204
Mn	553	Cl^-	114
Nb	18,51	NO_3^-	569
Ni	82,97	SO_4^{2-}	2 003

Parmi les éléments analysés, le Ca, l'Al, le Fe, le Mg, le K, le Ti, le P, le Mn et le Sr sont les éléments présents majoritairement dans l'échantillon de sable par ordre décroissant de leurs concentrations. En accord avec des travaux de la littérature (Ayden *et al.*, 2012 ; Kalderon-Asael *et al.*, 2009) les retombées de poussières désertiques issues du Moyen-Orient sont riches en Fe, Ca, et Al ; elles sont caractérisées, dans des proportions moindres, par la présence des éléments Mn et Cr. Cette information tend à confirmer que les retombées constatées à Beyrouth le 18 mai 2011 peuvent être assimilées à des retombées de poussières désertiques. De plus, selon Alderon-Asael et ses collaborateurs, l'abondance de calcium par rapport à l'aluminium dans l'échantillon apparait comme une information compatible avec le fait que ces poussières ne proviendraient pas du Nord de l'Afrique. En effet, Les poussières venant du continent africain sont en principe caractérisées par un rapport Ca/Al <1.

L'échantillon de PF-U_1, collecté du 18 au 27 mai 2011, présente un profil d'éléments majoritaires similaire à celui de l'échantillon de sable avec [Ca^{2+}] > [Al] > [Fe] > [Mg^{2+}] > [Ti] > [K^+] > [P] > [Mn] > [Sr]. Nous pouvons en déduire que la composition de l'échantillon de PF-U_1 collecté a été influencé de manière significative par cette tempête de sable entrainé dans une masse d'air venant d'un secteur nord-est (Figure III-2 A1).

Pour les échantillons suivants, PF-(U_2 à U_5) respectivement, nous constatons que les concentrations de Ca^{2+}, Al, Fe et Mg^{2+} décroissent progressivement, laissant suggérer que l'influence de la tempête sur la composition des particules ne s'est pas arrêtée dès l'instant où le vent a cessé de souffler. Nous émettons ici l'hypothèse d'une possible remise en suspension des particules amenées par la tempête impactant les échantillons collectés plusieurs jours après la survenue de la tempête.

3.1.2. Site Rural

Les concentrations des ions, éléments majeurs, C total et éléments traces présents dans les échantillons de PF et de PUF collectés à Bejje sont présentées dans le Tableau III-5. Les répartitions des espèces analysées dans les particules fines et les particules ultrafines rurales sont représentées sur les Figures III-7 et III-8 respectivement.

Les concentrations totales des espèces analysées pour les PF-R varient entre 2200 et 17200 ng/m^3. Cette variabilité est moindre pour les PUF (6000 à 11000 ng/m^3) (Tableau III-5). Nous pouvons suggérer que le milieu rural peut générer de part des activités épisodiques des quantités plus importantes de particules fines alors que les émissions de PUF demeurent relativement plus constantes à un facteur 2 près.

Tableau III-5 : Concentrations (ng/m^3) en ions inorganiques, éléments majeurs, éléments traces et carbone total dans les échantillons de particules fines et ultrafines collectées à Bejje (site rural).

(ng/m^3)	Particules fines rurales (PF-R)				Particules ultrafines rurales (PUF-R)			
Espèces	**R6**	**R7**	**R8**	**R9**	**R6**	**R7**	**R8**	**R9**
Na^+	406	359	140	390	628	166	404	322
NH_4^+	33,27	10,11	1,83	39,74	11,67	30,02	0,00	74,18
K^+	32,02	283	18,52	94,22	111	42,96	92,33	92,09
Mg^{2+}	34,11	565	27,03	181	75,39	19,94	48,43	38,68
Ca^{2+}	288	3353	271	1441	325	642	751	1201
Cl^-	17,22	99,76	81,85	366	10,67	77,59	137	150
NO_3^-	423	2556	859	4082	913	1148	1874	2044
PO_4^{3-}	< LDQ	< LDQ	< LDQ	< LDQ	< LDQ	< LDQ	< LDQ	< LDQ
SO_4^{2-}	404	1454	138	822	6735	3096	5387	4860
Ag	0,00	0,02	0,00	0,01	0,03	0,08	0,02	0,02
Al	482	2986	182	942	ND	ND	ND	ND
As	0,14	0,57	0,04	0,20	ND	ND	ND	ND
Ba	2,71	17,23	1,61	6,26	2,18	7,17	3,41	3,33
Bi	0,08	0,20	0,03	0,07	0,18	0,23	0,09	0,07
Cd	0,03	0,08	0,01	0,03	0,12	0,11	0,13	0,10
Co	0,09	1,06	0,05	0,35	0,12	0,12	0,05	0,10
Cr	0,45	4,03	0,22	1,16	0,40	7,61	0,87	1,17
Cu	5,60	2,69	0,73	1,36	2,86	10,13	3,46	3,11
Fe	132	1949	110	629	45,03	277	179	250
Mn	2,12	34,10	1,76	10,69	1,21	7,11	3,51	4,64
Nb	0,08	1,12	0,08	0,38	ND	ND	ND	ND
Ni	1,15	5,06	0,53	1,52	3,81	10,18	2,26	2,73
P	9,44	89,40	8,25	43,60	12,36	20,08	20,16	36,36
Pb	1,02	2,51	0,31	2,01	1,91	3,51	2,40	4,92
Rb	0,28	2,97	0,19	0,96	ND	ND	ND	ND
Sb	0,19	0,17	0,08	0,14	0,77	2,42	0,79	0,79
Sc	0,01	0,48	0,02	0,16	ND	ND	ND	ND
Sn	0,31	0,51	0,07	0,12	0,46	23,64	0,88	1,43
Sr	1,38	21,03	1,21	7,34	0,66	2,38	1,79	2,87
Te	< LDQ	< LDQ	< LDQ	< LDQ	< LDQ	< LDQ	< LDQ	< LDQ
Ti	15,68	217	14,22	72,77	5,66	32,16	26,51	29,54
Tl	0,01	0,02	0,00	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01
V	0,87	4,15	0,37	1,52	11,02	4,77	6,15	6,72
Zn	6,29	12,76	1,77	7,49	11,75	238	9,55	9,13
C total	354	3171	358	1156	1159	641	1678	2377
Total	**2654**	**17203**	**2219**	**10301**	**10069**	**6510**	**10633**	**11516**

Nous pouvons remarquer que les échantillons de PUF-R sont très similaires en terme de répartition des composés chimiques à l'exception du PUF-R_6 ayant plus de SO_4^{2-} (67%) et moins de NO_3^- (9%), Fe (0,4%) et Ca^{2+} (3%) que les autres échantillons (en moyenne 47%, 18%, 3% et 9% de SO_4^{2-}, NO_3^-, Fe et Ca^{2+} respectivement) (Figure III-8). Les espèces dominantes dans les PUF-R sont le SO_4^{2-}, le NO_3^- et le C total constituant en moyenne 82 % des espèces totales analysées (Figure III-8).

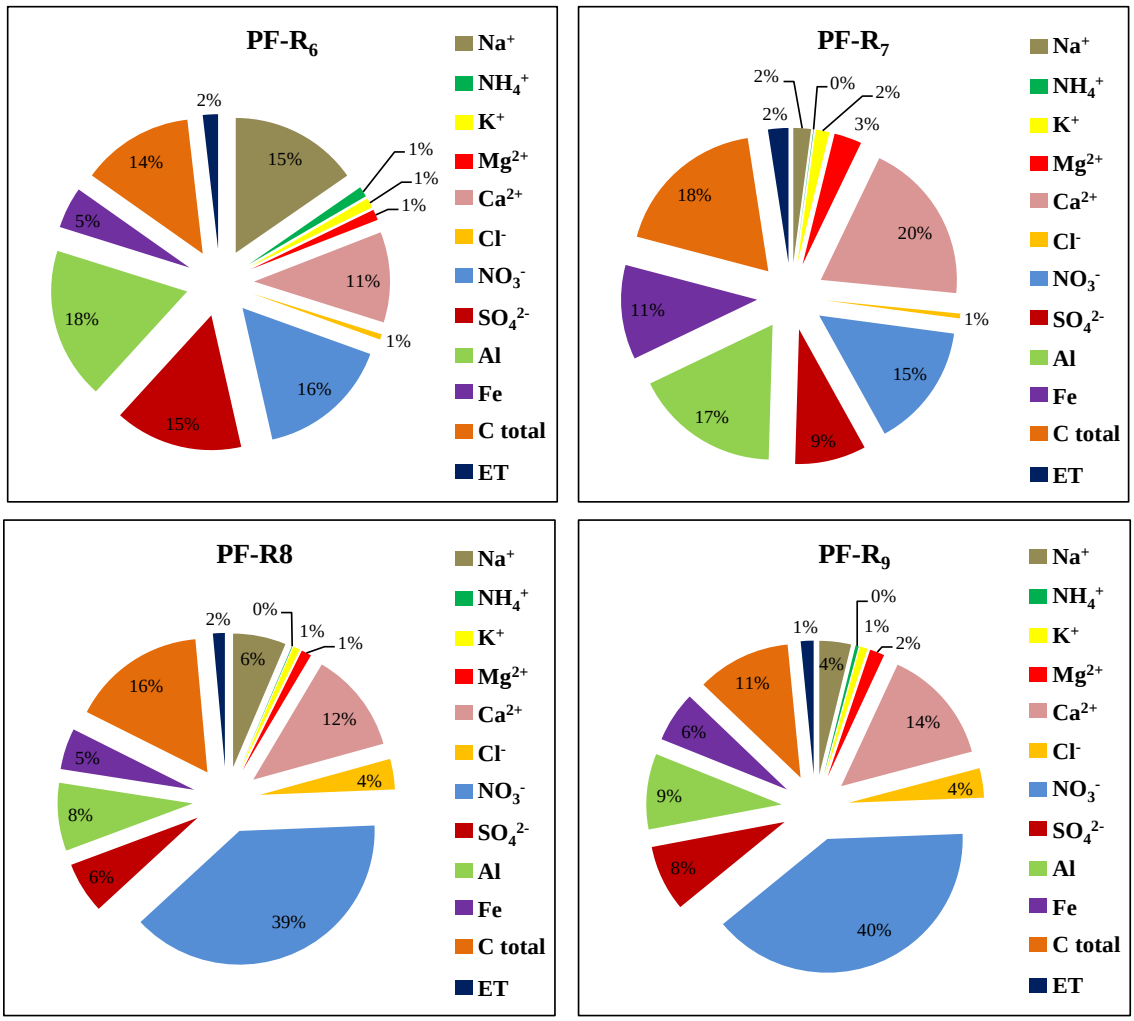


Figure III-7 : Répartition des ions inorganiques, du carbone total et des éléments majeurs et traces dans les particules fines (PF) des échantillons du site rural.

Quant aux PF, la répartition des échantillons de PF-R_6 et PF-R_7 est très différente de celle des PF-R_8 et PF-R_9 (qui sont très similaires en termes de répartition). Le PF-R_7 est plus riche en Ca^{2+}, Fe et Mg^{2+} (éléments de la croûte terrestre) ayant comme source possible une tempête sèche survenue à la fin de septembre et qui a entrainé la remise en suspension de particules du

sol de Bejje (espace naturel) enrichissant ainsi ces particules en éléments de la croûte terrestre. Quant à la différence entre PF-R_6 et PF-R_7, le dernier est plus riche en Ca^{2+} et Mg^{2+} que le premier (PF-R_6) qui, à l'inverse, est plus riche en Na^+ (Figure III-7).

Les proportions en éléments majeurs de la croûte terrestre (Ca, Fe, Al, Mg) dans les PF-R sont supérieures à celles dans les PUF-R. En effet, la contribution de ces éléments à la composition des PF-R est importante et varie entre 25 et 48 % des éléments totaux analysés et cela est dû à la nature du sol du site rural duquel des particules des modes grossiers et fins peuvent être mis en suspension dans l'air.

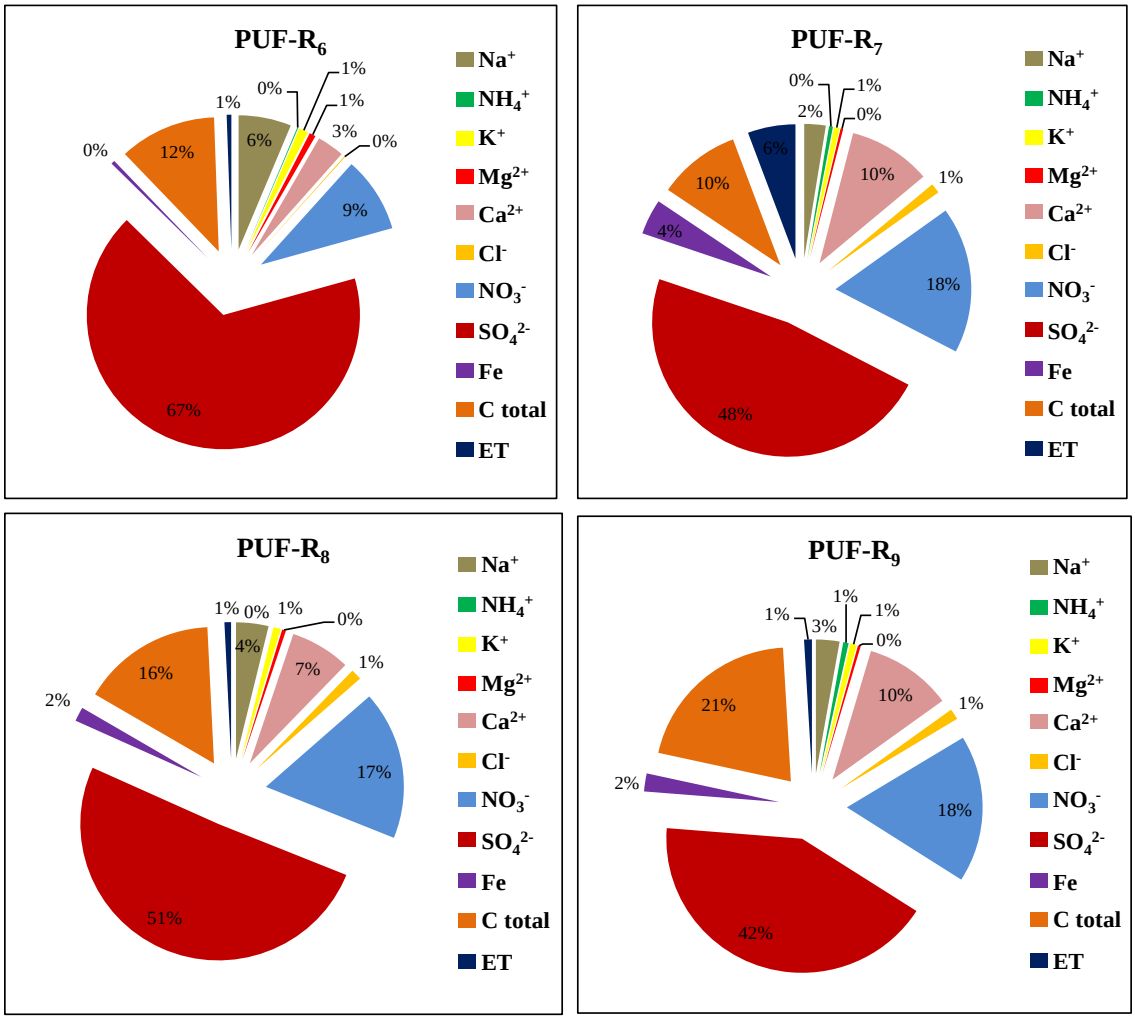


Figure III-8 : Répartition des ions inorganiques, du carbone total et des éléments majeurs et traces dans les particules ultrafines (PUF) des échantillons du site rural.

Sur le site rural, la proportion des ions Na^+, Cl^- et Mg^{2+} est plus élevée dans les PF-R que les PUF-R (Figures III-7 et III-8) montrant ainsi une influence marine surtout dans les PF. Le rapport des concentrations [Cl^-] / [Na^+] est inférieur à celui de l'eau de mer pour tous les

échantillons ruraux (0,04 ; 0,28 ; 0,58 et 0,94 pour PF-R(6 à 9) respectivement, et 0,02 ; 0,47 ; 0,34 et 0,47 pour PUF-R(6 à 9) respectivement) mettant en évidence une perte en ions Cl^-, de la manière que ce phénomène a été constaté pour les échantillons collectés sur le site urbain.

Les ions inorganiques secondaires (SO_4^{2-}, NO_3^- et NH_4^+) constituent en moyenne 37% et 67 % de l'ensemble des espèces analysées dans les PF-R et les PUF-R respectivement. Les PUF contiennent donc la plus grande proportion de particules inorganiques secondaires ce qui est en accord avec la littérature (Ansari et Pandis, 1999 ; Schlesinger et Cassee, 2003 ; Seinfeld et Pandis, 2006).

Une dominance des ions nitrates est observée pour tous les échantillons de PF rurales, avec $[NO_3^-] > [SO_4^{2-}] > [NH_4^+]$. Par contre, pour les PUF-R les ions SO_4^{2-} dominent avec $[SO_4^{2-}] > [NO_3^-] > [NH_4^+]$. Quant au carbone total, les concentrations dans les PUF (entre 1159 et 2377 ng/m^3) sont supérieures à celles contenues dans les PF (entre 354 et 1156 ng/m^3) à l'exception du PUF-R_7. De la même manière que pour le site urbain, les fortes proportions de C total et SO_4^{2-} dans les PUF pourraient être associées en partie aux émissions liées à des processus de combustion, faisant appel à des combustibles avec une teneur relativement élevée en soufre.

3.1.3. Comparaison de la composition des particules collectées en milieu urbain et rural

Dans ce paragraphe, un bilan comparatif des aérosols collectés en milieu urbain et rural est présenté. Rappelons que l'échantillonnage n'a pas été réalisé simultanément sur les 2 sites.

3.1.3.a. Les particules fines

La concentration moyenne de PF dans l'atmosphère en milieu urbain (26 µg/m^3) est supérieure à celle en milieu rural (12 µg/m^3) sans tenir compte du PF-R_7 ayant une concentration élevée correspondant en partie à un épisode particulier qui s'est déroulé durant l'échantillonnage. Le site urbain est influencé par de nombreuses sources directes et indirectes de particules fines telles que la combustion de carburants (trafic routier dense, groupes électrogènes) et les activités liées à la proximité du port et de l'aéroport de Beyrouth qui peuvent venir s'ajouter à la remise en suspension de « poussières de sol » par la circulation des véhicules sur les routes. Tous ces facteurs peuvent favoriser la formation de particules fines et pourraient expliquer leurs concentrations plus élevées rencontrées dans le site urbain par rapport au site rural.

Les espèces dominantes dans les PF-U sont le NO_3^-, le SO_4^{2-}, le C total et le Ca^{2+} alors que celles dans les PF-R sont le NO_3^-, le C total et le Ca^{2+}. La proportion en éléments caractéristiques de la croûte terrestre (Al, Fe et Ca^{2+}) est supérieure dans les PF-R du fait de la proportion moindre en NO_3^- et SO_4^{2-} (moins de sources locales des précurseurs de NO_3^- et SO_4^{2-}).

Concernant les ions inorganiques secondaires (NO_3^-, SO_4^{2-} et NH_4^+), leurs teneurs sont plus élevées dans les PF-U que dans les PF-R. Toutefois le même ordre d'abondance de ces ions existent dans les 2 sites avec $[NO_3^-] > [SO_4^{2-}] > [NH_4^+]$ à l'exception du PF-U_2 ayant $[SO_4^{2-}] > [NO_3^-]$. Les teneurs plus élevées de NO_3^- et SO_4^{2-} dans le site urbain pourraient être dues à la présence des sources plus importantes de NO_x et SO_2 qui, par conversion gaz-particules, se transforment en ions nitrates et sulfates respectivement. Les principales sources de NO_x dans le site urbain sont les phénomènes de combustion notamment par le système de transport qui se caractérise par un trafic très dense dans l'agglomération de Beyrouth. Quant au SO_2, l'utilisation fréquente de combustibles soufrés dans les centrales électriques, les groupes électrogènes et les véhicules lourds (bus et camions) constitue la principale source de SO_2 dans le site urbain (Waked *et al.,* 2012 ; MoE-ECODIT, 2010).

Cependant, il a été constaté que les concentrations en ions NH_4^+ ne suffisent pas pour établir une compensation de charges, ou neutralisation, avec les ions NO_3^- et SO_4^{2-}. Ce phénomène pourrait en partie s'expliquer d'une part par les taux d'émission relativement faibles de précurseurs d'ammonium dans la région, et d'autre part en raison de l'instabilité des sels d'ammonium sous forme particulaire dans des atmosphères relativement chauds, comme cela a été rencontré lors des campagnes d'échantillonnage. Dans ce cas, la neutralisation des espèces NO_3^- et SO_4^{2-} pourrait être expliquée par leur association avec d'autres cations, comme Ca^{2+}, Na^+ et Mg^{2+}, sans exclure d'autres ions de métaux de transition (Arruti *et al.,* 2011).

Notre site urbain étant plus proche de la mer, les particules fines collectées à Sin El-Fil (PF-U) présentent des teneurs plus élevées en Na^+ et Cl^- (entre 1000 et 2000 ng/m^3) que les particules du site rural (entre 200 et 750 ng/m^3).

De la même manière, les sources de combustion étant plus nombreuses en ville, ceci pourrait expliquer les teneurs plus élevées en C total (de même en SO_4^{2-}) remarquées dans les particules fines urbaines.

3.1.3.b. Les particules ultrafines

Comme pour les particules fines, les concentrations des PUF-U dans l'atmosphère (en moyenne 15 µg/m^3) sont supérieures à celles des PUF-R (en moyenne 10 µg/m^3).

Les espèces SO_4^{2-}, le C total et NO_3^- sont les constituants majeurs des PUF-U et PUF-R. La participation des éléments majeurs tels que le Ca^{2+} et le Fe à la concentration des PUF est faible pour les 2 sites. En raison de leur profil granulométrique dominant sur les modes fins et grossiers, une influence marine moins prononcée est observée dans les PUF-(U et R) en comparant aux PF.

L'espèce SO_4^{2-} domine les ions inorganiques secondaires dans les particules ultrafines collectées en milieu urbain et rural avec $[SO_4^{2-}] > [NO_3^-] > [NH_4^+]$ à l'exception des PUF-U (1 et 3) où les teneurs en NH_4^+ sont supérieures à celles du NO_3^-. Il en est de même pour le C total qui se trouve à des teneurs plus élevées dans les PUF-U (entre 3339 et 7512 ng/m^3) que dans les PUF-R (entre 641 et 2377 ng/m^3).

3.2. Facteur d'enrichissement

Afin d'étudier l'étendue de la contribution des émissions anthropiques dans la composition des PF et des PUF collectées, le facteur d'enrichissement a été calculé. En effet, ce facteur est capable de mettre en évidence l'origine anthropique ou naturelle des éléments en comparaison avec la composition du sol. Le Facteur d'Enrichissement (F.E.) d'un élément X contenu dans les particules est défini par le rapport de concentrations suivant (Mason, 1967 ; Pélassy, 1984 ; Rahn, 1976) :

$$F.E. = \frac{[X]_{aérosol}/[élément\ de\ référence]_{aérosol}}{[X]_{croûte}/[élément\ de\ référence]_{croûte}}$$

L'application de cette relation nécessite d'avoir les données de la composition moyenne du sol dans la zone étudiée. Ces données ont été obtenues à partir des études réalisées par K. Hans Wedepohl (Wedepohl, 1995). De plus, il faut considérer comme référence un élément dont la présence dans l'atmosphère s'explique exclusivement par des apports de la croûte terrestre. L'élément de référence qui a été retenu est le Titane (Ti) ; cet élément est largement utilisé dans la littérature.

Il a été bien établi que les éléments possédant un F.E. inférieur à 10 sont principalement d'origine crustale tandis que les éléments avec un F.E. supérieur à 10 sont considérés comme fortement enrichis et provenant essentiellement de sources anthropiques (Chester *et al*., 1999).

3.2.1. Site urbain

Les facteurs d'enrichissement ont été calculés pour les éléments traces suivants : Ag, Ba, Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, P, Pb, Sb, Sn, V et Zn pour les échantillons de PF et de PUF urbains ainsi que pour l'échantillon de sable (Figure III-9).
Il faut noter que le titane, élément de référence utilisé pour calculer le F.E., n'a pu être quantifié pour les échantillons de PUF-U (1 et 3) en raison d'un niveau de blanc de filtre relativement élevé en Ti. A titre de comparaison, les F.E. calculés pour l'échantillon de retombées sèches collecté suite à la tempête qui s'est produite durant la période 1 (18 mai 2011) sont également présentés.

Les F.E. de Bi, Cd, Cu, Pb, Sb et Zn sont supérieurs à 10 pour les PF et les PUF urbains donc ces éléments sont fortement enrichis mettant en évidence leurs origines anthropiques pour les deux granulométries d'aérosol. De plus, nous constatons que le Cd, Pb, Sb et Sn sont plus enrichis dans les PUF que les PF.

Les éléments tels que Cu et Sb sont principalement utilisés pour suivre les émissions de garnitures de frein de la circulation urbaine (Gietl *et al.,* 2010). L'origine de Sb est généralement identifiée comme provenant presque exclusivement de l'utilisation excessive des freins du véhicule dans les zones urbaines. D'autre part, le caoutchouc des pneus est riche surtout en Zn (Adachi et Tainosho, 2004) ainsi qu'en Cu, Pb, Mn, Co, Ni et Cd (Thorpe et Harrison, 2008). Par conséquent, suite au mouvement des véhicules sur les routes, ces éléments et surtout le Zn sont émis suite à l'usure de pneus des véhicules.

Les éléments traces présents dans l'échantillon de retombées sèches collecté durant la tempête de poussières de la 1ère période, sont principalement caractérisés par les valeurs de F.E. les plus faibles en comparaison avec les échantillons de PF et PUF. Ceci confirme l'origine essentiellement crustale de ces retombées. Il y a cependant une exception pour Cd et Ag, ayant un F.E. supérieur à 10, mais qui peuvent être vu comme une spécificité de ces retombées atmosphériques. D'ailleurs, il a été trouvé des valeurs similaires de F.E. pour Cd et Ag dans les

échantillons de retombées et de PF-U_1, ce qui tend à confirmer une fois de plus l'impact des retombées sur les concentrations de PF et leur composition chimique suite à cet épisode de poussières désertiques.

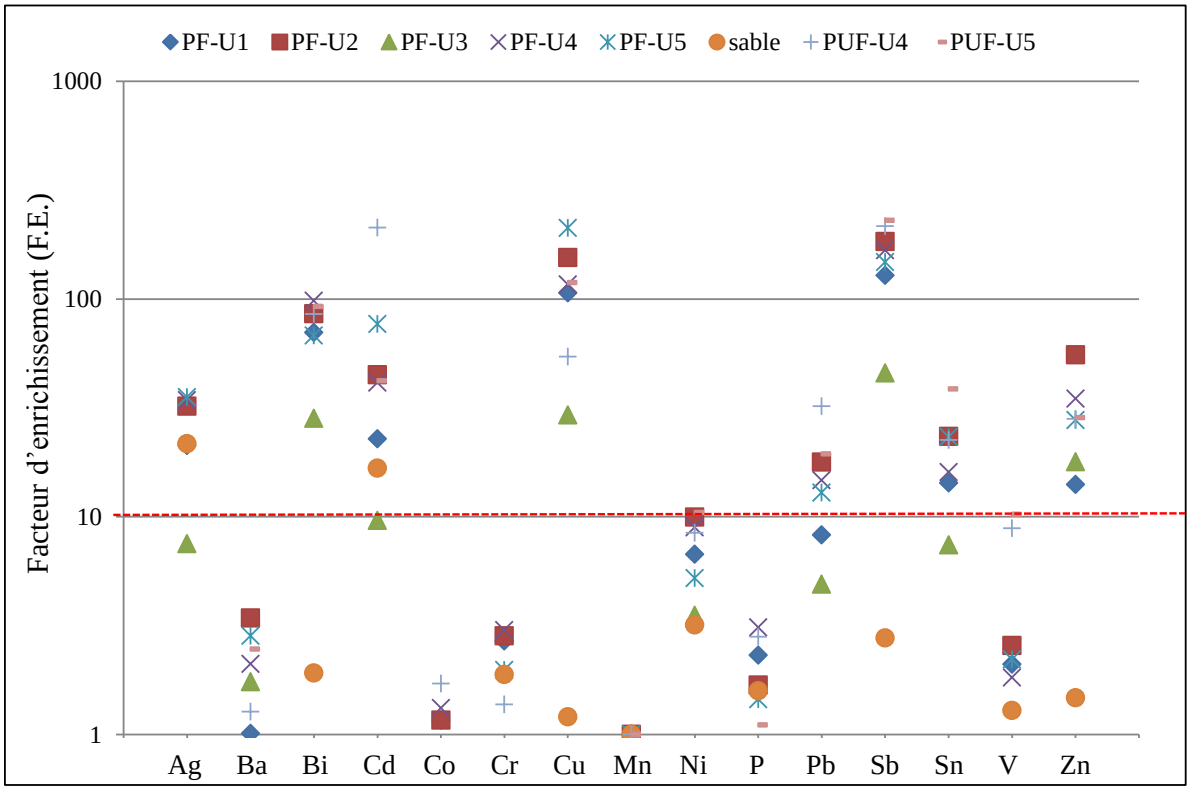


Figure III-9 : Facteurs d'enrichissement pour les éléments traces présents dans les échantillons de particules fines, de particules ultrafines et l'échantillon de sable (retombée sèche) collectés à Sin El-Fil (site urbain).

Parmi les échantillons de PF, le PF-U_3 présente, pour la majorité des éléments, les facteurs d'enrichissement les plus bas et donc l'enrichissement le plus faible pour tous les éléments traces analysés. La majorité des éléments traces sont plus enrichis dans le PF-U_5 en comparaison avec les autres échantillons de PF-U.

3.2.2. Site Rural

Afin de déterminer la contribution des émissions anthropiques dans la composition élémentaire des PF et des PUF rurales, les facteurs d'enrichissement des éléments traces, représentés dans la Figure III-10, ont été calculés.

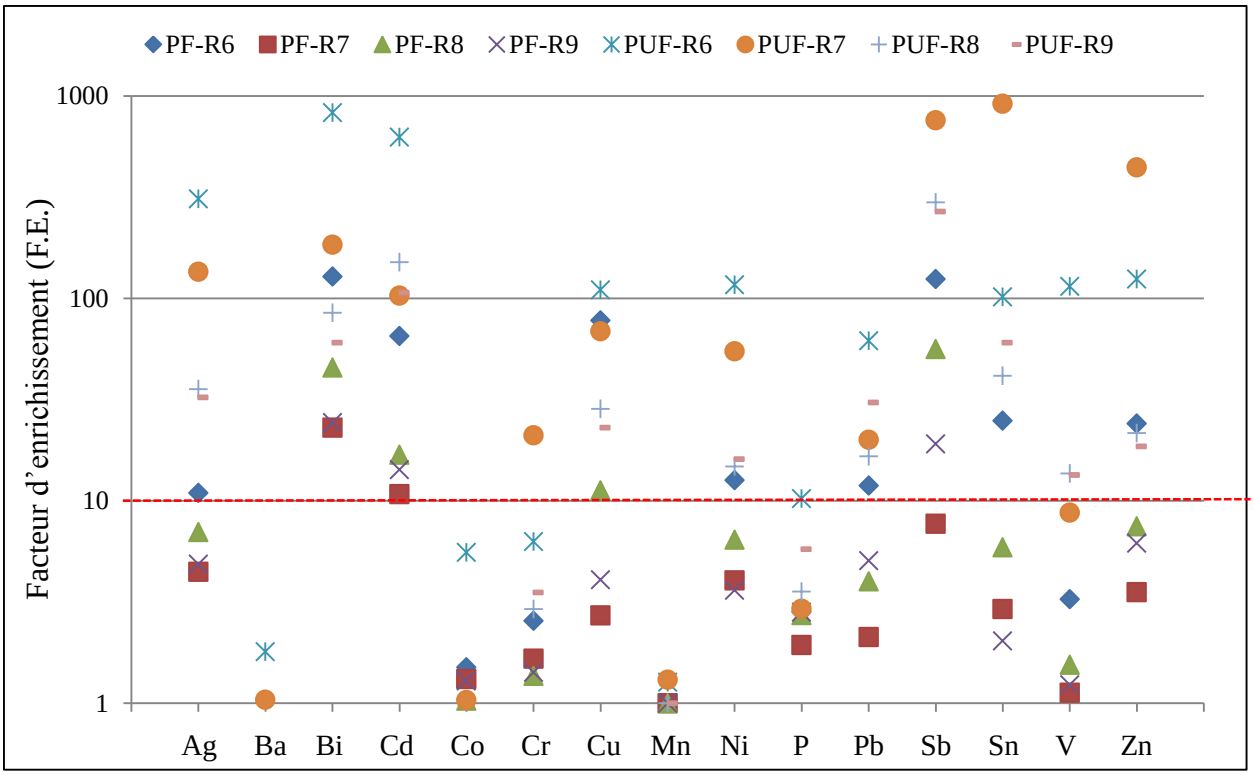


Figure III-10 : Facteurs d'enrichissement pour les éléments traces présents dans les échantillons des particules fines et des particules ultrafines collectés à Bejje (site rural).

Parmi les échantillons de PF-R, le PF-R6 possède les F.E. les plus élevés pour tous les éléments traces analysés. Nous avions vu (Figure III-7) que la répartition des éléments pour cet échantillon était très différente de celles des autres échantillons de particules rurales. Ceci confirme le caractère particulier de cet échantillon.

Les F.E. de Bi, Cd et Sb sont supérieurs à 10 pour les échantillons de PF-R mettant en évidence leurs origines anthropiques à l'exception du Sb pour le PF-R_7. D'autre part, les F.E. de l'Ag, Bi, Cd, Cu, Ni, Pb, Sb, Sn, V et Zn sont supérieurs à 10 pour les échantillons de PUF-R à l'exception du V dans le PUF-R_7 et parfois atteignent 1000 pour PUF-R_6 et PUF-R_8. Par conséquent, ces éléments sont fortement enrichis dans les échantillons de PUF-R et surtout dans PUF-R (6 et 8).

De plus, nous constatons que Ag, Bi, Cd, Cu, Ni, Pb, Sb et Zn dans les PUF possèdent des F.E. plus élevés que ceux des PF à l'exception du PF-R_6 ayant, pour certains éléments, des F.E. similaires à ceux des PUF-R. Donc les éléments traces dans les PUF-R présentent une origine anthropique plus marquée que dans le cas des PF-R.

3.3. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques

3.3.1. Concentrations des HAP dans les PF et les PUF

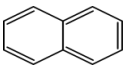
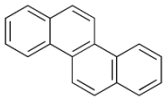
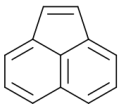
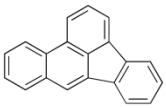
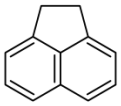
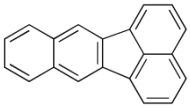
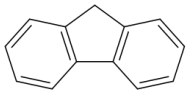
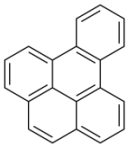
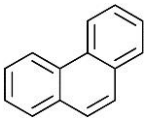
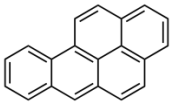
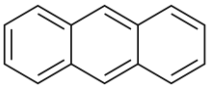
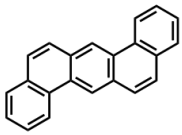
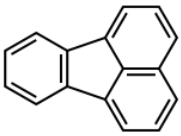
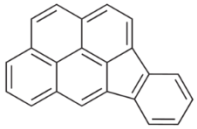
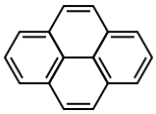
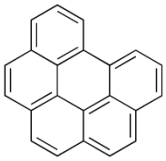
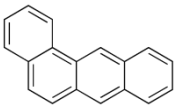
L'analyse des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) adsorbés à la surface des particules fines et ultrafines a été réalisée par GC-MS en suivant le protocole détaillé dans le chapitre 2. Cette analyse a uniquement été réalisée pour les échantillons de particules fines et ultrafines collectées à Sin-El-Fil puisque à part les échantillons de PF-(R7 et R9), la masse des particules échantillonnées sur le site rural est trop faible. 17 HAP ont été analysés dont trois sont classés cancérogènes de la classe 2A (cancérogène probable) et trois autres cancérogènes de la classe 2B (cancérogène possible) par le CIRC (IARC, 2010). La liste ainsi que la structure de ces HAP sont présentées dans le Tableau III-6. Les concentrations des HAP obtenus pour les PF-U et les PUF-U sont présentées dans les Figures III-11 et III-12 respectivement.

Les concentrations en HAP sont bien plus élevées dans les particules ultrafines (entre 0,405 et 1,646 ng/m^3) que dans les particules fines urbaines (entre 0,119 et 0,352 ng/m^3) pour tous les échantillons. Il est connu que les PUF, comparées aux PF, montrent à masse égale une surface d'adsorption beaucoup plus importante, et sont donc un support privilégié pour l'adsorption des composés organiques.

Les composés majoritaires dans les PF sont le B[b]Fl, le B[e]P et le B[g,h,i]Pe et ce pour tous les échantillons de PF-U. De plus, l'InPy et le Phe ont des teneurs élevées dans les échantillons de PF-U (1 et 2) et de PF-U_5 respectivement.

Concernant les PUF, le B[b]Fl, l'InPy et le B[g,h,i]Pe constituent les composés majoritaires pour tous les échantillons de PUF-U sachant que les échantillons de PUF-U_3 et de PUF-U_4 possèdent aussi des teneurs importantes en naphtalène et phénanthrène respectivement.

Tableau III-6 : Structures chimiques des HAP analysés

Nom	Structure	Nom	Structure
Naphtalène (Nap)		Chrysène (Chr)	
Acénaphtylène (Acy)		Benzo[b]fluoranthène (B[b]Fl)	
Acénaphtène (Ace)		Benzo[k]fluoranthène (B[k]Fl)	
Fluorène (Flu)		Benzo([e]pyrène (B[e]P)	
Phénanthrène (Phe)		Benzo[a]pyrène (B[a]P)	
Anthracène (Anth)		Dibenzo[a,h]anthracène (DiB[a,h]An)	
Fluoranthène (Fla)		Indéno[1,2,3-cd]pyrène (InPy)	
Pyrène (Pyr)		Benzo[g,h,i]perylène (B[g,h,i]Pe)	
Benzo[a]anthracène (B[a]An)			

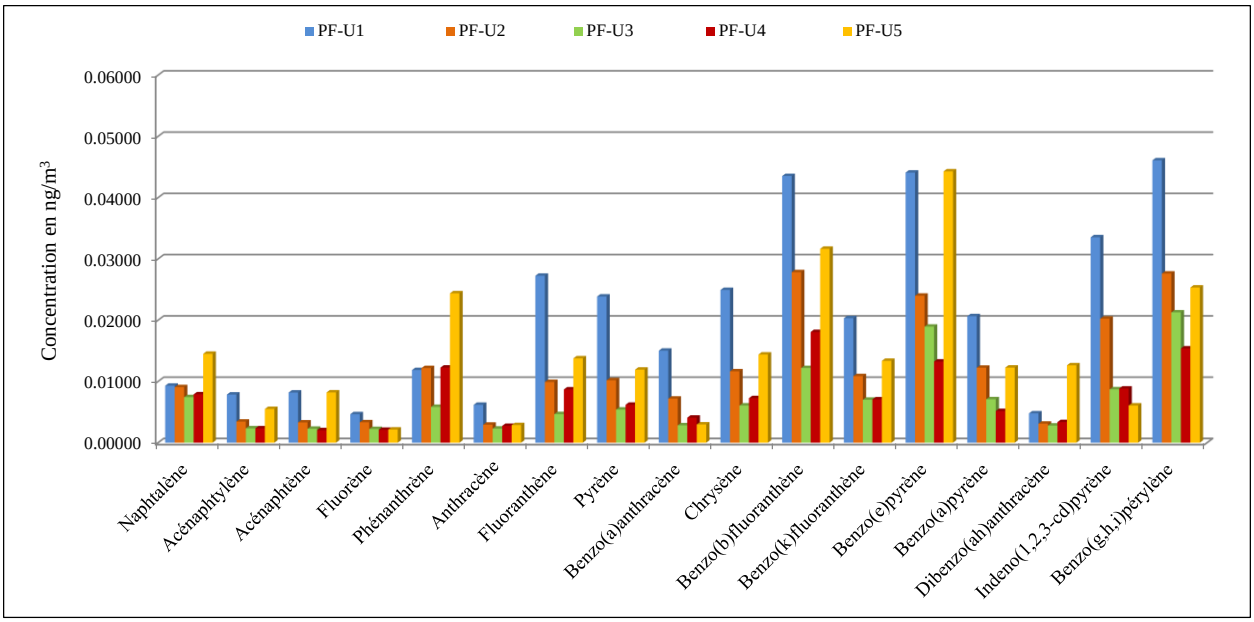


Figure III-11 : Profils des hydrocarbures aromatiques polycycliques pour les particules fines collectées à Sin El-Fil.

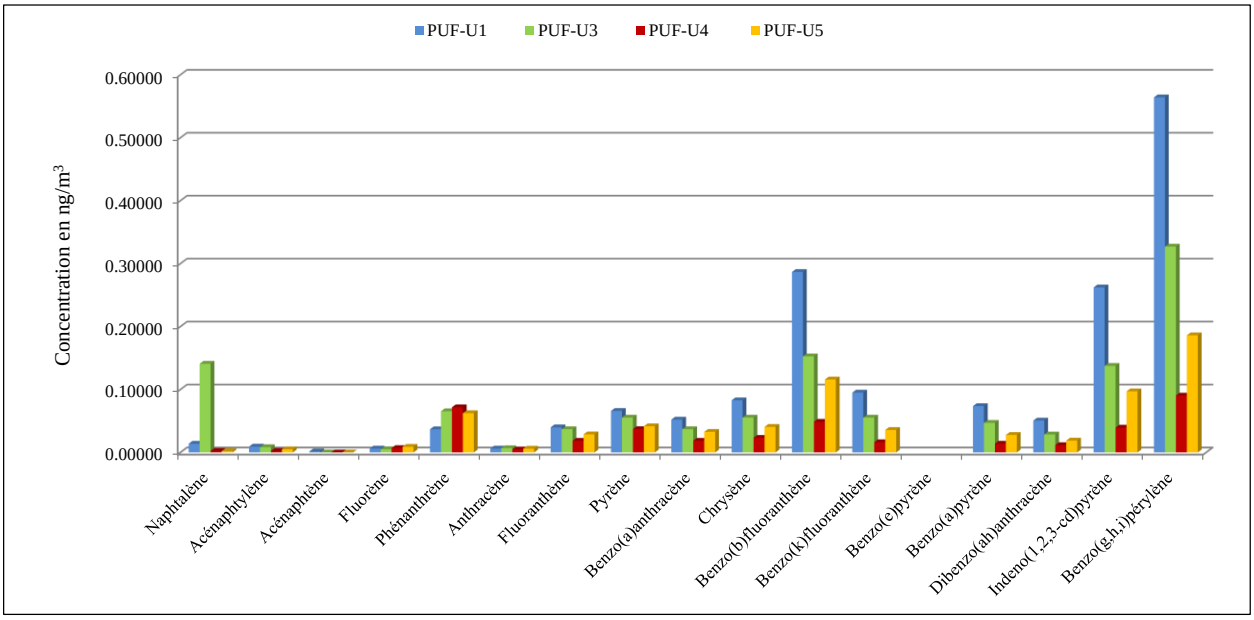


Figure III-12 : Profils des hydrocarbures aromatiques polycycliques pour les particules ultrafines collectées à Sin El-Fil.

3.3.2. Détermination de l'origine des HAP mesurés

Bien que les HAP soient émis lors de nombreux processus naturels tels que les éruptions volcaniques, les feux de forêt et les émanations de réservoirs naturels de pétrole, l'activité anthropique est considérée comme la source majoritaire d'introduction des HAP dans l'environnement. Les HAP d'origine anthropique sont principalement générés par combustion incomplète de la matière organique à haute température tels que la combustion de carburant diesel ou essence, l'incinération des déchets et la combustion de bois et de charbon.

Afin de déterminer les sources des HAP dans nos particules fines et ultrafines collectées à Sin El-Fil, les rapports des concentrations des HAP analysés ont été calculés. Selon les valeurs de ces rapports, les sources des HAP ont été déterminées en s'appuyant sur des études déjà publiées. La synthèse bibliographique des rapports des HAP utilisés comme indicateur de sources, adaptée de Ravindra et collaborateurs (Ravindra *et al.*, 2008), est présentée dans le Tableau III-7.

Tableau III-7 : Valeurs des rapports des HAP utilisés comme indicateur de source (adapté de Ravindra *et al.*, 2008).

Rapports des HAP	Valeurs	Sources
InPy / (InPy + benzo[g,h,i]perylène)	0,18	Voitures
	0,37	Diesel
	0,56	Charbon
	0,62	Combustion du bois
	0,35-0,70	Emissions diesel
Fluorène / (fluorène + pyrène)	> 0,5	Diesel
	< 0,5	Essence
B[a]P / (B[a]P + chrysene)	0,5	Diesel
	0,73	Essence
B[b]Fl / B[k]Fl	> 0,5	Diesel
B[a]P / B[g,h,i]Pe	0,5-06	Emission de trafic
	> 1,25	Lignite
Pyrène / B[a]P	~10	Moteur diesel
	~1	Moteur essence
Fluoranthène / pyrène	0,6	Véhicules

Pour les particules ultrafines urbaines (PUF-U), le rapport fluorène / (fluorène + pyrène) est < 0,5 (varie entre 0,08 et 0,29) et le rapport pyrène/B(a)P se situe plus autour de 1 que de 10 : 0,90 ; 2,50 ; 1,18, 2,67 et 1,50 pour les échantillons de PUF-U (1 à 5) respectivement (Tableau III-8). En s'appuyant sur les références du Tableau III-7, nos observations mettent en évidence l'influence des émissions de moteurs à essence pour tous les échantillons de PUF collectés à Sin El-Fil. Ce résultat n'est pas surprenant compte tenu que le parc de véhicules au Liban est très majoritairement composé de véhicules utilisant l'essence comme carburant. D'autre part, B[a]P / (B[a]P + chrysène) est proche de 0,5 dans les PUF-U, et le rapport B[b]Fl / B[k]Fl est supérieur à 0,5 pour les échantillons de PUF (Tableau III-8), indiquant ainsi une influence des émissions des moteurs diesel dans ces échantillons. De plus, d'une manière plus globalisante, l'influence des véhicules sur la composition des HAP associés aux PUF-U est mise en évidence par le rapport fluoranthène / pyrène qui est environ égale à 0,6 pour tous les échantillons de PUF-U (0,60 ; 0,60 ; 0,67 ; 0,50 et 0,69 pour PUF-U (1 à 5) respectivement).

Tableau III-8 : Rapports entre concentrations en HAP pour les échantillons de particules fines et de particules ultrafines collectées en milieu urbain

Rapports des HAP	Particules fines (PF-U)					Particules ultrafines (PUF-U)				
	U1	U2	U3	U4	U5	U1	U2	U3	U4	U5
InPy / (InPy + B[g,h,i]Pe)	0,42	0,42	0,29	0,36	0,19	0,32	0,33	0,30	0,30	0,34
Fluorène / (fluorène + pyrène)	0,16	0,25	0,29	0,25	0,15	0,08	0,29	0,08	0,16	0,18
B[a]P / (B[a]P + chrysene)	0,45	0,51	0,54	0,41	0,46	0,47	0,31	0,46	0,37	0,40
B[b]Fl / B[k]Fl	2,14	2,56	1,74	2,55	2,37	3,02	2,86	2,76	3,00	3,25
B[a]P / B[g,h,i]Pe	0,45	0,44	0,33	0,34	0,48	0,13	0,17	0,14	0,15	0,15
Pyrène / B[a]P	1,15	0,83	0,76	1,20	0,97	0,90	2,50	1,18	2,67	1,50
Fluoranthène / pyrène	1,14	0,97	0,86	1,40	1,15	0,60	0,60	0,67	0,50	0,69

Même si les concentrations de HAP sont moindres dans les PF par rapport aux PUF, une influence du trafic sur la composition des HAP des PF-U, est aussi mise en évidence par le calcul de rapports caractéristiques. Ainsi, le rapport fluorène / (fluorène + pyrène) qui est inférieur à 0,5

pour les échantillons de PF-U (0,16 ; 0,25 ; 0,29 0,25 et 0,15) est caractéristique des émissions de moteur essence. La contribution des émissions du diesel dans la composition des HAP des particules fines collectées à Sin El-Fil est soulignée d'une part, par le rapport B[b]Fl / B[k]Fl qui est supérieur à 0,5 pour tous les échantillons de PF-U (Tableau III-8) et d'autre part, par le rapport B[a]P / (B[a]P + chrysène) qui est environ égal à 0,5 (0,45 ; 0,51 ; 0,54 ; 0,41 et 0,46 pour PF-U (1 à 5) respectivement). De plus, le rapport B[a]P / B[g,h,i]Pe est environ égal à 0,5 pour les échantillons de PF-U (1, 2 et 5) indiquant des émissions dues au trafic (Tableau III-8).

Par conséquent, les HAP adsorbés à la surface des PUF et des PF collectées à Sin El-Fil proviennent à la fois de la combustion de l'essence et du diesel. Ces derniers sont utilisés au Liban comme carburants dans les voitures personnelles et dans les bus, camions et groupes électrogènes respectivement. En ce qui concerne l'origine des HAP dans les particules en suspension dans l'air, ceci confirme que la principale source de pollution atmosphérique dans l'agglomération de Beyrouth est le trafic routier en plus de l'utilisation des groupes électrogènes pour pallier les fréquentes coupures de courant.

4. Comparaison de la composition des particules à l'échelle du bassin méditerranéen

4.1. Particules fines

4.1.1. Sites de comparaison : localisation et caractéristiques

Les concentrations moyennes des éléments majeurs (EM), des ions inorganiques secondaires (IIS), du carbone total (C total), des éléments traces (ET) et des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) associées aux particules fines collectées à Sin El-Fil (site urbain) et à Bejje (site rural) sont comparées avec les valeurs obtenues dans d'autres études réalisées dans certains pays du bassin méditerranéen. Les sites de comparaison sont situés dans le côté est (Grèce, Turquie, Palestine, Palestine occupée, Jordanie et l'Egypte), le côté nord (Italie) et le côté ouest (Espagne) du bassin méditerranéen. Parmi les pays choisis, certains possèdent des conditions météorologiques très proches de celles rencontrées au Liban. La localisation et les caractéristiques des sites de comparaison ainsi que les concentrations atmosphériques des particules fines dans ces sites sont représentées dans les Tableaux III-9, III10 et III-11.

Dans le cas de notre étude, les particules fines correspondent à la fraction $PM_{2,5-0,3}$ alors qu'elles correspondent à la fraction $PM_{2,5}$ pour tous les autres sites à l'exception du site d'Athènes où les auteurs ont étudié la fraction PM_2 (Karanasiou *et al.*, 2009) et des sites de Jal El Dib et de l'université américaine de Beyrouth (AUB) où les auteurs ont étudié la fraction $PM_{2,5-0,25}$ (Daher *et al.*, 2013). De plus, pour les sites de comparaison, les particules fines ont été collectées sur des filtres, et leurs masses ont été déterminées par gravimétrie alors que dans notre étude, les particules fines ($PM_{2,5-0,3}$) ont été collectées sous forme d'une poudre dont la concentration a été déterminée par pesée avec possibilité d'une légère sous-estimation des concentrations. Néanmoins, afin d'être le plus homogène possible avec la majorité des autres sites de comparaison, nous allons présenter les $PM_{2,5}$ en additionnant les concentrations des $PM_{2,5-0,3}$ avec celles des $PM_{0,3}$.

Tableau III-9 : Caractéristiques des sites de comparaison choisis dans le bassin méditerranéen (cas des EM, IIS et C total)

Pays	Ville	$PM_{2,5}$ (µg/m^3)	Caractéristiques du site	Références
Liban	Sin El-Fil (Beyrouth)	41	Urbain (site de fond)	Notre étude
″	Bejje	23	Rural	″
″	Haret Hreik (Beyrouth)	28	Urbain (construction post-guère)	(Saliba *et al.*, 2010)
Egypte	Al Zamalek (Caire)	62	Résidentiel	(Abu-Allaban *et al.*, 2002)
″	El Qualaly (Caire)	84,6	Trafic	″
″	Helwan (Caire)	29,4	Résidentiel	″
″	Kaha (Caire)	49,7	Site de Fond	″
″	El Massara (Caire)	60,9	Industriel/résidentiel	″
″	Shobra (Caire)	216	″	″
Palestine	Jérusalem-Est	23,8	Résidentiel, trafic	(Sarnat *et al.*, 2010)
″	Hebron	21,1	Résidentiel, trafic et industrie légère	″
″	Nablus	27,6	Résidentiel et commercial (trafic et production d'énergie diesel)	″
Palestine occupée	Haïfa	19,8	Résidentiel, trafic et industries lourdes	(Sarnat *et al.*, 2010)
″	Tel Avive	30,7	Résidentiel, trafic	″
″	Jérusalem-Ouest	21,7	Espace vert, trafic	″
Jordanie	Amman	34,9	Résidentiel/commercial, trafic et construction	(Sarnat *et al.*, 2010)
Turquie	Erdemli	9,7	Rural	(Koçak *et al.*, 2007b)
″	Istanbul	40	Urbain, trafic	(Szigeti *et al.*, 2013)
Italie	Lecce	19	Urbain (site de fond)	(Perrone *et al.*, 2011)
″	Corso Firenze (Genoa)	13	Urbain (site de fond)	(Cuccia *et al.*, 2013)
Grèce	Pentelli	23,8	Suburbain	(Pateraki *et al.*, 2012b)
″	Votanikos (centre d'Athènes)	24,7	Industriel, trafic	″
″	Tourlos (Aegina)	19,2	Site de fond côtier	″
″	Patras	13,9	Semi-rural	(Glavas *et al.*, 2008)
″	Athènes	41	Urbain, résidentiel et trafic	(Karanasiou *et al.*, 2009)
Espagne	Iturrama (Pamplona)	15	Urbain	(Aldabe *et al.*, 2011)
″	Palza de la Cruz (Pamplona)	17	Trafic	″
″	Castillo de Bellver (île)	20	Suburbain	(Pey *et al.*, 2009b)
″	Escuelas Aguirre (Madrid)	34	Urbain, trafic	(Artinano *et al.*, 2003)

Tableau III-10 : Caractéristiques des sites de comparaison choisis dans le bassin méditerranéen (cas des éléments traces)

Pays	Ville	$PM_{2,5}$ (µg/m^3)	Caractéristiques du site	Références
Liban	Sin El-Fil (Beyrouth)	41	Urbain (site de fond)	Notre étude
″	Bejje	23	Rural	″
″	Borj Hammoud (Beyrouth)	41	Urbain (proche du port et de l'incinérateur des déchets, à l'intérieur de la ville)	(Saliba *et al.*, 2010)
Palestine occupée	Ashdod (automne-hivers)	21,2	Urbain, industriel	(Mamane *et al.*, 2008)
″	Ashdod (été)	23,9	″	″
″	Gedera automne-hivers	25	Rural	″
Jordanie	Al-Hachimiya	-	Urbain	(Al-Momani *et al.*, 2005)
Turquie	Erdemli	9,7	Rural	(Koçak *et al.*, 2007b)
″	Istanbul	40	Urbain, trafic	(Szigeti *et al.*, 2013)
Italie	Corso Firenze (Genoa)	13	Urbain (site de fond)	(Cuccia *et al.*, 2013)
Grèce	Athènes	41	Urbain, résidentiel et trafic	(Karanasiou *et al.*, 2009)
Espagne	Iturrama (Pamplona)	15	Urbain	(Aldabe *et al.*, 2011)
″	Palza de la Cruz (Pamplona)	17	Trafic	″
″	Castillo de Bellver	20	Suburbain	(Pey *et al.*, 2009b)
″	Escuelas Aguirre (Madrid)	34	Urbain, trafic	(Artinano *et al.*, 2003)

Tableau III-11 : Caractéristiques des sites de comparaison choisis dans le bassin méditerranéen (cas des HAP)

Pays	Ville	$PM_{2,5}$ (µg/m^3)	Caractéristiques du site	Références
Liban	Sin El-Fil (Beyrouth)	41	Urbain (site de fond)	Notre étude
″	Université AUB (Beyrouth)	22,6	Urbain (site de fond)	(Daher *et al.*, 2013)
″	Jal El Dib (Beyrouth)	50	Urbain, trafic (à côté de l'autoroute)	″
Turquie	Province de Zonguldak	-	Urbain, industriel	(Akyüz et Çabuk, 2008)
Italie	Florence 1 (froid)	18,2	Urbain (site de fond)	(Martellini *et al.*, 2012)
″	Florence 1 (chaud)	16,4	″	″
″	Florence 2 (froid)	29,6	Urbain, trafic	″
″	Florence 2 (chaud)	26,2	″	″
″	Torre Sarca (hivers)	-	Urbain, trafic	(Gualtieri *et al.*, 2009)
Grèce	Kozani	16	Urbain	(Evagelopoulos *et al.*, 2010)
″	AEDA (Athènes)	-	Urbain, résidentiel	(Anderou et Rapsomanikis, 2009)
Espagne	CIEMAT (Banlieue de Madrid)	-	Urbain (site de fond)	(Barrado *et al.*, 2012)
″	Escuelas Aguirre (Madrid)	-	Urbain, trafic	(Mirante *et al.*, 2013)
″	CIEMAT (Banlieue de Madrid)	-	Urbain (site de fond)	″

Les sites étudiés sont soit des sites ruraux, soit des sites urbains de fond, des sites urbains résidentiels, industriels ou encore des sites sous influence du trafic routier. Ils se caractérisent par des surfaces (entre 6 et 2000 Km^2) et des nombres d'habitants (entre 35000 et 14 $x10^6$) supérieurs à ceux de Bejje (5,25 km^2 ; 1562 habitants) à l'exception de Al-Hachimiya (Jordanie ; 6,25 km^2 ; 6500 habitants) ayant une surface proche de celle de Bejje mais environ 6 fois le nombre d'habitants. Quant au site de Sin El-Fil - Beyrouth (32 km^2 ; 600000 habitants), ses caractéristiques démographiques se situent dans la marge de celles des sites du bassin méditerranéen présentés dans les Tableaux III-9, III-10 et III-11.

D'autre part, certains sites sont côtiers (Erdemli, Lecce, Geneo, Aegina, Patras, etc.) comme c'est le cas de Bejje et de Sin El-Fil, et d'autres sont des sites intérieurs (Pentelli, Madris, Florence, Nablus, Kizani, etc.).

La concentration de $PM_{2,5}$ du site de Bejje (rural ; 23 µg/m^3) est comprise entre celles des autres sites ruraux étudiés dans le bassin méditerranéen : Erdemli (9,7 µg/m^3), patras (13,9 µg/m^3) et Gedara (25 µg/m^3) (Tableaux III-9 et III-10). Quant aux sites urbains, les $PM_{2,5}$ varient entre 13 et 50 µg/m^3 (41 µg/m^3 pour Sin El-Fil). Certains sites industriels ou résidentiels comme le Caire (8 millions d'habitant) montrent des concentrations en $PM_{2,5}$ encore plus élevées atteignant jusqu'à 216 µg/m^3 (Tableaux III-9, III-10 et III-11).

4.1.2. Comparaison des concentrations moyennes des composants des particules fines

Dans cette partie, nous avons groupé les espèces analysées afin de pouvoir les comparer plus facilement avec celles des différents sites du bassin méditerranéen. Concernant les éléments et ions majeurs, en plus du C total, les ions Na^+, Cl^- et Mg^{2+} sont regroupés sous le nom d'« Ions Majeurs marins » (IM marins), et les ions NO_3^-, SO_4^{2-} et NH_4^+ sous le nom d'« Ions Inorganiques Secondaires » (IIS). Al, Fe, Ca^{2+} et K^+ constituent le dernier groupe et contient les autres éléments majeurs.

Concernant les éléments traces, trois groupes vont être identifiés selon leurs caractéristiques dans le tableau périodique :

- Métaux alcalins et alcalino-terreux : Rb, Sr et Ba.
- Métaux de transition: Ag, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Nb, Ni, Sc, Ti, V et Zn.

- Autres métaux, métalloïdes et non-métaux : Sn, Sb, Tl, Pb, Bi, P et As.

Enfin, les HAP vont être regroupés selon le nombre de noyaux aromatiques qui les composent en 3 groupes allant des HAP les plus légers au plus lourds :

- HAP à 2 ou 3 cycles : Naphtalène, Acénaphtylène, Acénaphtène, Fluorène, Phénanthrène et Anthracène.
- HAP à 4 cycles : Fluoranthène, Pyrène, B[a]An et Chrysène.
- HAP à 4 ou 5 cycles : B[b]Fl, B[k]Fl, B[e]P, B[a]P, DiB[a,h]An, InPy et B[g,h,i]Pe.

Le Tableau III-12 regroupe ainsi les moyennes arithmétiques des concentrations en C total, IM marin, IIS et autres Eléments Majeurs (EM), tandis que les Tableaux III-13 et III-14 représentent respectivement celles des Eléments Traces (ET) et des HAP obtenues dans notre étude en comparaison avec celles trouvées au niveau d'autres sites.

4.1.2.a. Ions majeurs marins

- **Sodium :** étant situé plus proche de la côte méditerranéenne, le site de fond urbain à Sin El-Fil possède une concentration moyenne en Na^+ (1131 ng/m^3) supérieure à celle obtenue à Bejje (764 ng/m^3) le site rural et légèrement supérieure à celle d'un autre site à Beyrouth (Haret Hreik ; 1060 ng/m^3) (Saliba *et al.*, 2010).
  Erdemli (Turquie) (Koçak *et al.*, 2007b) possède une teneur plus élevée en Na^+ (3095 ng/m^3) que celles trouvées dans notre étude en raison de sa localisation très proche de la mer. D'autre part, Lecce (Italie) (Perrone *et al.*, 2011), à 12 km environ de la mer, présente une concentration (400 ng/m^3) inférieure à celles trouvée à Sin El-Fil et à Bejje.
  Finalement, 2 sites en Egypte possèdent des concentrations moyennes en Na^+ supérieures ou proches à celles de Sin El-Fil et 4 autres sites présentent des teneurs inférieures. Le facteur distance par rapport à la mer joue un grand rôle ici. On ne peut exclure également qu'une analyse des origines de masses d'air et des connaissances sur les conditions météorologiques rencontrées lors de ces campagnes d'échantillonnage, auraient pu permettre une interprétation plus fine de ces observations.

Tableau III-12 : Comparaison de la moyenne arithmétique des concentrations des EM, ions secondaires et marins et C total (ng/m^3).

		Autres éléments majeurs				IM marins			Ions inorganiques secondaires			
Pays	**Ville**	**Al**	**Fe**	**Ca^{2+}**	**K^+**	**Mg^{2+}**	**Na^+**	**Cl^-**	**NO_3^-**	**SO_4^{2-}**	**NH_4^+**	**C total**
Liban	Sin El-Fil	535	608	2134	129	159	1131	779	3310	9072	883	6309
″	Bejje	535	448	1426	147	135	764	254	3398	6115	54	2361
Liban	Haret Hreik	-	-	2900	250	210	1060	840	1270	8530	1740	-
Egypte	Al Zamalek	100	200	-	400	-	300	13000	2700	6000	8700	19000
″	El Qualaly	100	500	-	500	-	400	9200	3000	6700	6800	36200
″	Helwan	0	100	-	300	-	300	1400	1700	4000	1700	13200
″	Kaha	100	100	-	700	-	200	10300	3200	4800	7900	16100
″	El Massara	200	500	-	800	-	1100	5500	2800	5900	1400	17000
″	Shobra	900	4200	-	1200	-	1700	22500	4500	9100	7600	45100
Palestine	Jérusalem-Est	-	-	-	-	-	-	-	920	4400	-	7400
″	Hebron	-	-	-	-	-	-	-	910	3800	-	7100
″	Nablus	-	-	-	-	-	-	-	1010	4300	-	13800
Palestine occupée	Haifa	-	-	-	-	-	-	-	1360	5200	-	4000
″	Tel Aviv	-	-	-	-	-	-	-	700	5200	-	6200
″	Jérusalem-Ouest	-	-	-	-	-	-	-	1020	4600	-	5200
Jordanie	Amman	-	-	-	-	-	-	-	1020	4500	-	8600
Turquie	ErdemLi	-	53,3	1398	95	435	3095	5384	1589	1541	-	-
″	Istanbul	-	460	-	-	-	-	340	1720	4270	1240	-
Italie	Lecce	-	-	600	400	100	400	100	200	5590	2100	7100
″	Corso Firenze	51	145	-	-	-	-	-	660	3450	1215	3950
Grèce	Pentelli	-	-	2030	520	190	-	1530	1110	4620	1250	4580
″	Votanikos	-	-	850	350	70	-	800	1330	5190	1300	6260
″	Tourlos (Aegina)	-	-	750	480	80	-	700	760	5180	1210	2830
″	Patras	-	-	330	-	-	-	120	400	3200	1600	-
″	Athènes	101	212	-	-	-	-	80	176	1380	-	-
Espagne	Iturrama	-	80	-	-	-	-	80	1630	2070	1240	4040
″	Plaza de la Cruz	-	90	-	-	-	-	110	2060	2070	1220	5110
″	Castillo de Bellver	-	-	-	-	-	-	400	900	3900	2000	3600
″	Escuelas Aguirre	-	570	-	-	-	-	-	1330	3800	1410	-

- **Chlorure :** concernant le Cl^-, la concentration moyenne trouvée à Sin El-Fil (779 ng/m^3) est supérieure que celle trouvée à Bejje (254 ng/m^3) et proche de celle obtenue dans un autre site à Beyrouth (Haret Hreik ; 840 ng/m^3). Les teneurs en Cl^- dans notre étude est comprise entre celles obtenues dans les différents sites côtiers du bassin méditerranéen (Tableau III-12).

  Les faibles teneurs en Cl^- obtenues à Lecce (Italie ; 100 ng/m^3) et au Liban peuvent être expliquées par la perte de Cl^- rencontrée suite à la réaction des sels marins avec les émissions anthropiques de HNO_3 et/ou du H_2SO_4. En effet, comme cela a été indiqué précédemment, les aérosols marins fraichement émis sont caractérisés par un rapport $[Cl^-]$ / $[Na^+]$ = 1,789 qui est caractéristique de l'eau de mer. En présence des acides nitriques ou sulfuriques, une réaction entre le NaCl et ces acides se déroulent aboutissant ainsi à la formation du HCl et par la suite à la perte du Cl^- dans les particules atmosphériques et à la formation des aérosols marins âgés. Dans le cas de l'Egypte, le rapport $[Cl^-]$ / $[Na^+]$ est supérieur à 1,789 ceci peut être expliqué par la présence d'une source supplémentaire de Chlore autre que la source naturelle marine ayant pour conséquence des concentrations élevées de Cl^- dans des sites non côtiers.

- **Magnésium :** la concentration moyenne du Mg^{2+} au niveau du site de Sin El-Fil (159 ng/m^3) est supérieure à celle obtenue à Bejje (135 ng/m^3) et sont toutes les deux inférieures aux concentrations trouvées en Erdemli (Turquie ; 435 ng/m^3) et à Pentelli (Grèce ; 190 ng/m^3). Cet élément est par ailleurs bien connu pour avoir également une origine marine, ce qui explique un comportement similaire à celui de Na^+ et Cl^-.

  D'autre part, les concentrations moyennes trouvées à Lecce (Italie ; 100 ng/m^3), Tourlos (Grèce ; 80 ng/m^3) et Votanikos (Grèce ; 70 ng/m^3) sont inférieures à celles de Sin El-Fil et de Bejje.

4.1.2.b. Ions inorganiques secondaires

- **Nitrates :** dans notre étude, les concentrations moyennes en nitrates dans les $PM_{2,5}$ collectées à Bejje (3398 ng/m^3) et à Sin El-Fil (3310 ng/m^3) sont proches. De plus les concentrations en nitrates trouvées dans nos échantillons sont supérieures à celles trouvées dans les autres sites de comparaison à l'exception de trois sites en Caire-Egypte

(Shobra, Kaha et El-Qualaly), ayant des concentrations moyennes en nitrates supérieures ou proches à celles obtenues dans notre étude (4500, 3200 et 3000 ng/m^3). Notons aussi que des sites en Madrid-Espagne (Escuelas Aguirre ; 1330 ng/m^3) et en Turquie (Istanbul ; 1720 ng/m^3) qui sont des sites urbains influencés par le trafic routier et densément peuplés (3,2 x10^6 et 13,8 x10^6 habitants respectivement), possèdent des concentrations en nitrates inférieures à celles obtenues à Sin El-Fil ou à Bejje (Tableau III-12).

- **Sulfates :** la concentration moyenne en sulfates à Sin El-Fil (9072 ng/m^3), possédant plus de sources d'émission des SO_x (précurseurs du sulfates), est 1,5 fois celle trouvée à Bejje (6115 ng/m^3) et est légèrement supérieure à celle obtenue dans un autre site à Beyrouth (Haret Hreik ; 8530 ng/m^3). Ces concentrations obtenues dans notre étude sont supérieures à celles observées dans les autres sites de comparaison du bassin méditerranéen, qu'il s'agisse de sites industriels ou de sites urbains influencés par le trafic routier et fortement peuplés (Istanbul, Escuelas Aguirre, etc.), à l'exception de deux sites en Egypte (Shobra et El Qualaly) ayant respectivement des concentrations en sulfates légèrement supérieures à celles de Sin El-Fil et de de Bejje (Tableau III-12).

- **Ammonium :** les sites de comparaison localisés dans le bassin méditerranéen possèdent des concentrations en NH_4^+ plus élevées que celles trouvées pour les 2 sites d'étude montrant ainsi qu'il y a moins de sources de NH_3 (précurseur de NH_4^+) dans nos sites. Les concentrations les plus élevées en ammonium sont visualisées au Caire (Egypte), dans des sites urbains industrialisés, résidentiels ou influencés par le trafic routier. Notons que le site urbain de fond à Sin El-Fil est plus riche en ammonium que le site rural à Bejje (Tableau III-12). Ces différences de concentration en ammonium d'un site à l'autre dans le bassin méditerranéen mériteraient d'être comparées en tenant compte des conditions météorologiques et en particulier la température. Cependant, ces données pas toujours disponibles dans les études considérées pour cette comparaison. Ce type d'analyse pourrait permettre de révéler si en plus de la proximité de sources d'émission des précurseurs d'ammonium, des différences de concentration pouvaient s'expliquer par

l'instabilité de l'ammonium dans l'état particulaire quand les températures sont relativement élevées (T>25°C).

4.1.2.c. Carbone total

La concentration moyenne en carbone total obtenue à Sin El-Fil (site urbain de fond ; 6309 ng/m^3) est similaire à celle trouvée au niveau d'un site résidentiel en Palestine occupée par les israéliens (Tel Aviv ; 6200 ng/m^3) et d'un site industriel en Athènes-Grèce (Votanikos ; 6260 ng/m^3) qui sont tous deux influencés par le trafic routier. En revanche, cette concentration moyenne est supérieure à celles trouvées dans des sites urbains de fond ou suburbain en Italie, Grèce et Espagne (Tableau III-12). Tous les autres sites étudiés (industriels, urbains et résidentiels comportant un nombre d'habitants beaucoup plus élevé que celui de Beyrouth) possèdent des teneurs en carbone total plus élevées que celles obtenues dans notre étude ; en Egypte (le Caire, une ville densément peuplée) la concentration en C total atteint 45000 ng/m^3. Concernant le site rural à Bejje, ce dernier présente une concentration moyenne en carbone total (2361 ng/m^3) environ 3 fois moindre que celle obtenue à Sin El-Fil, qui soumis en proximité à l'influence de nombreuses de combustion (transport, groupes électrogènes, incinérateurs, etc.).

4.1.2.d. Autres éléments majeurs

- **Aluminium :** les concentrations moyennes en Al de nos échantillons sont similaires pour les 2 sites d'échantillonnages et sont supérieures à celles obtenues dans tous les sites de comparaison à l'exception d'un seul site, Shobra (le Caire-Egypte). Ce dernier site possède la concentration la plus élevée en Al parmi tous les sites de comparaison.

- **Fer :** pour tous les sites de comparaison, les concentrations de Fe sont inférieures à celles obtenues à Sin El-Fil à l'exception d'un site en Egypte (Shobra-Caire). Ce dernier, possède la plus grande teneur en Fe (4200 ng/m^3) parmi les sites de comparaison dans le bassin méditerranéen. Notons que la teneur en Fe à Sin El-Fil est supérieure à celle de Bejje.

- **Calcium :** à l'exception d'un site en Grèce (Pentelli) ayant une concentration moyenne en Ca^{2+} proche de celle obtenue à Sin El-Fil (2134 ng/m^3) et d'un site rural en Turquie (Erdemli) ayant une concentration similaire à celle obtenue à Bejje (1426 ng/m^3), tous les autres sites ont des concentrations inférieures à celles obtenues dans notre étude. La concentration élevée en Ca^{2+} à Sin El-Fil peut être expliquée en partie par la tempête de sable qui s'est déroulée durant la première période de l'échantillonnage. De plus, une concentration élevée de Ca^{2+} (2900 ng/m^3) est observée à Haret Hreik (Liban) probablement en raison des activités de construction après la guerre en 2006. De manière générale, il faut rappeler aussi que le sol au Liban est considéré comme très riche en calcium et que la présence d'une fraction crustale dans les particules se répercute logiquement au niveau de la concentration en calcium.

- **Potassium :** les concentrations moyennes en K^+ durant les 2 campagnes d'échantillonnage réalisées dans cette étude sont proches, et sont inférieures à celles observées au niveau des tous les sites de comparaison à l'exception d'un site rural en Turquie (Erdemli). Le site de Shobra (Caire-Egypte) possède la plus grande concentration en K^+ (1 200 ng/m^3) parmi tous les autres sites étudiés.

  En effet, Shobra est située dans une zone fortement industrialisée et elle est sous le vent de nombreuses sources industrielles. C'est l'une des zones les plus polluées de la ville du Caire ($PM_{2,5}$ = 216 µg/m^3) ce qui explique les concentrations élevées observées pour les IIS, Ctotal, IM marins et les autres éléments majeurs (Tableau III-12).

4.1.2.e. Eléments traces

Le Tableau III-13, regroupe les concentrations moyennes en éléments traces présents dans les $PM_{2,5}$ collectées dans notre étude ainsi que celles des sites de comparaison du bassin méditerranéen.

- **Métaux alcalins et alcalino-terreux**

La concentration moyenne du Ba à Sin El-Fil (36,41 ng/m^3) est 6 fois supérieure à celle trouvée à Bejje (6,50 ng/m^3) et supérieure à celles des autres sites de comparaison. D'autre part, un site en Espagne (Plaza de la Cruz ; 6,09 ng/m^3) possède une concentration proche de celle de Bejje. En

général, le Ba peut être trouvé dans les poussières crustales (Wedepohl, 1995) donc sa teneur élevée dans le site urbain peut être expliquée par la remise en suspension des poussières par le mouvement des véhicules sur les routes.

Concernant le Rb, des concentrations moyennes similaires sont observées dans les 2 sites d'échantillonnage de notre étude (0,51 et 0,48 ng/m^3 pour Sin El-Fil et Bejje respectivement) et sont légèrement supérieures à celles de tous les autres sites de comparaison à l'exception d'un site urbain influencé par le trafic en Turquie (Istanbul ; 0,91 ng/m^3) et d'un autre site urbain de fond en Italie (Corso Firenze - Genoa ; 3 ng/m^3).

Finalement, le site urbain de fond à Sin El-Fil présente une concentration moyenne en Sr (6,01 ng/m^3) supérieure à la teneur obtenue à Bejje (5,09 ng/m^3) mais ces deux concentrations sont supérieures à celles observées pour les sites de comparaison (Tableau III-13).

Tableau III-13 : Comparaison de la moyenne arithmétique des concentrations des éléments traces avec celles rencontrées dans d'autres sites du bassin méditerranéen (ng/m^3)

Pays	Ville	Ag	As	Ba	Bi	Cd	Co	Cr	Cu	Mn	Nb	Ni	P
Liban	Sin El-Fil	0,04	0,24	36,41	0,29	0,20	0,35	2,31	48,05	9,72	0,30	5,94	40,27
″	Bejje	0,03	0,13	6,50	0,17	0,14	0,25	1,42	5,70	7,98	0,18	4,00	43,39
″	Borj Hammoud	-	-	-	-	-	-	-	10	10	-	5	-
Palestine occupée	Ashdod (automne-hivers)	-	-	-	-	-	3,2	0,8	6	17	-	9	29,3
″	Ashdod (été)	-	0,69	-	-	0,80	0,34	2,14	3,24	4,29	-	9,97	10,8
″	Gedera automne-hivers	-	-	-	-	-	1	1,7	2,6	8,3	-	3,1	18
Jordanie	Al-Hashimiya	3,20	0,68	-	-	4,54	4,91	2,03	26,18	3	-	6,96	-
Turquie	ErdemLi	-	-	-	-	-	-	1,80	-	1,80	-	1,6	-
″	Istanbul	-	-	-	0,17	0,56	0,20	2,80	14	12	-	4	-
Italie	Corso Firenze	-	-	22	-	-	-	2	5	4	-	6	6
Grèce	Athènes	-	-	-	-	0,56	-	15,7	24,2	11,9	-	7,7	-
Espagne	Iturrama	-	0,16	12,08	-	0,05	0,99	2,39	11,98	2,57	-	1,31	24,39
″	Plaza de la Cruz	-	0,11	6,09	-	0,13	0,42	1,55	12,61	2,29	-	0,89	11,37
″	Castillo de Bellver	-	0,31	2,5	0,06	0,17	0,38	4,5	38	1,6	0,05	2,8	11
″	Escuelas Aguirre	-	-	29	-	-	-	2	41	8	-	2	34

Tableau III-13 (suite) : Comparaison de la moyenne arithmétique des concentrations des éléments traces avec celles rencontrées dans d'autres sites du bassin méditerranéen (ng/m^3)

Pays	Ville	Pb	Rb	Sb	Sc	Sn	Sr	Ti	Tl	V	Zn
Liban	Sin El-Fil	7,24	0,51	1,41	0,10	1,95	6,01	89,91	0,15	10,82	37,56
″	Bejje	4,19	0,48	0,92	0,06	1,09	5,09	54,79	0,01	8,88	15,33
″	Borj Hammoud	110	-	-	-	-	-	20	-	-	100
Palestine occupée	Ashdod (automne-hivers)	31	-	-	-	-	-	20	-	25	121
″	Ashdod (été)	10,4	0,32	-	-	-	-	6,85	-	26,1	26,5
″	Gedera automne-hivers	18,5	-	-	-	-	-	34	-	5,5	38
Jordanie	Al-Hashimiya	24,28	-	9,95	-	-	-	21	-	1,55	323,5
Turquie	ErdemLi	-	-	-	-	-	-	4,10	-	4,50	4,90
″	Istanbul	13	0,91	3	-	3,4	-	-	0,059	10	72
Italie	Corso Firenze	6	3	-	-	-	2	7	-	10	15
Grèce	Athènes	19,8	-	-	-	-	-	-	-	7	-
Espagne	Iturrama	2,29	0,25	0,70	-	0,94	1,16	6,31	-	-	17,98
″	Plaza de la Cruz	3,36	0,36	1,34	-	1,42	1,03	4,11	-	-	18,47
″	Castillo de Bellver	6,2	0,3	1	-	1,7	0,9	7	0,1	5,5	34
″	Escuelas Aguirre	99	-	-	-	-	3	21	-	3	59

- **Métaux de transition**

La majorité des éléments de ce groupe est largement étudiée dans des études similaires réalisées dans le bassin méditerranéen.

Pour Ag, Nb et Sc, les concentrations moyennes à Sin El-Fil sont supérieures à celles observées à Bejje. Parmi les études choisies pour faire la comparaison, une seule étude a considéré l'Ag (Al-hachimiya-Jordanie) avec une concentration (3,20 ng/m^3) supérieure à celle observée à Sin El-Fil (0,04 ng/m^3), et dont la principale source dans l'atmosphère urbaine est la combustion des huiles (Pacyna, 1984) ce qui explique sa teneur plus élevée à Al-Hachimiya (un site influencé par des zones urbanisée et industrielle et par des stations de raffinage de pétrole et de centrale thermique). Parmi les études choisies pour faire la comparaison, une seule étude en Espagne (Castillo de Bellver) a présenté des concentrations de Nb. Les auteurs de cette étude ont trouvé une teneur en Nb (0,05 ng/m^3) inférieure à celles obtenues au Liban (0,30 et 0,18 ng/m^3 pour les sites de Sin El-Fil et de Bejje respectivement).

Concernant le Ti, V, Ni et Cd, les concentrations moyennes observées à Bejje sont inférieures à celles obtenues à Sin El-Fil (Tableau III-13). Le Ti se trouve à des teneurs plus élevées dans notre étude en comparaison avec les autres sites. Le Ti est présent surtout dans les poussières crustales ce qui explique ces teneurs élevées dans les sites ruraux d'une part et dans le site urbain de Sin El-Fil d'autre part (due à la tempête de sable qui s'est déroulée lors de la première période de prélèvement et qui a influencé sur toute la campagne par le phénomène de remise en suspension). Quant au V, Cd et Ni, leurs teneurs moyennes déterminées dans nos échantillons se situent dans la moyenne de celles obtenues dans les autres sites du bassin méditerranéen. Les principales sources de Ni et V sont la combustion des carburants fossiles et des huiles (Al-Momani *et al.*, 2005 ; Pacyna, 1984). D'autre part, le caoutchouc des roues est riche entre autres, en Ni et Cd (Thorpe et Harrison, 2008). Par conséquent, ces éléments sont émis suite à l'usure de pneus des véhicules, expliquant leurs teneurs plus élevées dans les sites majoritairement urbains et plus denses que ceux de notre étude.

Les concentrations moyennes de Cu (48,05 ng/m^3) et Zn (37,56 ng/m^3) à Sin El-Fil sont supérieures à celles observées à Bejje (5,70 et 15,33 ng/m^3 respectivement). La teneur en Cu du site urbain de fond de Sin El-fil est du même ordre de grandeur (Escuelas Aguirre) ou supérieure à celles des autres sites de comparaison. Quant au site rural de Bejje, sa teneur en Cu est proche à

celle d'un site en Italie (Corso Firenze ; 5 ng/m^3) et d'un autre en Palestine occupée (Ashdod automne-hiver ; 6 ng/m^3). Concernant le Zn, une teneur plus élevée a été observée au niveau du site rural de Bejje (15,33 ng/m^3) en comparant avec le site rural d'Erdemli (4,9 ng/m^3), tandis que la teneur en Zn de Sin El-fil est du même ordre de grandeur ou supérieure à celles des autres sites de comparaison à l'exception de Ashdod, Al-Hashimiya, Istanbul et Borj-Hammoud (Tableau III-13), qui sont des villes urbaines et/ou industrielles très denses et dont la principale source de Zn est le trafic routier. Par conséquent, Sin El-Fil, site urbain de fond, possède des teneurs en Cu et Zn parfois supérieures à celles des villes urbaines plus dense et cela en raison du trafic routier de la ville qui est la principale source de Zn et Cu notamment par l'usure des pneus et des freins.

Pour le Co, Cr et Mn, les concentrations moyennes à Sin El-Fil sont aussi supérieures à celles de Bejje mais la différence n'est pas aussi importante que dans le cas du Cu et Zn. Les teneurs de ces éléments dans les $PM_{2,5}$ collectées à Sin El-fil sont comprises entre les teneurs obtenues au niveau des sites du bassin méditerranéen présentés dans le Tableau III-13.

- **Autres métaux, métalloïdes et non-métaux**

Pour ce groupe, tous les éléments traces (As, Bi, P, Pb, Sb, Sn et Tl) ont des concentrations moyennes plus élevées à Sin El-Fil qu'à Bejje.

Les concentrations moyennes de Sb et Sn dans les $PM_{2,5}$ collectées à Sin El-Fil sont supérieures à celles observées à Bejje et dans les autres sites du bassin méditerranéen à l'exception de Al-Hashimiya et d'Istanbul (des sites urbains en Jordanie et Turquie respectivement) ayant des concentrations de Sb (9,95 et 3 ng/m^3 respectivement) et de Sn (3,4 ng/m^3 pour Istanbul) supérieures à celle de Sin El-Fil (1,41 et 1,95 ng/m^3 respectivement). Quant au Tl, les concentrations dans les sites de comparaison sont inférieures à celle de Sin El-Fil et supérieures à celle de Bejje (Tableau III-13).

D'autre part, les teneurs moyennes de Pb et As déterminées pour nos échantillons sont comprises entre celles obtenues dans les autres sites du bassin méditerranéen, tandis que celles de P sont supérieures. Borj Hammoud, un site fortement urbanisé de Beyrouth, possède une teneur très élevée en Pb (110 ng/m^3) par rapport aux autres sites ; Les auteurs ont associé ceci au vent enrichi en Pb et provenant de l'Egypte (Saliba *et al.*, 2010).

Finalement, seulement deux études (Espagne et Turquie), parmi celles retenues à titre de comparaison, ont présenté des valeurs pour le Bi. Sin El-Fil présente la concentration moyenne la plus élevée (0,29 µg/m^3) alors que la concentration observée à Bejje (0,17 ng/m^3) est identique à celle de la Turquie (Istanbul).

4.1.2.f. Hydrocarbures aromatiques polycycliques

Une comparaison des concentrations moyennes des HAP déterminées pour nos échantillons avec celles des sites du bassin méditerranéen est présentée dans le Tableau III-14. Rappelons que les HAP des échantillons individuels ont été seulement quantifiés pour le site de Sin El-Fil.

- **HAP à 2 ou 3 cycles**

Ce groupe représente les HAP les plus légers parmi les HAP analysés : Naphtalène, Acénaphtylène, Acénaphtène, Fluorène, Phénanthrène et Anthracène. Parmi les sites de comparaison choisis, seule l'Espagne présente des valeurs pour le Nap et l'Acy. La concentration moyenne du Nap à Sin El-Fil (0,0495 ng/m^3) est de même ordre de grandeur que celle observée à Escuelas Aguirre (0,048 ng/m^3) et supérieure aux autres sites, tandis que la concentration moyenne de l'Acy dans notre étude varie entre celles obtenues dans les sites Espagnols (Tableau III-14).

Les concentrations moyennes de Flu, Phe et Anth à Sin El-Fil (site urbain de fond) sont inférieures à celles observées dans tous les sites de comparaison (urbain, industriels et plus peuplés que Sin El-Fil) à l'exception d'un site de fond en Espagne (CIEMAT, banlieue de Madrid) ayant des concentrations en Flu (Mirante *et al.*, 2013) et Anth (Barrado *et al.*, 2012) de même ordre de grandeur que celles de Sin El-Fil, et d'un site urbain en Grèce (Kozani) ayant une concentration en Phe inférieure à celle de Sin El-Fil. Quant à l'Ace, sa concentration moyenne dans notre étude varie entre celles obtenues dans les autres sites (Tableau III-14).

- **HAP à 4 cycles**

Les concentrations moyennes des Fla, Pyr, B[a]An et Chr que nous avons trouvées dans les $PM_{2,5}$ collectées à Sin El-Fil sont inférieures à celles observées au niveau de tous les sites de

comparaison à l'exception du site CIEMAT (site de fond urbain en Espagne) ayant des concentrations proches de celle de Sin El-Fil. Les concentrations les plus élevées de tous les HAP de ce groupe sont observées dans un site urbain en Turquie (Zonguldak) durant l'hiver.

- **HAP à 5 ou 6 cycles**

Pour ce groupe, les concentrations moyennes des HAP obtenues à Sin El-Fil varient entre celles observées au niveau de l'ensemble des sites de comparaison à l'exception du B[e]P ayant une concentration à Sin El-Fil inférieure à celles des autres sites.

Les concentrations les plus élevées de tous les HAP sont observées dans un site urbain en Turquie (Zonguldak) durant l'hiver. Ce site est caractérisé par la présence de mines de charbon qui est utilisé en hiver pour le chauffage central et domestique ce qui explique les teneurs élevées des HAP dans ce site.

Parmi les HAP analysés, aucun HAP n'a été détecté dans les particules fines du site urbain de fond à l'Université AUB, Beyrouth (Daher *et al.*, 2013).

Tableau III-14 : Comparaison de la moyenne arithmétique des concentrations des HAP avec celles rencontrées dans d'autres sites du bassin méditerranéen (ng/m^3)

Pays	Ville	Nap	Acy	Ace	Flu	Phe	Anth	Fla	Pyr	B[a]An
Liban	Sin El-Fil	0,0495	0,0107	0,0056	0,0095	0,0727	0,0094	0,0446	0,0618	0,0413
″	Jal El Dib (Beyrouth)	-	-	-	-	-	-	-	0,4	0,4
Turquie	Zonguldak (hivers)	-	-	0,7	-	7,6	2,7	21,2	21,6	14,8
″	Zonguldak (été)	-	-	0,1	-	0,3	0,3	0,3	0,4	0,5
Italie	Florence 1(froid)	-	-	-	0,05	0,15	0,19	0,24	0,26	0,34
″	Florence 1(chaud)	-	-	-	0,014	0,11	0,013	0,14	0,11	0,069
″	Florence 2 (froid)	-	-	-	0,04	0,48	0,63	0,58	0,88	1,2
″	Florence 2 (chaud)	-	-	-	0,03	0,38	0,09	0,69	0,81	0,83
″	Torre Sarca (hivers)	-	-	-	-	-	-	-	-	2,47
Grèce	Kozani	-	-	-	0,07	0,035	0,06	0,53	0,45	0,41
″	AEDA (Athènes)	-	-	-	0,03	1	0,18	2,75	2,28	0,46
Espagne	CIEMAT (Madrid) (été)	0,0094	-	0,0026	0,019	0,1044	0,0068	0,1792	0,1977	0,0246
″	″ (hivers)	0,0201	-	0,0032	0,0267	0,1674	0,0087	0,2264	0,3244	0,0568
″	Escuelas Aguirre (Madrid)	0,048	0,005	0,002	0,03	0,081	0,015	0,133	0,171	0,045
″	CIEMAT (Banlieue de Madrid)	0,03	0,027	0,01	0,007	0,246	0,025	0,036	0,033	0,037

Nap : Naphtalène ; Acy : Acénaphtylène ; Ace : Acénaphtène ; Flu : Fluorène ; Phe : Phénanthrène ; Anth : Anthracène ; Fla : Fluoranthène ; Pyr : Pyrène ; B[a]An : Benzo[a]anthracène ; ND = Non Disponible ou valeur < à la limite de détection (LDD).

Tableau III-14 (suite) : Comparaison de la moyenne arithmétique des concentrations des HAP avec celles rencontrées dans d'autres sites du bassin méditerranéen (ng/m^3)

Pays	Ville	Chr	B[b]Fl	B[k]Fl	B[e]P	B[a[P	DiB[a,h]An	InPy	B[g,h,i]Pe
Liban	Sin El-Fil	0,0636	0,1773	0,0625	0,0301	0,0518	0,0333	0,1483	0,3189
″	Jal El Dib (Beyrouth)	0,7	1,41	0,69	1,5	0,69	-	1,2	2,77
Turquie	Zonguldak (hivers)	18,7	16	9,2	-	15,7	1,1	13,6	9,8
″	Zonguldak (été)	0,6	0,4	0,2	-	0,4	0,1	1,1	1
Italie	Florence 1 (froid)	0,40	0,54	0,50	1,2	0,47	0,41	0,50	0,13
″	Florence 1 (chaud)	0,13	0,14	0,085	0,51	0,049	0,065	0,062	0,003
″	Florence 2 (froid)	1,2	1,3	1,1	0,56	1	0,79	0,92	0,46
″	Florence 2 (chaud)	0,84	0,40	0,33	1,3	0,21	0,23	0,14	0,01
″	Torre Sarca	3,71	3,53	1,58	4,64	2,30	-	2,68	3,32
Grèce	Kozani	0,25	0,57	0,46	0,44	0,38	0,09	0,29	0,53
″	AEDA (Athènes)	0,97	8,98	1,72	-	1,54	0,95	1,83	6,05
Espagne	CIEMAT (Madrid) (été)	0,0689	0,039	-	-	-	-	-	-
″	″ (hivers)	0,1262	0,0953	-	-	-	-	-	-
″	Escuelas Aguirre (Madrid)	0,122	0,076	0,042	-	0,039	0,017	0,077	0,09
″	CIEMAT (Banlieue de Madrid)	0,076	0,076	0,039	-	0,053	0,025	0,082	0,071

Chr : Chrysène ; B[b]Fl : Benzo[b]fluoranthène ; B[k]Fl : Benzo[k]fluoranthène ; B[e]P : Benzo[e]pyrène ; B[a]P : Benzo[a]pyrène ; DiB[a,h]An : Dibenzo[a,h]anthracène ; InPy : Indéno[1,2,3-cd]pyrène ; B[g,h,i]Pe : Benzo[g,h,i]perylène ; ND = Non Disponible ou valeur < à la LDD.

4.2. Particules ultrafines

4.2.1. Sites de comparaison : localisation et caractéristiques

Comme dans le cas des particules fines, les concentrations moyennes des éléments majeurs (EM), des ions inorganiques secondaires (IIS), du C total et des HAP que nous avons obtenues dans les particules ultrafines collectées à Sin El-Fil et à Bejje sont comparées avec celles obtenues dans d'autres études réalisées dans le bassin méditerranéen. Concernant les éléments traces (ET), aucune étude dans le bassin méditerranéen n'a donné les valeurs des concentrations de ces éléments présents dans les particules ultrafines.

Les sites de comparaison sont situés en Grèce, en Espagne et au Liban. La localisation et les caractéristiques de ces sites ainsi que les concentrations atmosphériques des particules ultrafines dans ces sites sont présentées dans les Tableaux III-15 et III-16.

Dans notre étude, les particules ultrafines correspondent à la fraction $PM_{0,3}$ alors qu'elles correspondent à la fraction $PM_{0,25}$ pour les sites de Jal El Dib et de l'université américaine de Beyrouth (AUB) dans les travaux de Daher et ses collaborateurs (Daher *et al.*, 2013), et à la fraction $PM_{0,2}$ pour tous les autres sites de comparaison.

La concentration de $PM_{0,3}$ obtenue à Sin El-Fil (site de fond urbain ; 15 µg/m^3), est similaire à celle de $PM_{0,25}$ d'un autre site de fond à Beyrouth (Université AUB ; 14 µg/m^3) et sont toutes les deux supérieures aux concentrations de $PM_{0,2}$ obtenues dans des sites de fond à Barcelone (4,5 µg/m^3) et en Athènes (6,7 µg/m^3) . La concentration la plus élevée est observée à Jal El Dib, un site urbain de proximité (à côté de l'autoroute) (Tableau III-15).

Tableau III-15: Caractéristiques des sites de comparaison pour les PUF (cas des EM, IIS et C total)

Pays	Ville	PUF (µg/m^3)	Caractéristiques du site	Références
Liban	Sin El-Fil (Beyrouth)	15	Urbain (site de fond)	Notre étude
″	Bejje	10	Rural	″
″	Université AUB (Beyrouth)	14	Urbain (site de fond)	(Daher *et al.*, 2013)
″	Jal El Dib (Beyrouth)	36,1	Urbain, trafic (à côté de l'autoroute)	″
Grèce	Finokalia	-	Site de fond marin	(Bougiatioti *et al.*, 2013)
″	Athènes (centre-ville)	6,7	Urbain (site de fond)	(Pennanen *et al.*, 2007)
Espagne	Barcelone (centre-ville)	4,5	Urbain (site de fond)	″

Tableau III-16: Caractéristiques des sites de comparaison pour les PUF (cas des HAP)

Pays	Ville	PUF (µg/m^3)	Caractéristiques du site	Références
Liban	Sin El-Fil (Beyrouth)	15	Urbain (site de fond)	Notre étude
″	Université AUB (Beyrouth)	14	Urbain (site de fond)	(Daher *et al.*, 2013)
″	Jal El Dib (Beyrouth)	36,1	Urbain, trafic (à côté de l'autoroute)	″

4.2.2. Comparaison des concentrations moyennes des composants des particules ultrafines

Peu d'études ont été réalisées sur la composition chimique des particules ultrafines dans le bassin méditerranéen. Le Tableau III-17 représente les moyennes arithmétiques des concentrations des EM, IIS et C total, tandis que le Tableau III-18 représente celles des HAP obtenues dans notre étude ainsi que celles trouvées au niveau des sites de comparaison. Concernant les éléments traces, aucune étude dans le bassin méditerranéen n'a donné les valeurs des concentrations de ces éléments présents dans les particules ultrafines.

Comme dans le cas des particules fines, nous avons groupé les espèces analysées afin de pouvoir les comparer entre les différents sites du bassin méditerranéen : les ions majeurs marins (Na^+, Cl^- et Mg^{2+}), les ions inorganiques secondaires (NO_3^-, SO_4^{2-} et NH_4^+), le carbone total, les autres éléments majeurs (Al, Fe, Ca^{2+} et K^+) et les HAP (HAP à 2 ou 3 cycles ; HAP à 4 cycles ; HAP à 4 ou 5 cycles) sont ainsi étudiés.

4.2.2.a. Ions majeurs marins

Les ions Mg^{2+} et Na^+ ont des concentrations moyennes légèrement plus élevées à Bejje par comparaison avec celles de Sin El-Fil et sont comprises entre les concentrations observées dans différents sites en Grèce. Par contre, la concentration en Cl^- à Bejje est inférieure à celle obtenue à Sin El-Fil et sont toutes les deux inférieures à celles observées dans les autres sites de comparaison.

4.2.2.b. Ions inorganiques secondaires

Les concentrations moyennes des ions SO_4^{2-} et NH_4^+ à Sin El-Fil sont supérieures à celles obtenues à Bejje et sont inférieures aux concentrations observées dans les autres sites de comparaison à l'exception d'un site de fond marin en Grèce (Finokalia). D'autre part, le nitrate possède une concentration moyenne à Sin El-Fil (792 ng/m^3) inférieure à celle de Bejje (1611 ng/m^3) mais les concentrations sur les deux sites sont toutes deux inférieures aux autres sites de de comparaison à l'exception de Jal El Dib (Liban) et d'un site en Grèce (Finokalia) ayant des concentrations plus petites de 500 et 80 ng/m^3 respectivement. Les teneurs mesurées à Barcelone et Athènes apparaissent extrêmement élevées.

4.2.2.c. Carbone total

La concentration moyenne du carbone total dans les PUF collectées à Sin El-Fil (site de fond urbain ; 4 763 ng/m^3) est supérieure à celle trouvée à Bejje (site rural ; 1 738 ng/m^3) et proche de celle du site de fond urbain de Beyrouth (AUB ; 4 200 ng/m^3). La concentration la plus élevée est observée au niveau d'un site proche de l'autoroute (Jal El Dib), ce qui est cohérent.

4.2.2.d. Autres éléments majeurs

Les concentrations moyennes en Fe et K^+ dans les particules ultrafines sont comparables pour les deux sites de notre étude, et celles du K^+ sont inférieures à celles obtenues sur les sites urbains de fond en Grèce (Athènes) et en Espagne (Barcelone) à l'exception d'un site en Grèce (Finokalia) ayant une concentration en K^+ similaire à celles obtenues dans notre étude. Par contre la concentration en Ca^{2+} est plus élevée à Sin El-Fil (818 ng/m^3) en comparaison à celles obtenues à Bejje (759 ng/m^3) et Finokalia (50 ng/m^3).

4.2.2.e. Hydrocarbures aromatiques polycycliques

Rappelons que les concentrations moyennes des HAP dans les particules collectées à Bejje n'ont pas été déterminées. Très peu d'études ont été réalisées sur la composition des particules ultrafines en HAP dans le bassin méditerranéen. Le Tableau III-18 représente les concentrations moyennes des HAP des PUF obtenues à Sin El-Fil et Jal el Dib, deux sites de Beyrouth, Liban.

A l'inverse du site urbain de fond de Sin El-Fil, aucun HAP n'a été détecté dans les particules ultrafines collectées dans le site urbain de fond à l'Université AUB, Beyrouth (Daher *et al.*, 2013). D'autre part, le site de Jal El Dib fait enregistrer et de loin (facteur 10 minimum) les concentrations moyennes les plus élevées pour le Pyr, B[a]An, Chr, B[b]Fl, B[k]Fl, B[a]P, Inpy et B[g,h,i]Pe. Jal El Dib est un site urbain de Beyrouth, l'échantillonnage des particules a été réalisé sur une autoroute caractérisée par un trafic très dense, ce qui explique les teneurs élevées en HAP associés aux particules ultrafines sur ce site.

Tableau III-17 : Comparaison de la moyenne arithmétique des concentrations des EM, ions secondaires et C total (ng/m^3)

Pays	Ville	Al	Fe	Ca^{2+}	K^+	Mg^{2+}	Na^+	Cl^-	NO_3^-	SO_4^{2-}	NH_4^+	C total
Liban	Sin El-Fil	-	164	818	89,94	42,45	354	117	792	7468	830	4763
″	Bejje	-	158	759	98,63	54,17	451	99,21	1611	5661	28,62	1738
″	Université AUB	-	-	-	-	-	-	-	2800	-	2700	4200
″	Jal El Dib	-	-	-	-	-	-	-	500	-	4400	19100
Grèce	Finokalia	-	-	50	110	30	150	280	80	1580	610	-
″	Athènes (été)	-	-	ND	900	-	2400	700	18000	157000	43000	-
Espagne	Barcelone (printemps)	-	-	ND	600	0	ND	1600	42000	58000	23000	-

ND = Non Disponible ou valeur < à la LDD

Tableau III-18 : Comparaison de la moyenne arithmétique des concentrations en HAP (ng/m^3)

Pays	Ville	Nap	Acy	Ace	Flu	Phe	Anth	Fla	Pyr	B[a]An
Liban	Sin El-Fil	0,0397	0,0062	0,0004	0,0068	0,0591	0,0059	0,0310	0,0500	0,0350
″	Jal El Dib (Beyrouth)	-	-	-	-	-	-	-	0,4	0,4

Nap : Naphtalène ; Acy : Acénaphtylène ; Ace : Acénaphtène ; Flu : Fluorène ; Phe : Phénanthrène ; Anth : Anthracène ; Fla : Fluoranthène ; Pyr : Pyrène ; B[a]An : Benzo[a]anthracène ; - = Non Disponible.

Tableau III-18 (suite) : Comparaison de la moyenne arithmétique des concentrations des HAP (ng/m^3)

Pays	Ville	Chr	B[b]Fl	B[k]Fl	B[e]P	B[a[P	DiB[a,h]An	InPy	B[g,h,i]Pe
Liban	Sin El-Fil	0,0505	0,1509	0,0506	-	0,0405	0,0274	0,1340	0,2919
″	Jal El Dib (Beyrouth)	0,7	1,3	0,64	1,4	0,63	-	1,1	2,6

Chr : Chrysène ; B[b]Fl : Benzo[b]fluoranthène ; B[k]Fl : Benzo[k]fluoranthène ; B[e]P : Benzo[e]pyrène ; B[a]P : Benzo[a]pyrène ; DiB[a,h]An : Dibenzo[a,h]anthracène ; InPy : Indéno[1,2,3-cd]pyrène ; B[g,h,i]Pe : Benzo[g,h,i]perylène ; - = Non Disponibl

5. Conclusion

L'échantillonnage de particules fines $PM_{2,5-0.3}$ (PF) et ultrafines $PM_{0,3}$ (PUF) a été mené au Liban, d'une part dans un site urbain densément peuplé et entouré d'une zone de trafic routier intense (Sin El-Fil, du 18 mai au 2 septembre 2011) ; et d'autre part, dans un site rural (Beije, du 5 septembre au 28 octobre 2011).

Les concentrations moyennes de PF et de PUF dans l'atmosphère en milieu urbain (26 µg/m^3 et 15 µg/m^3 respectivement) sont supérieures à celles en milieu rural (12 µg/m^3 et 10 µg/m^3 respectivement). Ces différences peuvent s'expliquer par le fait que le site urbain est fortement influencé par de nombreuses sources de particules telles que la combustion de carburants (trafic routier dense, groupes électrogènes), les activités liées à la proximité du port et de l'aéroport de Beyrouth, sans pouvoir exclure les émissions d'un incinérateur de déchets. Il a été montré que l'influence de ces sources se répercute sur la composition des particules au travers des concentrations de carbone total, d'ions secondaires comme NO_3^- et SO_4^{2-}, et plus spécifiquement de composés hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). En particulier, il est apparu que les concentrations en HAP sont plus élevées dans les PUF (entre 0,405 et 1,646 ng/m^3) que dans les PF (entre 0,119 et 0,352 ng/m^3) pour tous les échantillons collectés sur le site urbain. De plus, l'exploitation de rapports de concentration entre HAP comme fluorène / (fluorène + pyrène) < 0,5 ou encore pyrène/B(a)P ≈ 1 témoigne d'une influence des émissions des véhicules à essence tandis qu'il a été également révélé une influence du trafic routier fonctionnant au diesel au travers des rapports B[a]P / (B[a]P + chrysène) ≈ 0,5 et B[b]Fl / B[k]Fl >0,5. Les HAP stables dans l'état particulaire et associés aux PUF et des PF collectées en milieu urbain proviennent à la fois de la combustion de l'essence et du diesel qui sont utilisés au Liban comme carburants dans les voitures particulières et dans les bus, camions et groupes électrogènes respectivement. Ceci confirme que la principale source de pollution atmosphérique dans l'agglomération de Beyrouth est le trafic routier en plus de l'utilisation des groupes électrogènes pour pallier les fréquentes coupures de courant. Par ailleurs, l'exploitation des concentrations en métaux et l'utilisation de la méthode des facteurs d'enrichissement a permis de montrer l'origine anthropique majoritaire des éléments Bi, Cd, Cu, Sb et Zn, qui peut être liée, là aussi, au trafic routier en raison de la formation de particules fines et ultrafines suite à l'usure des systèmes de freinage et des pneus, très significative à proximité des zones de trafic important.

A la contribution de ces principales sources anthropiques, il a été montré une influence de sources naturelles sur la teneur et la composition des particules. Ainsi, la survenue d'une tempête de poussières désertiques, qui s'est déroulée lors de la première période de prélèvement en milieu urbain (18 mai 2011), a eu un impact significatif et explique les niveaux de concentration relativement élevés en Ca, Al, Fe, Mg, K et Ti. L'effet de ces retombées dans l'agglomération de Beyrouth s'est répercuté durablement sur la concentration de PF essentiellement, en raison de conditions météorologiques sèches et de l'ensemble des phénomènes qui a entrainé la remise en suspension des particules dans l'air. De plus, une influence des sels marins (Na^+, Cl^-, Mg^{2+}) a été remarquée de manière plus importante dans les échantillons de PF par rapport aux PUF, en cohérence avec la littérature qui décrit les aérosols marins comme des particules de taille majoritairement supérieure au µm.

Enfin, une comparaison de nos résultats avec des données issues de la littérature fait apparaître que les niveaux de concentration en particules et de leurs constituants au Liban (Sin El-Fil et Beije) sont du même ordre de grandeur dans d'autres sites de même typologie dans le bassin méditerranéen. Pour autant, cette comparaison a permis de ressortir les niveaux de concentration relativement élevés en HAP sur le site urbain de Sin El-Fil, qui s'explique par l'impact des émissions liées au trafic routier.

IV. Chapitre 4

Etude toxicologique des particules atmosphériques

Le quatrième et dernier chapitre de ce manuscrit sera subdivisé en deux parties. La partie A sera consacrée aux résultats des analyses physico-chimiques des échantillons composites de particules fines et ultrafines utilisés pour l'étude toxicologique. Ensuite, dans la partie B, les résultats des impacts toxiques et des mécanismes physiopathologiques sous-jacents engendrés par l'exposition des cellules à ces échantillons de particules seront présentés et discutés. L'ensemble sera suivi d'une discussion générale.

Partie A :

Analyses chimiques des échantillons composites de particules

Rappelons qu'après échantillonnage des particules atmosphériques par impaction en cascade à Sin El-Fil (site urbain de fond) et à Bejje (site rural), nous avons obtenu 5 échantillons de PF et 5 autres de PUF pour le site urbain et 4 échantillons de PF et 4 autres de PUF pour le site rural.

Afin d'étudier les effets toxiques des particules, nous avons constitué des échantillons de particules appelés « composites » représentatifs de l'exposition en milieu urbain et rural. Ainsi concernant les particules fines, nous avons regroupé, après analyse, les échantillons individuels PF-U (1, 2, 3, 4 et 5) d'une part et PF-R (6, 8, et 9) d'autre part. Les échantillons composites ainsi constitués seront nommés PF-U et PF-R et représentent des masses de 500 mg et 224 mg respectivement. Chacun de ces échantillons composites a fait l'objet d'une caractérisation chimique appronfondie notamment concernant la teneur en composés organiques et a été utilisé pour intoxiquer une lignée de cellules pulmonaires épithéliales bronchiques humaines (BEAS-2B) afin d'évaluer les mécanismes toxicologiques sous-jacents.

Quant aux particules ultrafines collectées sur filtre, deux types d'échantillon « composite » ont été préparés afin de pouvoir exposer les cellules à ces particules :

- un premier échantillon composite correspond aux particules ultrafines extraites des filtres en milieu aqueux ainsi qu'à la fraction hydrosoluble de ces particules (le protocole de récupération de ces particules est décrit dans le chapitre 2, partie B, paragraphe II.2.3II.2.3). Les échantillons composites en milieu aqueux caractéristiques de particules ultrafines collectées sur les sites urbain et rural sont dénommés respectivement PUF-U_{aq} et PUF-R_{aq}
- un second échantillon composite correspond à la fraction organique associée aux particules ultrafines. Ce dernier a été obtenu par extraction des filtres de particules ultrafines à l'aide d'un solvant selon le protocole décrit dans le chapitre 2 (partie B paragraphe 2.2). Les extraits organiques caractéristiques de particules ultrafines

collectées sur les sites urbain et rural sont dénommés PUF-U_{org} et PUF-R_{org} respectivement.

L'ensemble des échantillons PF-U, PF-R, PUF-U_{aq}, PUF-U_{org}, PUF-R_{aq} et PUF-R_{org} a été utilisé pour la réalisation de l'étude toxicologique. Les caractéristiques et la composition des aérosols atmosphériques de ces échantillons composites sont présentées dans cette partie du chapitre 4.

1. Caractéristiques physico-chimiques des échantillons composites

1.1. Granulométrie des particules

Les distributions granulométriques des particules des échantillons composites de PF-U et PF-R sont présentées dans les Figures IV-1 et IV-2 respectivement. Les pourcentages granulométriques cumulés correspondent à 83% et 82% de $PM_{2,5}$ respectivement pour les échantillons composites de PF-U et PF-R. Une proportion importante de particules de taille comprise entre 0,3 et 1 µm peut être remarquée pour les PF-U (50%) et les PF-R (46%).

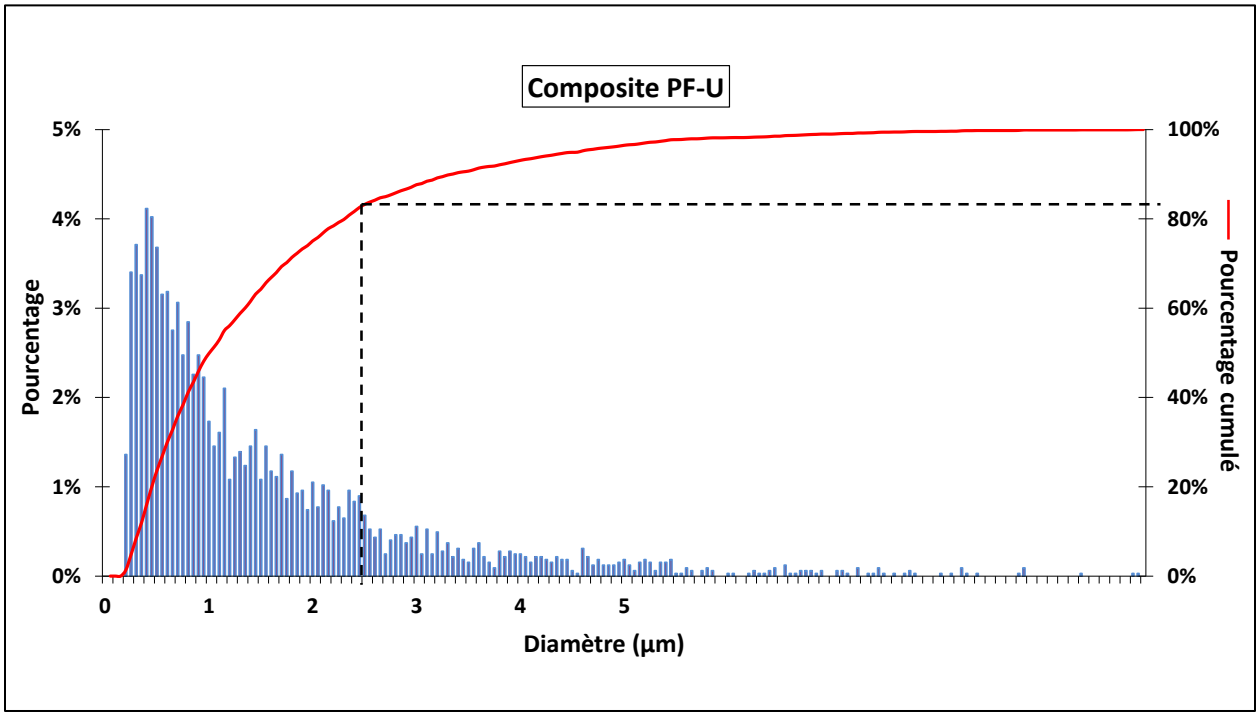


Figure IV-1 : Distribution granulométrique par MEB-EDX de l'échantillon composite de particules fines urbaines sous forme de pourcentages relatif et cumulé.

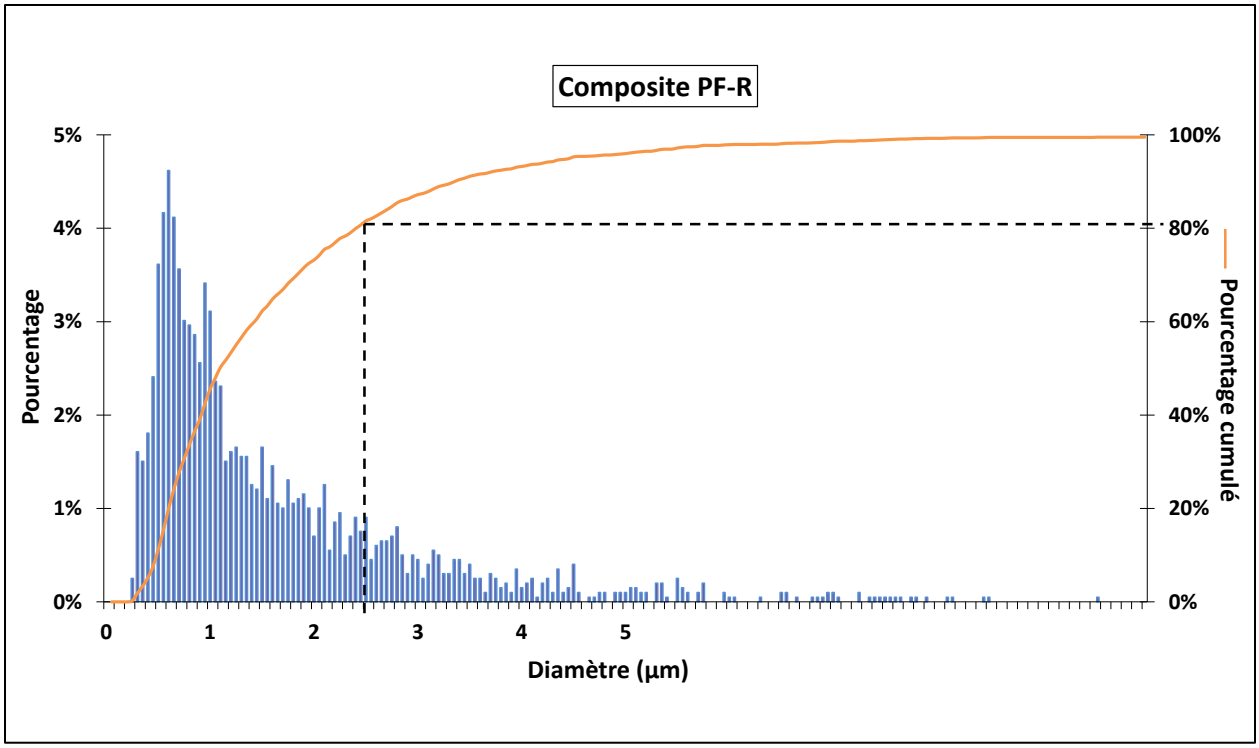


Figure IV-2 : Distribution granulométrique par MEB-EDX de l'échantillon composite de particules fines rurales sous forme de pourcentages relatif et cumulé.

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus dans d'autres études effectuées dans notre laboratoire (Dergham *et al.*, 2012 ; Dieme *et al.*, 2012) où la technique d'échantillonnage par impaction en cascade a été utilisée et nous permettent de valider notre technique d'échantillonnage. Ces résultats nous permettent de prouver que notre fraction de particules fines correspond très majoritairement aux $PM_{2,5-0,3}$.

1.2. Surface spécifique

La détermination de la surface spécifique des particules par physisorption de l'azote liquide à basse température a été réalisée seulement pour les échantillons composites de PF et a donné un résultat de 11±1 m^2/g et 3±0,5 m^2/g pour les sites de Sin El-Fil et de Bejje respectivement. Une étude réalisée en France sur les particules fines a montré des surfaces spécifiques de 2,8 ; 3,5 et 5,5 m^2/g pour un site rural à Rubrouck, un site urbain et un autre industriel à Dunkerque respectivement (Dergham *et al.*, 2012). D'autre part, les surfaces spécifiques de particules fines collectées au Sénégal étaient de 13,1 ; 12,7 et 8,3 m^2/g dans un site rural et 2 sites urbains respectivement (Dieme *et al.*, 2012). Nous remarquons que la valeur

de surface spécifique de PF-U (11±1 m^2/g) que nous avons obtenu est comparable à celle obtenue en milieu urbain au Sénégal et supérieure à celle obtenue à Dunkerque. Quant au site rural, la surface spécifique des PF à Bejje (3±0,5 m^2/g) est similaire à celle obtenue à Rubrouck (2,8 m^2/g).

Les valeurs de surfaces spécifiques dépendent d'une part de la surface géométrique des particules (distribution granulométrique et forme) et d'autre part, de la surface développée par les parois des pores (porosité). Nous constatons que les particules fines collectées à Sin El-Fil, site urbain, montrent une surface spécifique plus élevée que celles collectées en site rural. Les émissions de composés susceptibles de s'adsorber sur la particule sont plus nombreuses en milieu urbain et l'on pourrait s'attendre à observer une surface spécifique moindre en milieu urbain qu'en milieu rural. Cependant, il ne faut pas oublier que la nature des particules en ces deux milieux joue un grand rôle, et que les particules urbaines sont constituées d'une proportion de suies plus importantes. Ces dernières sont connues pour montrer des surfaces spécifiques élevées pouvant aller jusqu'à 200 m^2/g et une proportion plus importante de suies implique une aire spécifique plus élevée. Cette hypothèse est confortée en regardant la teneur en carbone total de ces échantillons (Tableau IV-1) qui est deux fois plus élevée dans l'échantillon PF-U par rapport à celle de l'échantillon PF-R (voir cliché MEB de la suie Figure IV-4).

1.3. Etude par microscopie électronique à balayage MEB-EDX

Les clichés MEB de particules typiquement présentes dans les échantillons de PF sont présentés sur les Figures IV-3 et IV-4. Les particules échantillonnées apparaissent de formes diverses, de composition et de textures variées, indépendamment du site de collecte. La quantification par MEB EDX est effectuée sur les éléments de Z>8. Les résultats de quantification d'un élément sont normalisés par rapport aux concentrations de l'ensemble des éléments détectés. Ils correspondent alors à un % massique (éléments de Z<8 exclus). Sur les clichés MEB EDX, nous faisons apparaitre le type d'éléments détecté ainsi que, entre parenthèses, le % massique de cet élément dans la particule.

Ainsi, des particules de type aluminosilicates, majoritairement constituées de Si, puis de Al, Ca, Fe ou Mg, sont observées sur les deux sites et présentent une morphologie tantôt plane et anguleuse, tantôt grossière et aux contours arrondis ou érodés plus douce. Pour le site urbain en particulier, il est clairement mis en évidence la présence de particules composées de Si, Al, Ca,

Fe, Mg (Figure IV-4) qui correspondent à des éléments majeurs identifiés dans les retombées de poussières désertiques de mai 2011 (chapitre 3, Tableau III-4). Ces observations peuvent être considérées comme une confirmation de l'impact de ces retombées en particulier sur les PF collectées sur le site urbain.

Des particules riches en Ca et S, avec une proportion en ces deux éléments quasi constante (environ 2/3 de Ca et 1/3 de S) sont également observées sur les deux sites, avec des formes plutôt planes et anguleuses. Il a été montré que les particules de gypse $CaSO_4$, $2H_2O$ possèdent une morphologie plane et en losange (De Bock *et al.*, 1994) et la présence d'un tel type de particule peut être supposée.

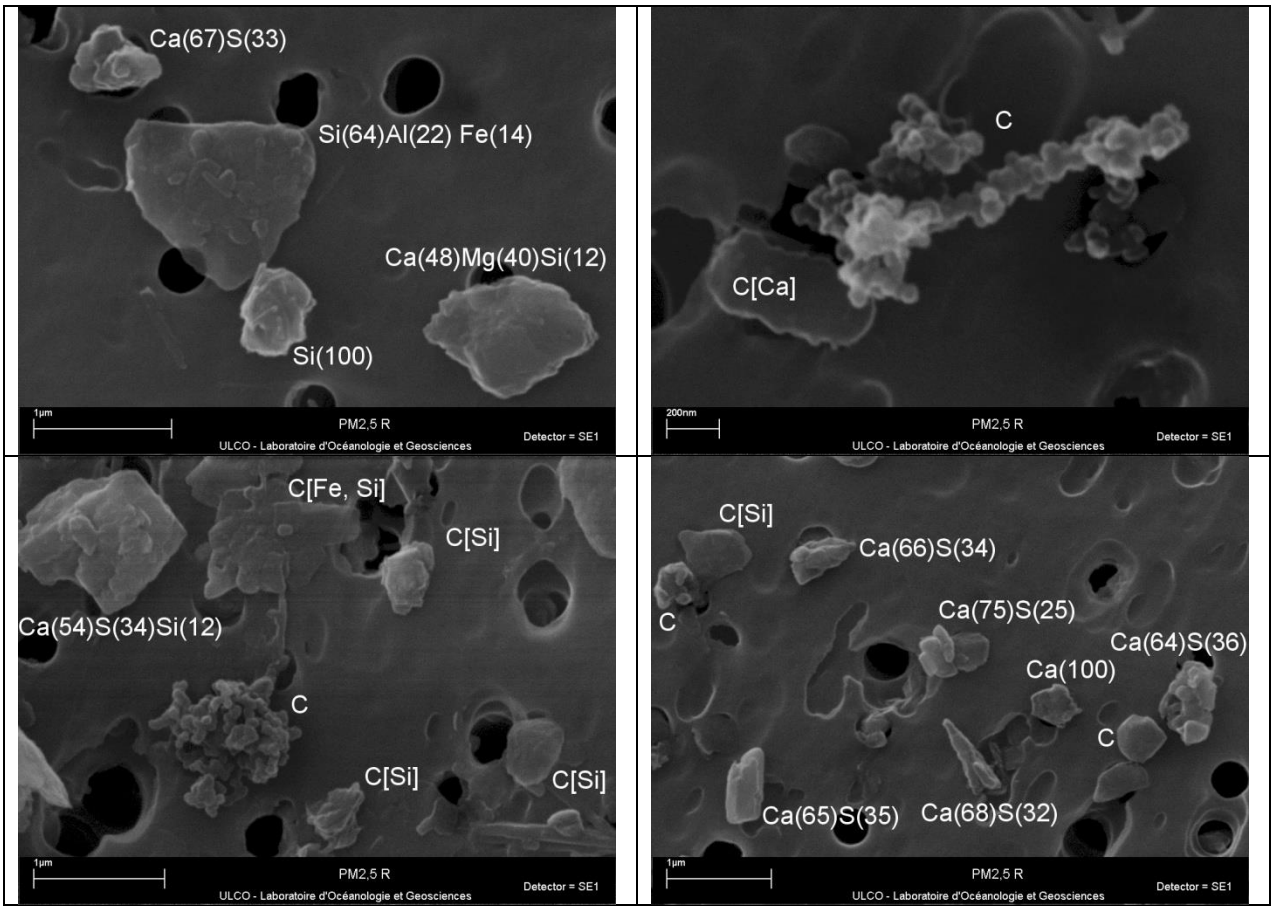


Figure IV-3 : Clichés MEB et composition EDX de particules fines rurales.

Des particules riches en Si, Ca, probablement sous la forme SiO_2 et $CaCO_3$ sont échantillonnées sur les deux sites. Sur le site urbain, des particules riches en Fe, en Fe et Zn sont également détectées. La forme non sphérique de ces dernières suggère que leur présence n'est pas liée à un processus haute température, de type combustion, mais elle est plutôt à un phénomène

mécanique (abrasion de pièces métalliques).

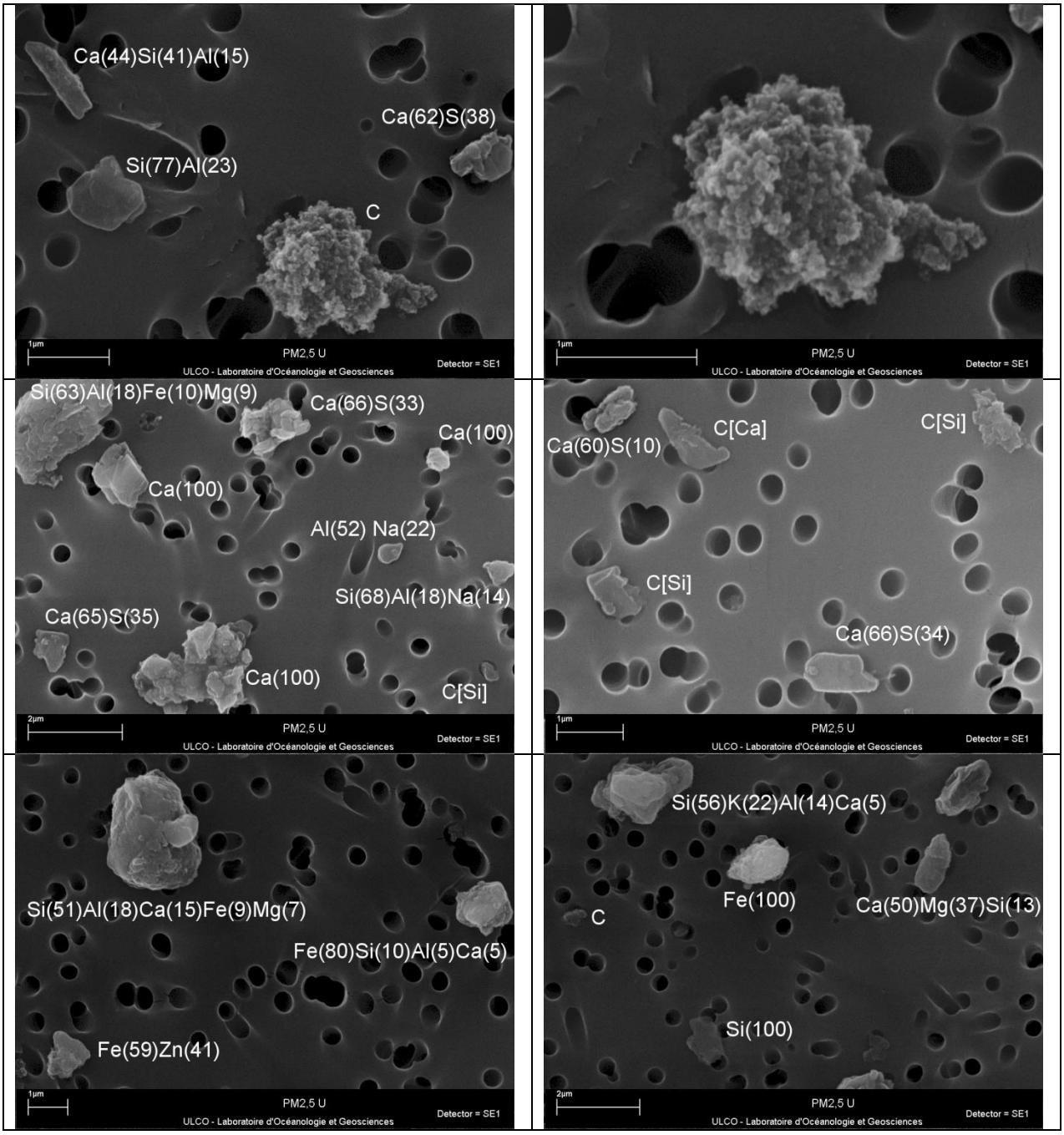


Figure IV-4 : Clichés MEB et composition EDX de particules fines urbaines.

Enfin, il faut souligner la présence de nombreuses particules carbonées de type suie. Ces dernières se présentent principalement sous la forme de chaines de sphérules carbonées (Figure IV-3) ou de suies plus grosses constituées d'un amas de particules nanométriques (Figure IV-4). Nous pouvons relier leur présence à l'utilisation de combustibles fossiles dans la

région. D'autres particules carbonées, autres que des suies sont également présentes, sans toutefois pouvoir donner plus de précisions sur leur origine (charbons, résidus carbonés, …).

2. Composition des échantillons composites

2.1. Composition en ions inorganiques, métaux et C total

La composition des échantillons composites de PF et de PUF en ions inorganiques, éléments majeurs, éléments traces et carbone total est donnée dans le Tableau IV-1 (en ng/m^3, en µg/g de particule pour les PF et µg/mL d'extrait pour les PUF). Nous avons également présenté la proportion de chacune des espèces analysées dans les échantillons au moyen de diagramme circulaire (Figures IV-5 et IV-6).

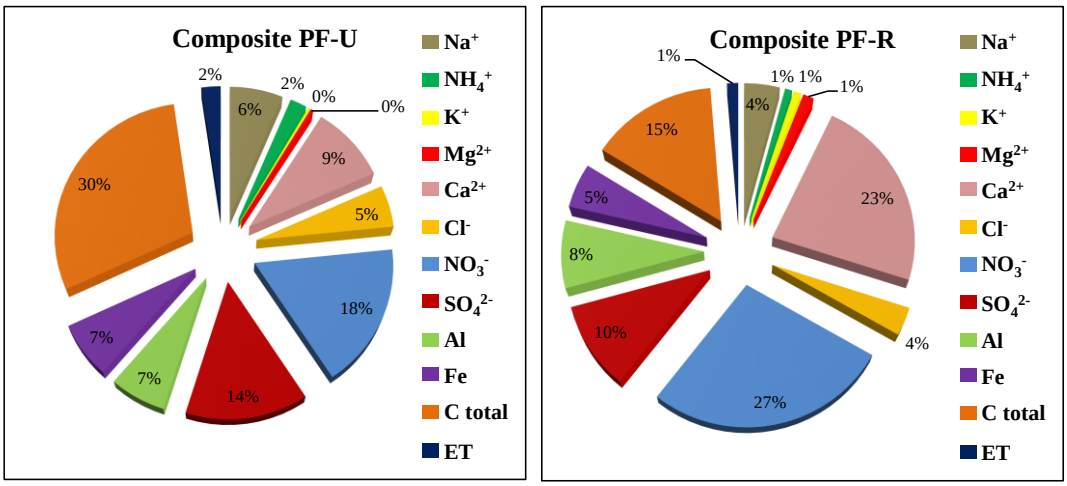


Figure IV-5 : Répartition des ions inorganiques, du carbone total et des éléments majeurs et traces dans les échantillons composites de particules fines PF-U et PF-R. ET = Ag, As, Ba, Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Nb, Ni, P, Pb, Rb, Sb, Sc, Sn, Sr, Te, Ti, Tl, V et Zn.

Une comparaison entre les particules collectées en milieu urbain et celles collectées en milieu rural nous permet de déduire que :

- Les teneurs en carbone total sont environ deux fois plus élevées dans les particules du site urbain en comparant avec celles du site rural.
- les proportions de nitrates NO_3^- et des éléments de la croûte terrestre surtout le calcium dans les échantillons de particules rurales sont supérieures à celles observées dans les échantillons urbains.
- les particules collectées en milieu urbain présentent des teneurs en ammonium NH_4^+ et sulfate SO_4^{2-} plus élevées que celles observées dans les particules du milieu rural.

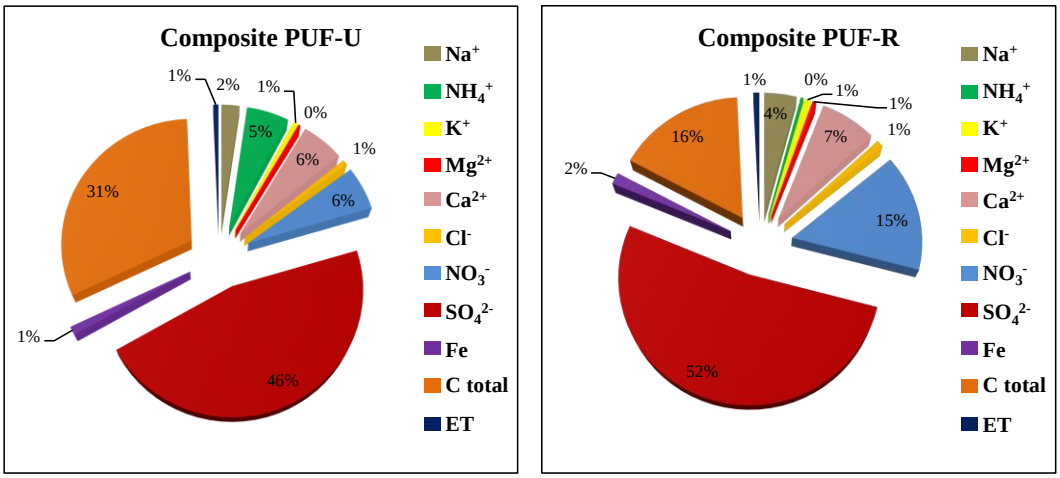


Figure IV-6 : Répartition des ions inorganiques, du carbone total et des éléments majeurs et traces dans les échantillons composites de particules ultrafines PUF-U et PUF-R. ET = Ag, Ba, Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, P, Pb, Sb, Sn, Sr, Ti, Tl, V et Zn.

D'autre part, en comparant les échantillons de PUF avec ceux de PF, nous pouvons constater que :

- les teneurs en nitrates NO_3^- dans les particules fines sont supérieures à celles trouvées dans les PUF. Il a été montré que dans les pays relativement chauds, comme ceux du bassin méditerranéen, les nitrates, résultant de la conversion gaz-particule, s'associent préférentiellement avec le calcium (Glavas *et al.*, 2008 ; Koçak *et al.*, 2004 ; Kouyoumdjian et Saliba, 2006) ; ce dernier étant majoritairement présent dans les particules fines, une proportion élevée de nitrates dans les PF n'est pas surprenante. A l'inverse, dans les régions plus froides, les ions nitrates sont associés majoritairement aux ions NH_4^+ (Ledoux *et al.*, 2006).
- les proportions et les teneurs des éléments caractéristiques de la croûte terrestre (Ca^{2+}, Al et Fe) et des aérosols marins (Na^+, Cl^- et Mg^{2+}) sont plus élevés dans les PF que dans les PUF. Les particules résultantes de l'érosion mécanique des sols ou du pétillement marins sont en effet réputées pour être des particules de taille supérieure au micron.
- les PUF possèdent des teneurs en carbone total et en ions inorganiques secondaires surtout les sulfates SO_4^{2-} plus élevées que celles trouvées dans les PF. La proportion élevée en SO_4^{2-} dans les PUF pourrait être due en partie aux émissions de dioxyde de soufre SO_2 associées à la combustion des combustibles riches en soufre surtout utilisés dans les bus, les camions et les groupes électrogènes (Waked *et al.*, 2012 ; MoE-ECODIT, 2010), sans exclure la contribution d'apports à longue distance du SO_2. Dans

les deux cas, le SO_2 subit une conversion pour former l'ion sulfate SO_4^{2-} stable dans l'état particulaire.

Tableau IV-1 : Concentrations (ng/m^3, µg/g de particules fines et µg/mL d'extrait de particules ultrafines) des ions inorganiques, éléments majeurs, éléments traces et carbone total dans les aérosols particulaires des échantillons composites de PF-U, PF-R, PUF-U et PUF-R.

	Particules fines				Particules ultrafines			
Espèces	**PF-U**	**PF-R**	**PF-U**	**PF-R**	**PUF-U**	**PUF-R**	**PUF-U**	**PUF-R**
	(ng/m^3)		(µg/g de particule)		(ng/m^3)		(µg/mL d'extrait)	
Na^+	549	200	20984	13407	335	446	116	206
NH_4^+	173	40,34	6626	2701	806	32	266	14,74
K^+	22,64	42,55	1627	1516	86,58	98,52	30,18	45,62
Mg^{2+}	29,05	60,81	2325	1945	40,22	53,58	13,92	24,77
Ca^{2+}	806	1108	42360	53996	791	782	275	363
Cl^-	437	160	16695	10743	103	100	36,08	46,92
NO_3^-	1501	1318	57376	88246	780	1623	283	755
PO_4^{3-}	<LDQ	<LDQ	<LDQ	<LDQ	<LDQ	<LDQ	<LDQ	<LDQ
SO_4^{2-}	1213	492	46368	32970	6775	5629	2328	2606
C total	2556	718	97727	48059	4663	1772	1560	823
Ag	0,04	0,00	1,42	0,25	0,040	0,021	0,0059	0,0099
Al	558	384	21351	25719	ND	ND	ND	ND
As	0,27	0,09	10,16	5,88	ND	ND	ND	ND
Ba	18,76	2,70	717,05	180,81	15,33	2,98	2,75	1,38
Bi	0,50	0,06	19,15	4,28	0,142	0,11	0,055	0,052
Cd	0,07	0,02	2,83	1,09	0,137	0,12	0,045	0,053
Co	0,27	0,14	10,34	9,38	0,140	0,09	0,049	0,043
Cr	1,39	0,64	53,27	42,53	0,747	0,83	0,28	0,38
Cu	38,40	1,50	1468	100,20	20,58	3,13	7,09	1,45
Fe	582	254	22232	16978	157	162	54,53	75,41
Mn	8,03	4,08	307,17	273	2,79	3,18	0,96	1,48
Nb	0,28	0,15	10,52	9,71	ND	ND	ND	ND
Ni	2,17	0,97	82,90	64,66	4,14	2,95	1,40	1,36
P	26,17	16,52	1000	1106	16,80	23,74	5,75	11,02
Pb	3,61	0,87	138	58,46	4,08	3,19	1,44	1,48
Rb	0,56	0,39	21,33	26	ND	ND	ND	ND
Sb	1,23	0,15	47,13	10,02	0,76	0,78	0,25	0,36
Sc	0,05	0,04	2,05	2,73	ND	ND	ND	ND
Sn	1,00	0,08	38,29	5,13	1,42	0,95	0,48	0,44
Sr	5,68	2,80	217,30	187,39	0,880	1,83	0,16	0,85
Te	<LDQ	<LDQ	<LDQ	<LDQ	<LDQ	<LDQ	<LDQ	<LDQ
Ti	67,81	27	2593	1807	33,89	20,82	6,13	9,71
Tl	0,01	0,00	0,35	0,26	0,003	0,01	0,0006	0,0039
V	2,46	0,89	93,93	59,81	10,84	7,96	3,65	3,68
Zn	20,37	3,31	778,68	221,41	16,06	10,11	2,90	4,68

ND = Non déterminé ; < LDQ = inférieur à la limite de quantification.

2.2. Composition de la fraction organique

L'analyse de la fraction organique des composites de particules fines et de particules ultrafines a été réalisée par GC-MS pour les HAP et par GC-MS de haute résolution pour les PCDD, PCDF et PCB. Les résultats obtenus sont présentés dans les Tableaux IV-2, IV-3, IV-4 et IV-5 respectivement.

2.2.1. Hydrocarbures aromatiques polycycliques

Les profils des HAP des composites de PF (U et R) et de PUF (U et R) sont présentés dans les Figures IV-7 et IV-8 respectivement. Notons que ces graphes ne possèdent pas la même échelle afin d'avoir une meilleure représentation des résultats.

Nous constatons que les teneurs des HAP dans les composites de PUF sont supérieures à celles trouvées dans les composites de PF pour les 2 sites d'échantillonnage. D'autre part, les particules des échantillons composites collectées en milieu urbain présentent des teneurs en HAP plus élevées en comparant avec celles collectées en milieu rural. Les espèces majoritaires dans les composites de PUF sont les B[g,h,i]Pe, B[b]Fl et InPy alors que ceux dans les particules fines sont le B[b]Fl, Phe, B[e]P, B[a]P et B[g,h,i]Pe pour l'échantillon composite de PF-U et Nap, Phe et B[b]Fl pour l'échantillon composite de PF-R (Tableau IV-2).

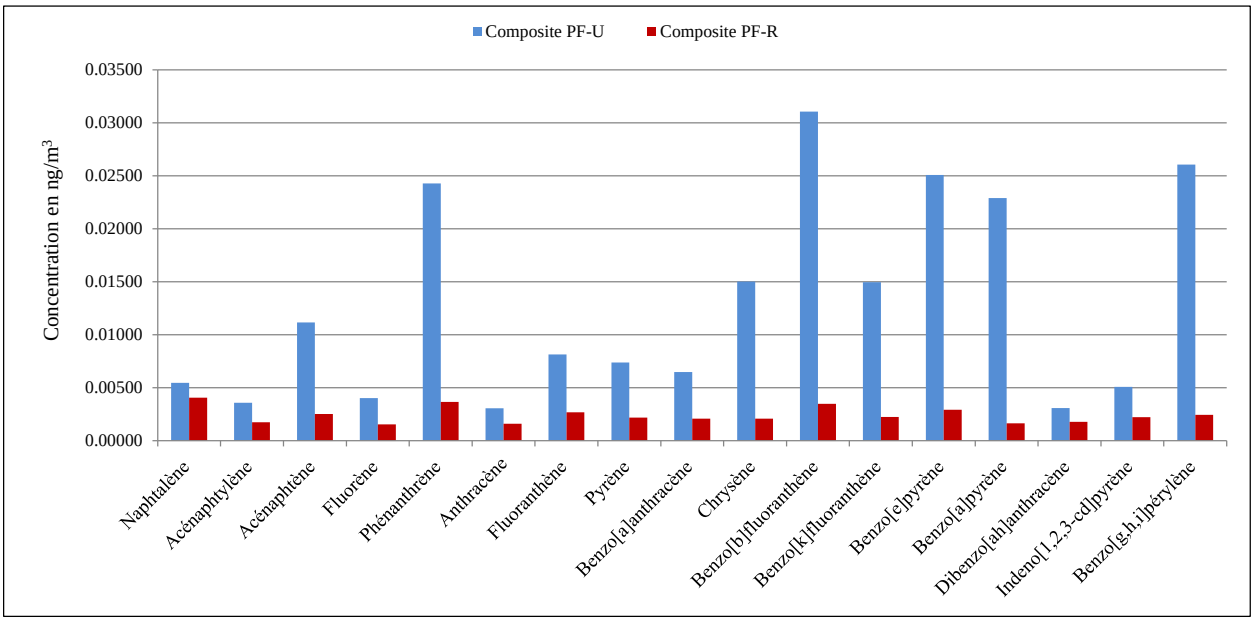


Figure IV-7 : Concentrations en HAP associés aux aérosols particulaires des échantillons composites de PF-U et PF-R.

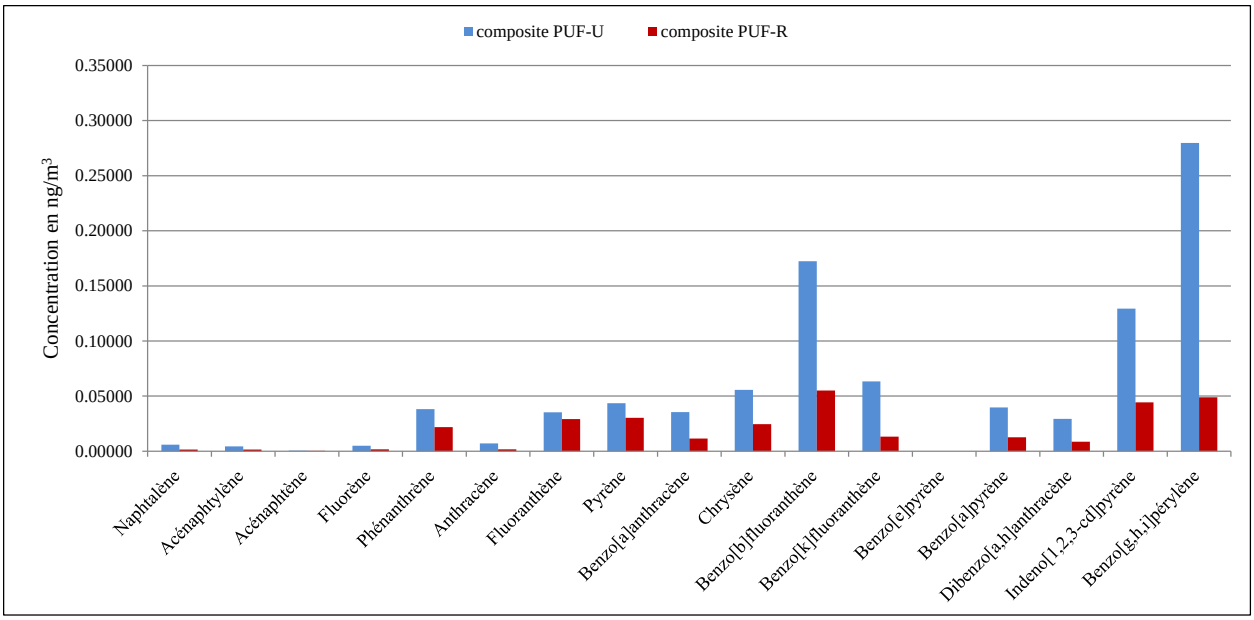


Figure IV-8 : Concentrations en HAP associés aux aérosols particulaires des échantillons composites de PUF-U et PUF-R.

En utilisant la méthode adoptée dans le chapitre 3 (paragraphe III.3.3.2), une influence des émissions de diesel et d'essence sur la composition des HAP a été mise en évidence dans les 2 sites d'échantillonnage avec une moindre influence de l'essence dans le site rural et cela à partir des rapports de concentration de HAP utilisés comme indicateur de sources (Ravindra *et al.*, 2008). En effet, dans l'échantillon composite du site urbain, nous avons pu constater que le rapport entre Fluorène / (fluorène + pyrène) est de 0,35 et 0,10 pour les PF et les PUF respectivement, de même le rapport InPy / (InPy + benzo[g,h,i]perylène) vaut 0,16 et 0,31 respectivement. Nous avons alors comparé ces valeurs avec celles obtenues dans d'autres études menées sous l'influence de sources particulières. Selon Ravindra et collaborateurs (2008), le rapport Fluorène / (fluorène + pyrène) inférieur à 0,5 est un indicateur de l'influence des émissions liées à la combustion d'essence. Par ailleurs, l'obtention de rapports B[a]P / (B[a]P + chrysène) ≈ 0,5 et B[b]Fl / B[k]Fl >0,5 indique également l'influence des émissions liée à l'utilisation du diesel sur le site urbain. En revanche, pour le site rural, nous avons obtenu Fluorène / (fluorène + pyrène) = 0,41 et 0,05 pour les PF et les PUF respectivement et InPy / (InPy + benzo[g,h,i]perylène) = 0,47. Dans ce cas, nous pouvons donc établir que l'influence du trafic essence est moindre au niveau de ce site et les HAP présents dans l'état particulaire proviendraient davantage des émissions de type diesel et d'autres processus de combustion.

Tableau IV-2 : Concentrations (pg/m^3, ng/g de particules fines et ng/mL d'extrait organique de particules ultrafines) des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les aérosols atmosphériques des échantillons composites de particules fines et ultrafines des sites urbain et rural.

	Particules fines				Particules ultrafines			
HAP	**PF-U**	**PF-R**	**PF-U**	**PF-R**	**PUF-U**	**PUF-R**	**PUF-U**	**PUF-R**
	(pg/m^3)		(ng/g de particule)		(pg/m^3)		(ng/mL d'extrait)	
Naphtalène	5,47	4,06	209	272	5,92	1,54	9,80	3,15
Acénaphtylène	3,58	1,75	137	117	4,44	1,54	7,35	3,15
Acénaphtène	11,17	2,52	427	169	0,59	0,42	0,98	0,86
Fluorène	4,03	1,54	154	103	5,03	1,68	8,33	3,44
Phénanthrène	24,27	3,66	928	245	38,19	21,84	63,23	44,74
Anthracène	3,06	1,60	117	107	7,11	1,68	11,76	3,44
Fluoranthène	8,13	2,69	311	180	35,23	29,12	58,33	59,65
Pyrène	7,38	2,18	282	146	43,52	30,24	72,05	61,94
Benzo[a]anthracène	6,49	2,09	248	140	35,53	11,48	58,82	23,52
Chrysène	15,01	2,08	574	139	55,66	24,50	92,15	50,19
Benzo[b]fluoranthène	31,05	3,48	1187	233	172	55,02	285	113
Benzo[k]fluoranthène	14,96	2,24	572	150	63,36	13,16	105	26,96
Benzo[e]pyrène	25,08	2,93	959	196	ND	ND	ND	ND
Benzo[a]pyrène	22,89	1,64	875	110	39,68	12,74	65,68	26,10
Dibenzo[a,h]anthracène	3,09	1,78	118	119	29,31	8,68	48,53	17,78
Indeno[1,2,3-cd]pyrène	5,07	2,23	194	149	129	44,24	214	90,62
Benzo[g,h,i]pérylène	26,05	2,45	996	164	280	49,00	463	100
Total	**217**	**41**	**8288**	**2739**	**945**	**307**	**1564**	**629**

ND = Non déterminé.

2.2.2. PCDD, PCDF et PCB

Les teneurs des PCDD, PCDF et PCB dans les échantillons composites de PF et de PUF sont de l'ordre du femtogramme/m^3 (fg/m^3) et sont par conséquent inférieures à celles des HAP. Ces résultats sont présentés dans les Tableaux IV-3, IV-4 et IV-5.

Tableau IV-3 : Concentrations (en fg/m^3 et ng/g) des polychlorodibenzo-*p*-dioxines dans les aérosols atmosphériques des composites de particules fines et ultrafines des sites urbain (U) et rural (R).

	Particules fines				Particules ultrafines	
PCDD	**PF-U**	**PF-R**	**PF-U**	**PF-R**	**PUF-U**	**PUF-R**
	(fg/m^3)		(ng/g de particule)		(fg/m^3)	
2,3,7,8 TCDD	<LDQ	<LDQ	<LDQ	<LDQ	<LDQ	0,0894
1,2,3,7,8 PeCDD	<LDQ	<LDQ	<LDQ	<LDQ	<LDQ	0,31
1,2,3,4,7,8 HxCDD	<LDQ	<LDQ	<LDQ	<LDQ	0,71	0,47
1,2,3,6,7,8 HxCDD	<LDQ	<LDQ	<LDQ	<LDQ	2,24	0,71
1,2,3,7,8,9 HxCDD	<LDQ	<LDQ	<LDQ	<LDQ	2,79	0,77
1,2,3,4,6,7,8 HpCDD	9,03	2,37	0,3454	0,159	35	7,55
OCDD	17,60	3,13	0,6732	0,2099	146	13,20
Total	**26,63**	**5,50**	**1,0186**	**0,3689**	**187**	**23,10**

<LDQ = inférieur à la limite de quantification ; T = tétra ; Pe = penta ; Hx = hexa ; Hp = hepta ; O = octa.

Tableau IV-4 : Concentrations (en fg/m^3 et ng/g) des polychlorodibenzo-furanes dans les aérosols atmosphériques des composites de particules fines et ultrafines des sites urbain et rural.

	Particules fines				Particules ultrafines	
PCDF	**PF-U**	**PF-R**	**PF-U**	**PF-R**	**PUF-U**	**PUF-R**
	(fg/m^3)		(ng/g de particule)		(fg/m^3)	
2,3,7,8 TCDF	<LDQ	<LDQ	<LDQ	<LDQ	3,23	1,40
1,2,3,7,8 PeCDF	<LDQ	<LDQ	<LDQ	<LDQ	<LDQ	1,16
2,3,4,7,8 PeCDF	<LDQ	<LDQ	<LDQ	<LDQ	2,05	2,05
1,2,3,4,7,8 HxCDF	<LDQ	<LDQ	<LDQ	<LDQ	5,52	2,44
1,2,3,6,7,8 HxCDF	<LDQ	<LDQ	<LDQ	<LDQ	6,41	1,85
2,3,4,6,7,8 HxCDF	<LDQ	<LDQ	<LDQ	<LDQ	8,14	3,05
1,2,3,7,8,9 HxCDF	<LDQ	<LDQ	<LDQ	<LDQ	<LDQ	1,04
1,2,3,4,6,7,8 HpCDF	4,18	1,24	0,1597	0,0831	27,64	10,02
1,2,3,4,7,8,9 HpCDF	<LDQ	<LDQ	<LDQ	<LDQ	3,92	1,27
OCDF	<LDQ	0,642	<LDQ	0,043	25,54	6,11
Total	**4,18**	**1,882**	**0,1597**	**0,1261**	**82,45**	**30,39**

<LDQ = inférieur à la limite de quantification ; T = tétra ; Pe = penta ; Hx = hexa ; Hp = hepta ; O = octa.

Tableau IV-5 : Concentrations (en fg/m^3 et ng/g) des polychlorobiphényles de type dioxines dans les aérosols atmosphériques des composites de particules fines et ultrafines des sites urbain et rural.

	Particules fines				Particules ultrafines	
PCB dioxines-like	**PF-U**	**PF-R**	**PF-U**	**PF-R**	**PUF-U**	**PUF-R**
	(fg/m^3)		(ng/g de particule)		(fg/m^3)	
PCB 81	<LDQ	<LDQ	<LDQ	<LDQ	<LDQ	<LDQ
PCB 77	<LDQ	<LDQ	<LDQ	<LDQ	50	20
PCB 123	29,82	<LDQ	1	<LDQ	<LDQ	<LDQ
PCB 118	398	318	15	21	270	70
PCB 114	<LDQ	<LDQ	<LDQ	<LDQ	<LDQ	<LDQ
PCB 105	220	106,48	8	7	100	30
PCB 126	<LDQ	<LDQ	<LDQ	<LDQ	<LDQ	<LDQ
PCB 167	<LDQ	<LDQ	<LDQ	<LDQ	30	<LDQ
PCB 156	<LDQ	<LDQ	<LDQ	<LDQ	<LDQ	<LDQ
PCB 157	<LDQ	<LDQ	<LDQ	<LDQ	<LDQ	<LDQ
PCB 169	<LDQ	<LDQ	<LDQ	<LDQ	<LDQ	<LDQ
PCB 189	<LDQ	<LDQ	<LDQ	<LDQ	<LDQ	<LDQ
Total	**648**	**424,48**	**24**	**28**	**450**	**120**

<LDQ = inférieur à la limite de quantification.

Comme dans le cas des HAP, les PCDD, PCDF et PCB se trouvent à des concentrations plus élevées dans les particules collectées en milieu urbain en comparant avec le milieu rural. De plus, pour chaque site d'échantillonnage, les échantillons composites de PUF contiennent plus de composés organiques que les composites de PF à l'exception des PCB, ayant des teneurs plus élevées dans les PF que dans les PUF.

D'autre part, nous constatons que, dans les échantillons composites de PF et de PUF, les congénères de PCDD et PCDF fortement chlorés (congénères hepta- et octa-chlorés) ont des teneurs plus élevées que les congénères moins chlorés (tétra à hexa chlorés). En effet ces derniers se trouvent à l'état gazeux en plus forte proportion que les congénères fortement chlorés qui se trouvent associés aux particules.

La présence de PCDD, PCDF et PCB dans les composites de PUF a été détectée après leurs extractions par des protocoles spécifiques (détaillés dans le paragraphe II.4.1.2, partie C, chapitre 2). Par contre, les extraits organiques des échantillons composites de PUF-U et de PUF-R que nous avons utilisés pour exposer les cellules ont été obtenus par une méthode d'extraction spécifique des HAP (paragraphe II.2.2, partie B, chapitre 2) et qui n'est pas optimisée pour

extraire tous les PCDD, PCDF et PCB. Par conséquent, nous ne sommes pas parvenus à les quantifier dans les extraits organiques de PUF et nous ne pouvons pas exclure leur présence.

Les concentrations en PCDD, PCDF et PCB dans les échantillons composites de PF et de PUF des sites urbain et rural présentées dans les Tableaux IV-3, IV-4 et IV-5 sont obtenues suite à l'application des conditions spécifiques d'extraction.

2.2.3. Equivalent toxique total des PCDD, PCD et PCB

Parmi les PCDD et les PCDF, les congénères chlorés en position latérale (2, 3, 7 ou 8) sont les plus toxiques. A chaque congénère est ainsi attribué un coefficient de toxicité (TEF, Toxic Equivalent Factor), qui a été estimé en comparant son activité à celle de la dioxine la plus toxique (2,3,7,8-TCDD). Le TEF est attribué à chaque congénère selon les barèmes internationaux par rapport à celui de la 2,3,7,8-TCDD qui est arbitrairement fixé à 1 (INERIS, 2005).

Dans les particules atmosphériques, les dioxines sont généralement présentes dans des mélanges contenant un grand nombre de congénères, chacun ayant un degré de toxicité spécifique. La toxicité globale d'un tel mélange est exprimée en équivalents toxiques internationaux (International Toxic Equivalent Quantity, I-TEQ).

Pour calculer l'équivalent toxique global d'un mélange de congénères par rapport à la 2,3,7,8-TCDD, les concentrations de 17 congénères les plus toxiques (dioxines et furanes) sont multipliées par leurs TEF respectifs et par suite additionnés. Le calcul du TEQ ne tient compte que des congénères dioxines et furanes. Cependant l'OMS a ajouté aussi 12 PCB de type dioxines (PCB « dioxines-like », PCB-DL).

Le Tableau IV-6 représente les I-TEQ des mélanges de PCDD, PCDF et PCB-DL déterminés dans les échantillons composites de PF (U et R) et de PUF (U et R) en utilisant, les TEF fournis par l'OMS en 2005 (Van den Berg *et al.,* 2006), pour chacun des congénères. Nous constatons que pour chaque site de prélèvement, les I-TEQ des PUF sont supérieurs à ceux des PF et que les particules collectées en milieu urbain possèdent des I-TEQ plus élevés que ceux des particules collectées en milieu rural.

Tableau IV-6 : Equivalents toxiques des mélanges de PCDD, PCDF et PCB (dioxines-like) déterminés dans les échantillons composites de PF et de PUF en milieu urbain et rural.

	Particules fines		**Particules ultrafines**	
	PF-U	**PF-R**	**PUF-U**	**PUF-R**
	(fg/m^3)		(fg/m^3)	
I-TEQ$_{OMS}$	0,16	0,05	4,25	2,42

(Van den Berg *et al.*, 2006)

C'est important de noter que les I-TEQ déterminés ne reflètent pas toute la quantité de PCDD, PCDF et PCB présents dans l'atmosphère puisque ces derniers existent aussi à l'état gazeux non associés aux particules. Au niveau international, le ministère de l'environnement de l'Ontario (Canada) préconise un critère de qualité d'air ambiant de 5 pg I-TEQ/m^3, soit 5000 fg I-TEQ/m^3. Les concentrations que nous avons obtenues sont bien inférieures. En effet la voie d'exposition principale aux PCDD, PCDF et PCB est par ingestion et à moindre fréquence par inhalation.

Partie B :

Les effets toxicologiques des particules atmosphériques sur les cellules BEAS-2B

1. Etude de la cytotoxicité globale

La cytotoxicité globale des échantillons composites de particules fines et de particules ultrafines collectées en zones urbaine et rurale a été déterminée grâce à deux méthodes complémentaires : l'activité de la Lactate DésHydrogénase (LDH) et l'activité de la DésHydrogénase mitochondriale (DHm). Les résultats, normalisés par rapport au témoin, sont présentés dans les Figures IV-9 à IV-12.

1.1. Particules fines

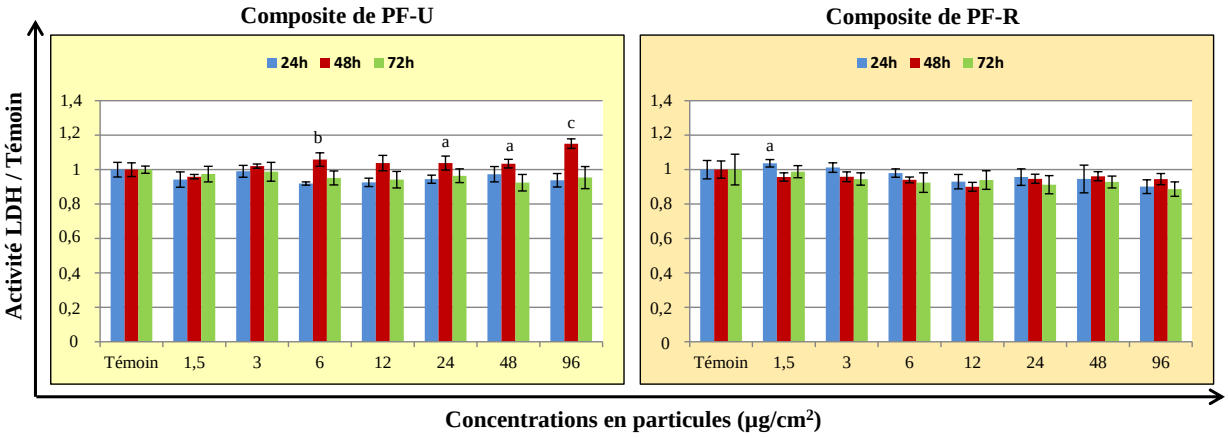


Figure IV-9 : Activité de la Lactate DésHydrogénase (LDH) extracellulaire dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 24, 48 et 72 h à des concentrations croissantes des échantillons composites de particules fines collectées en milieux urbain et rural.
Les résultats sont décrits par les moyennes et les écarts-types de 16 réplicats (témoins) et de 8 réplicats (cellules exposées). [Test U de Mann-Whitney ; comparaison par rapport au témoin ; a : $p<0,05$; b : $p<0,01$; c : $p<0,001$].

D'après la Figure IV-9, aucune variation significative de l'activité de la LDH extracellulaire n'a été observée suite à l'exposition des cellules BEAS-2B à l'échantillon composite de PF-R. Par contre, pour l'échantillon composite de PF-U, une augmentation

significative de l'activité de la LDH a été remarquée après 48 h d'exposition à partir de la concentration 6 µg/cm^2. Par conséquent, nous pouvons constater que les échantillons composites de PF ont peu ou pas d'effet sur l'intégrité et la perméabilité membranaire des cellules BEAS-2B.

D'autre part, l'activité de la DHm (Figure IV-10) a significativement diminué après 48 h d'exposition des cellules BEAS-2B dès la concentration 1,5 µg/cm^2 de PF-R. Par contre, pour l'échantillon composite de PF-U, la diminution significative de l'activité de la DHm a été remarquée plus tôt, après 24 h et 48 h d'exposition à des concentrations de PF-U supérieures ou égales à 1,5 et 3 µg/cm^2 respectivement. Une relation dose/réponse a été remarquée entre les échantillons composites de PF et l'altération de l'activité de la DHm (cette activité diminue avec l'augmentation de la concentration en PF). Par conséquent, le métabolisme mitochondriale dans les cellules BEAS-2B a été altéré suite à leur exposition aux échantillons composites de PF-U et de PF-R avec un effet plus prononcé et plus précoce pour les PF-U.

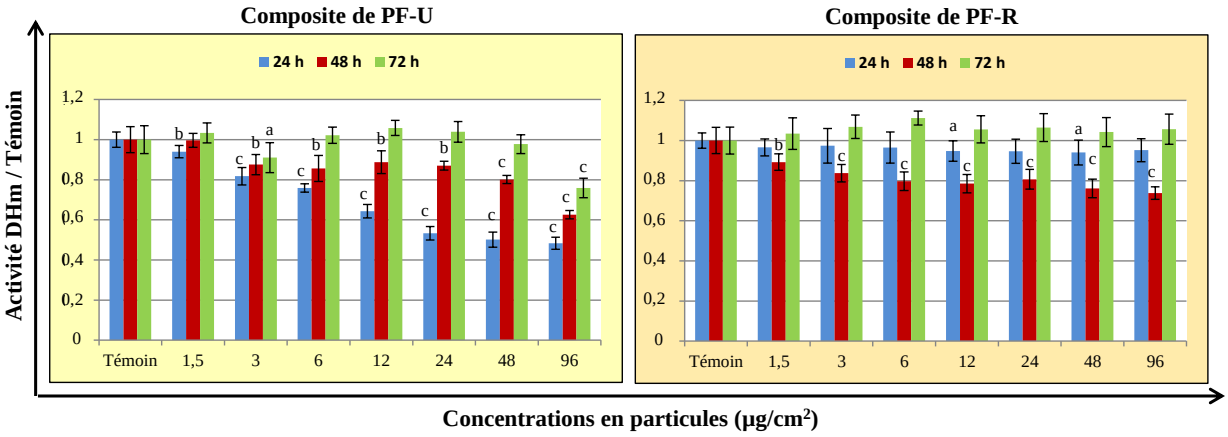


Figure IV-10 : Activité de la DésHydrogénase mitochondriale (DHm) dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 24, 48 et 72 h à des concentrations croissantes des échantillons composites de particules fines collectées en milieux urbain et rural.
Les résultats sont décrits par les moyennes et les écarts-types de 16 réplicats (témoins) et de 8 réplicats (cellules exposées). [Test U de Mann-Whitney ; comparaison par rapport au témoin ; a : $p<0,05$; b : $p<0,01$; c : $p<0,001$].

Nous pouvons donc constater que les PF-U sont plus toxiques que les PF-R à concentrations identiques, cette toxicité augmentant avec la concentration en particules. En effet, d'après la caractérisation physico-chimique, nous remarquons que les PF-U sont plus riches en composés organiques, éléments traces et ions inorganiques secondaires que les PF-R, or ce

mélange complexe d'éléments chimiques, présents à des doses variables, rend difficile la part de toxicité attribuable aux différentes fractions. Il a été décrit qu'au sein d'un tel mélange de composés, il existerait des interactions, notamment entre la fraction inorganique et organique, pouvant conduire à des effets synergiques (Garçon *et al.,* 2003 ; Vakharia *et al.,* 2001).

L'ensemble de ces résultats nous a permis de choisir deux concentrations de PF-(U et R) (3 et 12 µg/cm^2) qui ne sont pas létales mais ayant un effet sur les cellules BEAS-2B. Par la suite, ces cellules seront exposées suivant une cinétique de 24, 48 et 72h aux échantillons composites de PF-U et de PF-R à ces deux concentrations choisies, afin d'étudier les mécanismes d'action sous-jacents impliqués dans la cancérogenèse broncho-pulmonaire.

1.2. Particules ultrafines

Les Figures IV-11 et IV-12 représentent respectivement les résultats des activités de la LDH et de la DHm après exposition des cellules BEAS-2B aux échantillons composites de PUF_{aq} et de PUF_{org} et à leurs filtres blancs respectifs.

L'activité de la LDH a significativement augmenté après 24 et 48 h d'exposition des cellules BEAS-2B aux échantillons composites de PUF-U_{aq} et PUF-U_{org} à partir des concentrations 0,375 µg/cm^2 et 0,003 ng/cm^2 respectivement. Par contre, concernant les échantillons composites de PUF-R_{aq} et PUF-R_{org}, l'augmentation significative de l'activité de la LDH a également été remarquée après 72 h d'exposition à des concentrations supérieures ou égales à 0,75 µg/cm^2 et 0,003 ng/cm^2 respectivement (Figure IV-11). A l'opposé des échantillons composites de PF, nous pouvons constater que les échantillons composites de PUF provoquent des altérations modérées mais significatives de l'intégrité et de la perméabilité membranaire dès les plus faibles concentrations.

D'autre part, une diminution significative de l'activité de la DHm a été observée après 24, 48 et 72 h d'exposition des cellules BEAS-2B à des concentrations de PUF-(U ou R)$_{aq}$ et PUF-(U ou R)$_{org}$ supérieures ou égales à 0,375 µg/cm^2 et 0,003 ng/cm^2 respectivement. Par conséquent, les échantillons composites de PUF provoquent des altérations de l'activité de la DHm dès 24 h d'exposition des cellules aux concentrations les plus faibles.

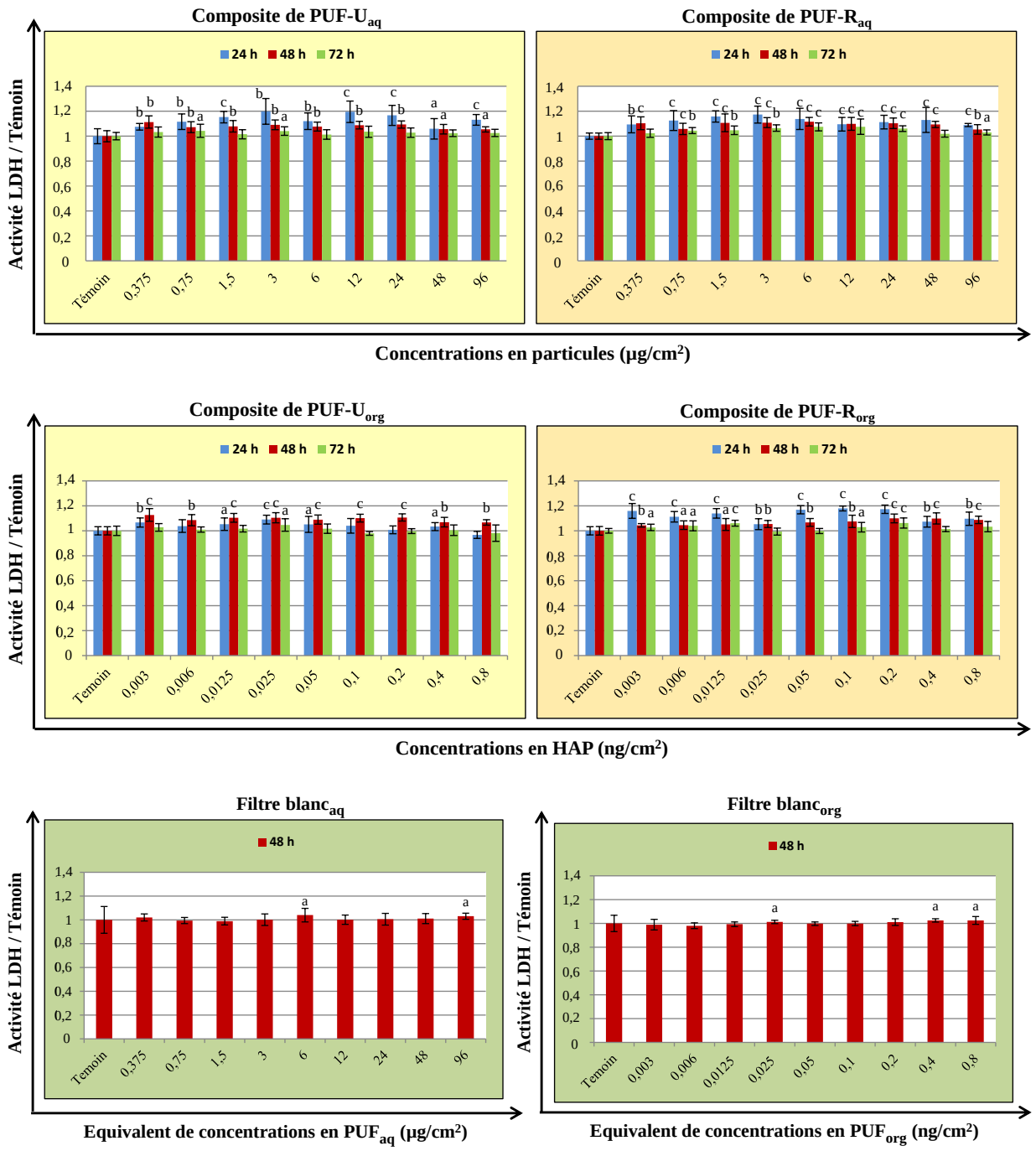


Figure IV-11 : Activité de la Lactate DésHydrogénase (LDH) extracellulaire dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 24, 48 et 72 h à des concentrations croissantes des échantillons composites de particules ultrafines (PUF$_{aq}$ et PUF$_{org}$) collectées en milieux urbain et rural et pendant 48 h à des concentrations croissantes équivalentes de filtre blanc (Filtre Blanc$_{aq}$ et Filtre Blanc$_{org}$).

Les résultats sont décrits par les moyennes et les écarts-types de 16 réplicats (témoins) et 8 réplicats (cellules exposées). [Test U de Mann-Whitney ; comparaison par rapport au témoin ; a : $p<0,05$; b : $p<0,01$; c : $p<0,001$].

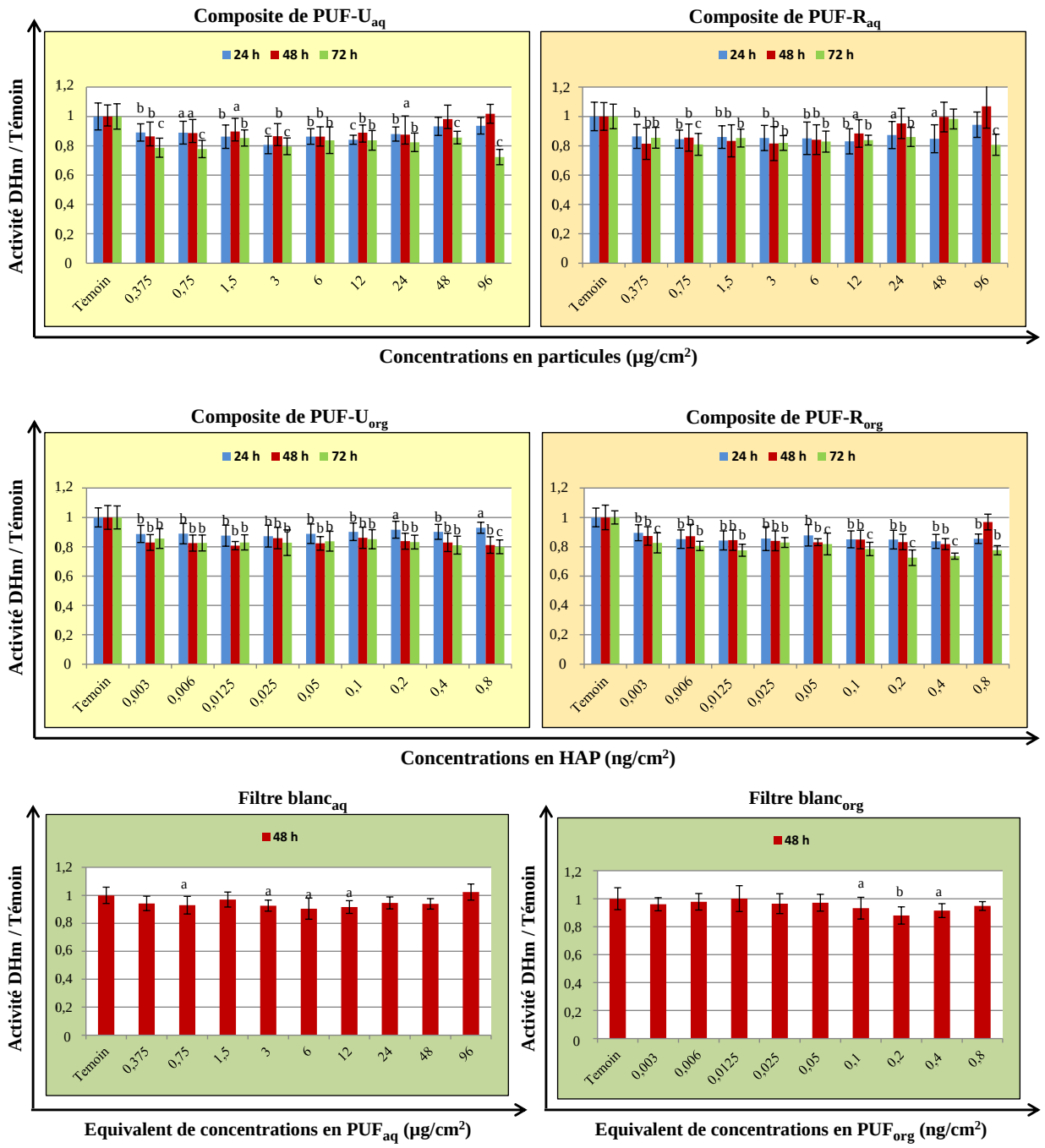


Figure IV-12 : Activité de la DésHydrogénase mitochondriale (DHm) dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 24, 48 et 72 h à des concentrations croissantes des échantillons composites de particules ultrafines (PUF$_{aq}$ et PUF$_{org}$) collectées en milieux urbain et rural et pendant 48 h à des concentrations croissantes équivalentes de filtre blanc (Filtre Blanc$_{aq}$ et Filtre Blanc$_{org}$).

Les résultats sont décrits par les moyennes et les écarts-types de 16 réplicats (témoins) et 8 réplicats (cellules exposées). [Test U de Mann-Whitney ; comparaison par rapport au témoin ; a : $p<0,05$; b : $p<0,01$; c : $p<0,001$].

Puisque l'exposition des cellules BEAS-2B à des concentrations équivalentes de filtre blanc-aqueux (FB_{aq}) et filtre blanc-organique (FB_{org}) (filtre vierge ayant subi les mêmes traitements que les filtres ayant collectés les particules) pendant 48h a montré très peu ou pas d'effet sur les activités de la LDH (Figure IV-11) et de la DHm (Figure IV-12), les effets observés pour les échantillons composites de PUF_{aq} et PUF_{org} ont été provoqués uniquement par les particules et/ou les composés solubilisés.

A l'opposition des PF, aucune relation dose/effet n'a été remarquée entre les échantillons composites de PUF et l'altération des activités de la LDH et de la DHm. Ces particules ont provoqué dès les plus faibles concentrations des altérations du métabolisme mitochondriale et de l'intégrité membranaire des cellules BEAS-2B avec des réponses similaires pour les deux sites d'échantillonnage.

Malgré le fait que la cytotoxicité provoquée par les PUF_{aq} soit proche de celle de leur extrait organique (PUF_{org}), il nous est impossible d'affirmer que la toxicité des particules ultrafines est due uniquement à la présence de composés organiques, qui sont plus adsorbés à la surface des particules des PUF_{aq} alors qu'ils sont libres en solution dans les PUF_{org} et donc plus biodisponibles.

Pour la suite, les concentrations de PUF_{aq} et PUF_{org} choisies pour exposer les cellules BEAS-2B et étudier leurs effets toxicologiques sous-jacents sont les suivantes :

- 3 et 12 µg/cm^2 pour les composites de PUF-U_{aq} et PUF-R_{aq} et une concentration équivalente à 12 µg/cm^2 pour le FB_{aq}.
- 0,23 et 0,92 ng/cm^2 pour PUF-U_{org} et 0,1 et 0,4 ng/cm^2 pour le PUF-R_{org}. Ces concentrations correspondent aux quantités d'HAP présentes dans 3 et 12 µg/cm^2 de PUF-U et PUF-R respectivement. Pour le FB_{org}, une concentration équivalente à 0,4 ng/cm^2 a été utilisée pour intoxiquer les cellules.

Le Tableau IV-7 résume les concentrations en échantillons composites de particules fines et de particules ultrafines déterminées à partir des tests de cytotoxicité. Ces concentrations seront utilisées par la suite pour exposer les cellules BEAS-2B et étudier les mécanismes d'action sous-jacents impliqués dans la cancérogenèse broncho-pulmonaire.

Tableau IV-7 : Tableau récapitulatif des concentrations en échatillons composites (particules fines et particules ultrafines) utilisées pour exposer les cellules BEAS-2B et étudier les mécanismes toxicologiques sous-jacents.

PF	**PF-UC1**	**PF-UC2**	**PF-RC1**	**PF-RC2**	
(µg/cm^2)	3	12	3	12	
PUF_{aq}	**$PUF\text{-}U_{aq}C1$**	**$PUF\text{-}U_{aq}C2$**	**$PUF\text{-}R_{aq}C1$**	**$PUF\text{-}R_{aq}C2$**	**FB_{aq}**
(µg/cm^2)	3	12	3	12	12
PUF_{org}	**$PUF\text{-}U_{org}C1$**	**$PUF\text{-}U_{org}C2$**	**$PUF\text{-}R_{org}C1$**	**$PUF\text{-}R_{org}C2$**	**FB_{org}**
(ng/cm^2)	0,23	0,92	0,1	0,4	0,4

PF = Particules Fines ; PUF = Particules UltraFines ; U = Urbain ; R = Rural ; C1 = Concentration 1 ; C2 = Concentration 2 ; FB = Filtre blanc ; org = organique ; aq = aqueux.

2. Activation métabolique de la fraction organique des aérosols atmosphériques

L'analyse chimique des échantillons composites de particules fines et ultrafines collectées en milieux urbain et rural, a révélé la présence des composés organiques notamment des HAP, PCDD, PCDF et PCB adsorbés à la surface de ces particules, autant de composés dont la biotransformation peut aboutir à la formation des substances plus toxiques voire cancérigènes.

Ce phénomène, appelé activation métabolique des composés organiques, a été étudié en évaluant l'expression des ARNm du récepteur (AhR) et du translocateur (ARNT) cellulaires des composés organiques, qui jouent un rôle central dans leur mécanisme d'action. De plus l'expression des gènes régulés par la voie AhR/ARNT a été aussi étudiée tels que le répresseur d'AhR (AhRR) ainsi que celles d'enzymes du métabolisme qui sont généralement impliquées dans la biotransformation des composés organiques (*CYP1A*1, *CYP1B1* et NQO1).

Dans le cas des échantillons de particules fines, des particules de dioxyde de titane (TiO_2) ont servi de témoins particulaires. Concernant les échantillons composites de PUF récupérées dans l'eau et leurs extraits organiques, les cellules BEAS-2B ont été exposées aux extraits de filtres vierges ayant subi le même traitement que les filtres retenant les particules.

Le B[a]P a été utilisé comme témoin positif de l'activation métabolique des composés organiques. C'est une substance toxique de référence généralement considérée comme représentative des HAP métabolisés dans les cellules épithéliales bronchiques humaines par le CYP1A1, et à moindre mesure par le CYP1B1.

Les résultats de l'expression des ARNm des gènes étudiés, rapportés à ceux du témoin, sont présentés dans les Tableaux IV-8, IV-9 et IV-10.

2.1. Particules fines

Les cellules BEAS-2B ont été exposées pendant 24, 48 et 72 h aux échantillons composites de particules fines (C1 = 3 µg/cm^2 et C2 = 12 µg/cm^2) collectées en milieux urbain et rural, aux particules de TiO_2 (12 µg/cm^2) et au B[a]P (1 µM). Les résultats sont regroupés dans le Tableau IV-8. Les Figures IV-13, IV-14 et IV-15 présentent les résultats de l'expression des gènes de *CYP1A1 CYP1B1*, NQO1, AhRR, AhR et ARNT après exposition des cellules BEAS-2B aux différentes conditions pendant 24, 48 et 72h respectivement.

Aucune induction significative de l'expression des gènes étudiés (*CYP1A1, CYP1B1*, NQO1, AhRR, AhR et ARNT) n'a été observée dans les cellules exposées pendant 24, 48 et 72 h aux particules de TiO_2 (Tableau IV-8), justifiant ainsi leur utilisation en tant que particules inertes.

Pour l'ensemble des conditions d'exposition, l'expression des ARNm d'AhR et d'ARNT n'ont montré aucune variation significative par rapport au témoin (Tableau IV-8), L'expression de ces gènes a plutôt tendance à être réprimée comme c'est le cas dans les cellules BEAS-2B exposées aux particules fines collectées à Milan (Italie) (Gualtieri *et al.*, 2011).

L'expression des ARNm de la NQO1 (enzyme de phase II du métabolisme) n'a pas significativement augmenté lors d'une exposition des cellules BEAS-2B aux échantillons composites de particules fines urbaines et rurales pour les deux concentrations étudiées (C1 et C2), et ceci quelque soit le temps d'exposition considéré. A l'exception de l'échantillon composite de PF-U où une induction significative ($p < 0,05$) a été observée après une exposition des cellules pendant 48 h à la concentration la plus élevée (C2 = 12µg/cm^2) (Figure IV-15).

Tableau IV-8 : Expression génique des enzymes du métabolisme des composés organiques (*CYP1A1, CYP1B1* et NQO1), de leur récepteur et leur translocateur cellulaires (AhR et ARNT) et du répresseur d'AhR (AhRR) dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 24, 48 et 72 h aux composites de PF collectées en milieux urbain et rural. Les résultats sont décrits par les moyennes et les écarts types de 8 réplicats (témoins) et de 4 réplicats (cellules exposées). [Test U de Mann-Whitney ; *vs* témoins (a : $p<0,05$; b : $p<0,01$; c : $p<0,001$) ; *vs* doses pour un même site (* : $p<0,05$; ** : $p<0,01$; *** : $p<0,001$) ; *vs* sites d'échantillonnage pour une même dose (1 : $p<0,05$; 2 : $p<0,01$; 3 : $p<0,001$)].

		TiO_2 (µg/cm^2)	B[a]P (µM)	PF-U (µg/cm^2)		PF-R (µg/cm^2)	
	Témoin	***C = 12,00***	***C = 1,00***	***C1 = 3,00***	***C2 = 12,00***	***C1 = 3,00***	***C2 = 12,00***
				CYP1A1			
24h	1,09 (±0,48)	1,11 (±0,27)	4,12 (±0,26)^{b}	5,45 (±1,31)^{b1}	12,20 (±5,07)^{b*1}	1,44 (±0,59)	2,96 (±0,69)^{b*}
48h	1,04 (±0,33)	0,91 (±0,20)	3,47 ((±0,86)^{b}	3,42 (±1,57)^{a}	14,79 (±6,51)^{b*1}	1,45 (±0,93)	1,79 (±0,93)
72h	1,03 (±0,26)	1,10 (±0,22)	6,55 (±0,91)^{a}	1,84 (±0,44)^{a}	10,88 (±2,33)^{b*1}	1,20 (±0,37)	2,20 (±0,65)^{a*}
				CYP1B1			
24h	1,01(±0,15)	0,94 (±0,06)	1,31 (±0,09)^{b}	1,80 (±0,19)^{b1}	2,31 (±0,61)^{b}	1,19 (±0,10)	1,48 (±0,19)^{b*}
48h	1,01 (±0,13)	1,02 (±0,17)	1,64 (±0,42)^{a}	1,85 (±0,29)^{b1}	3,23 (±0,35)^{b*1}	1,20 (±0,14)^{a}	1,65 (±0,15)^{b*}
72h	1,01 (±0,17)	1,10 (±0,20)	2,14 (±0,50)^{b}	1,39 (±0,30)^{a}	2,31 (±0,49)^{b*}	1,23 (±0,15)	1,87 (±0,42)^{b*}
				NQO1			
24h	1,03 (±0,26)	1,03 (±0,12)	0,93 (±0,05)	1,24 (±0,06)	1,41 (±0,16)	0,96 (±0,05)	1,14 (±0,19)
48h	1,01 (±0,12)	1,01 (±0,24)	1,09 (±0,27)	1,13 (±0,16)	1,30 (±0,19)^{a}	1,13 (±0,28)	1,16 (±0,36)
72h	1,02 (±0,19)	1,28 (±0,33)	1,61 (±0,28)^{a}	1,20 (±0,07)	1,25 (±0,07)	1,10 (±0,13)	1,27 (±0,24)
				AhRR			
24h	1,01 (±0,17)	0,96 (±0,06)	2,57 (±0,52)^{b}	2,57 (±0,62)^{b1}	3,91 (±0,83)^{b1}	1,36 (±0,37)^{a}	1,68 (±0,33)^{b}
48h	1,03 (±0,28)	1,19 (±0.22)	2,42 (±0,17)^{b}	2,60 (±0,38)^{b1}	6,03 (±1,09)^{b*1}	1,36 (±0,31)^{a}	2,06 (±0,59)^{b}
72h	1,43 (±1,02)	2,43 (±0,78)	4,01(±0,06)^{a}	4,41 (±0,95)^{b}	8,23 (±1,13)^{b*1}	4,27 (±1,62)^{a}	4,55 (±1,36)^{b}
				AhR			
24h	1,02 (±0,25)	1,00 (±0,05)	0,81 (±0,06)	0,95 (±0,03)	0,97 (±0,10)	0,84 (±0,05)	0,91 (±0,09)
48h	1,03 (±0,25)	0,94 (±0,07)	0,84 (±0,17)	0,96 (±0,02)	0,91 (±0,05)	0,94 (±0,10)	0,95 (±0,02)
72h	1,02 (±0,21)	0,79 (±0,03)	1,00 (±0,08)	0,79 (±0,13)	0,89 (±0,01)	0,70 (±0,09)	0,71 (±0,05)
				ARNT			
24h	1,03 (±0,28)	0,99 (±0,06)	1,00 (±0,06)	0,95 (±0,08)	1,07 (±0,04)	0,98 (±0,09)	0,81 (±0,14)
48h	1,04 (±0,34)	0,97 (±0,18)	0,90 (±0,20)	0,91 (±0,21)	0,90 (±0,10)	1,06 (±0,20)	1,00 (±0,08)
72h	1,01 (±0,17)	0,74 (±0,02)	0,92 (±0,18)	0,91 (±0,18)	0,87 (±0,02)	0,88 (±0,15)	0,79 (±0,07)

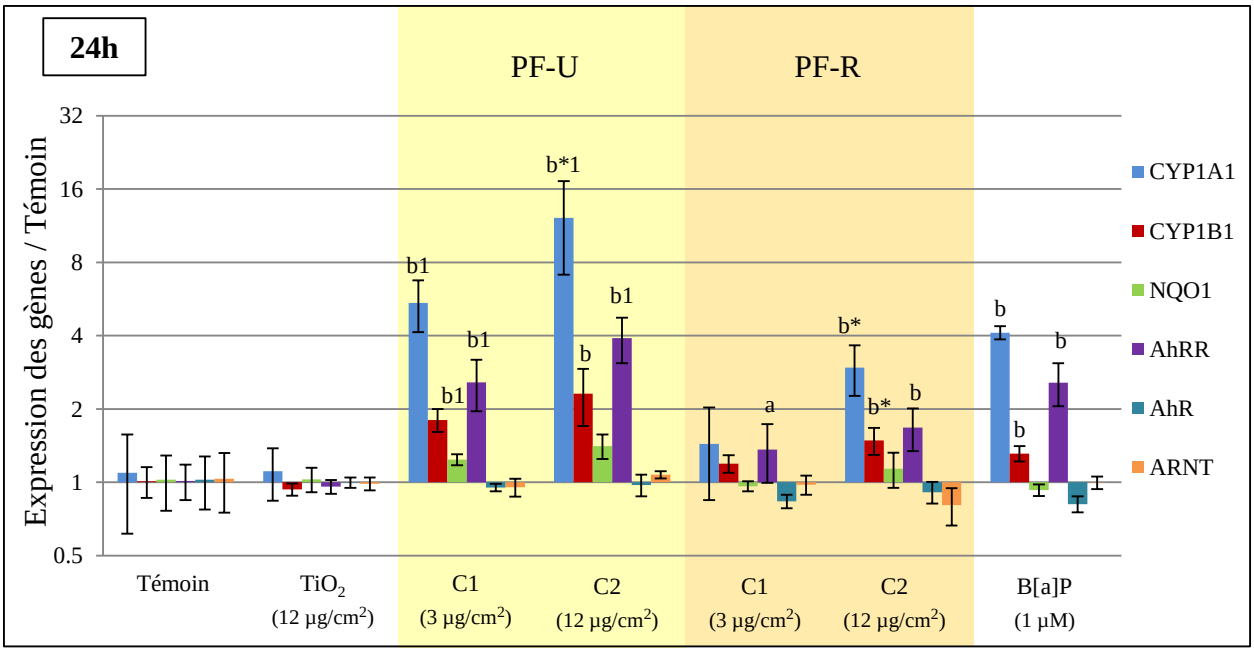


Figure IV-13 : Expression génique des enzymes du métabolisme des composés organiques (*CYP1A1*, *CYP1B1* et NQO1), de leur récepteur et leur translocateur cellulaires (AhR et ARNT) et du répresseur d'AhR (AhRR) dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 24 h aux échantillons composites de PF collectées en milieux urbain et rural (C1 = 3 µg/cm^2 et C2 = 12 µg/cm^2), au TiO_2 (12 µg/cm^2) et au témoin positif (B[a]P, 1 µM).
Les résultats sont décrits par les moyennes et les écarts types de 8 réplicats (témoins) et de 4 réplicats (cellules exposées). [Test U de Mann-Whitney ; *vs* témoins (a : p<0,05 ; b : p<0,01 ; c : p<0,001) ; *vs* doses pour un même site (* : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001) ; *vs* sites d'échantillonnage pour une même dose (1 : p<0,05 ; 2 : p<0,01 ; 3 : p<0,001)].

L'exposition aux échantillons composites de particules fines collectées à Sin El-Fil et à Bejje (PF-U et PF-R) a significativement induit l'activité transcriptionnelle du AhRR dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 24, 48 et 72 h aux deux concentrations (C1 = 3 µg/cm^2 et C2 = 12 µg/cm^2) de PF-U et de PF-R. Une augmentation significative de l'expression génique (p < 0,05) temps dépendante a été remarquée entre les temps 48 et 72 h pour toutes les conditions utilisées (Figures IV-13, IV-14 et IV-15).

Concernant les *CYP1A1* et *1B1*, une induction significative de leur expression génique a été remarquée dans les cellules BEAS-2B après leur exposition pendant 24, 48 et 72 h aux échantillons composites de PF-U et de PF-R à l'exception de PF-RC1 (24 et 48 h) pour *CYP1B1*, PF-RC1 (24, 48 et 72h) et PF-RC2 (48 h) pour *CYP1A1*. Aucune induction significative temps-dépendante de l'expression génique du CYP1A1 et CYP1B1 n'a été observée (Figures IV-13, IV-14 et IV-15).

Nos résultats sont en accord avec ceux de Gualtieri et collaborateurs qui ont obtenu une induction significative de l'expression génique de *CYP1A1*, *CYP1B1* et AhRR et une répression de l'expression d'AhR et d'ARNT suite à l'exposition des cellules BEAS-2B pendant 24 h à 0,5 ; 2,5 et 5 µg/cm^2 de particules fines collectées en Milan (Italie) (Gualtieri *et al.*, 2011).

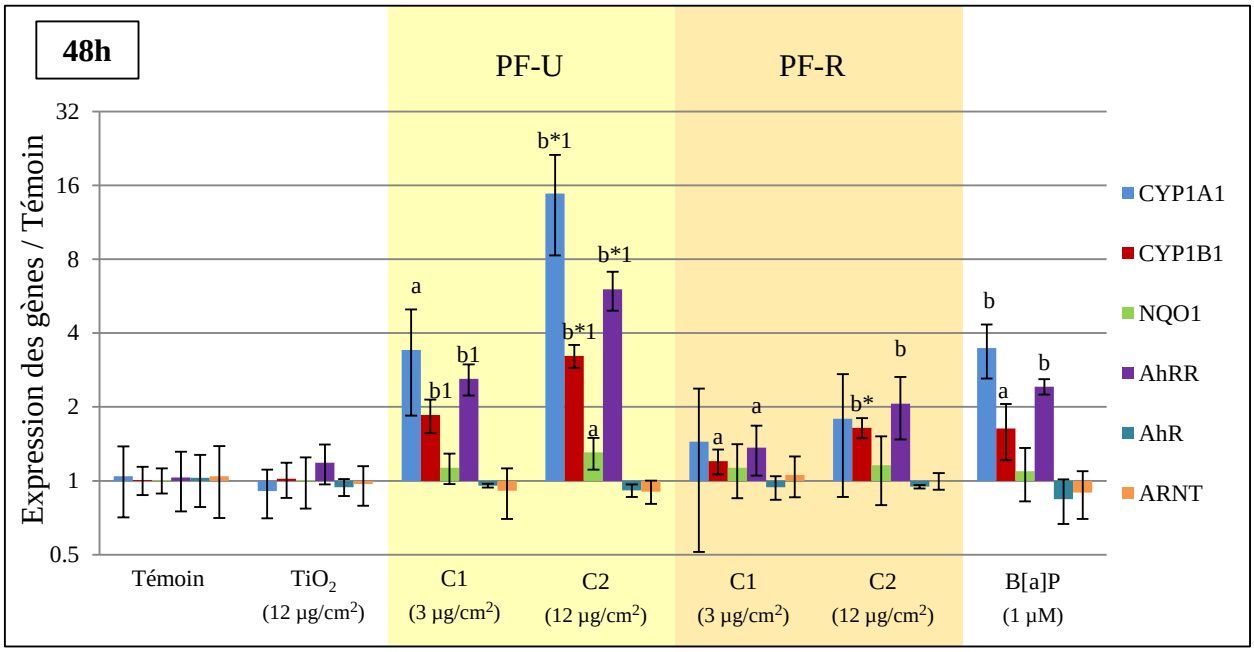


Figure IV-14 : Expression génique des enzymes du métabolisme des composés organiques (*CYP1A1*, *CYP1B1* et NQO1), de leur récepteur et leur translocateur cellulaires (AhR et ARNT) et du répresseur d'AhR (AhRR) dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 48 h aux échantillons composites de PF collectées en milieux urbain et rural (C1 = 3 µg/cm^2 et C2 = 12 µg/cm^2), au TiO_2 (12 µg/cm^2) et au témoin positif (B[a]P, 1 µM).
Les résultats sont décrits par les moyennes et les écarts types de 8 réplicats (témoins) et de 4 réplicats (cellules exposées). [Test U de Mann-Whitney ; *vs* témoins (a : p<0,05 ; b : p<0,01 ; c : p<0,001) ; *vs* doses pour un même site (* : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001) ; *vs* sites d'échantillonnage pour une même dose (1 : p<0,05 ; 2 : p<0,01 ; 3 : p<0,001)].

Pour chaque site d'échantillonnage, l'induction de l'expression génique de *CYP1A1*, *CYP1B1* et de l'AhRR a été plus prononcée après exposition des cellules BEAS-2B à la plus grande concentration de PF (C2 = 12 µg/cm^2) pendant 24, 48 et 72 h. D'autre part, à concentration identique, l'échantillon composite de PF-U provoque une induction de l'expression des ARNm de CYP1A1, CYP1B1 et AhRR plus élevée que celle obtenue suite à l'exposition des cellules BEAS-2B à l'échantillon composite de PF-R, et ce pour les 3 temps d'exposition (Figures IV-13 à IV-15). Par conséquent une induction dose- et site-dépendante de l'expression des ARNm de ces 3 gènes peut être mise en évidence suite à l'exposition des cellules BEAS-2B pendant 24, 48 et 72h aux échantillons composites de PF-U et PF-R.

Ces résultats sont en accord avec les résultats de l'analyse chimique des échantillons composites de PF qui ont montré la présence de composés organiques en concentrations plus élevées dans les PF-U que dans les PF-R. Donc, à concentration équivalente en particules, l'échantillon composite de PF-U contient plus de composés organiques que celui de PF-R. Il faut noter que ces composés organiques sont des ligands pour le récepteur cellulaire AhR, leur fixation sur ce récepteur induit l'expression des gènes tels que *CYP1A1*, *CYP1B1* et AHRR, ce qui explique cette accrue induction de l'expression génique en présence de PF-U.

Suite à l'exposition des cellules BEAS-2B à 1µM de B[a]P (témoin positif des composés organiques), une induction significative de l'expression des gènes de *CYP1A1*, *CYP1B1* et AhRR a été observée après 24, 48 et 72h d'exposition et du gène de NQO1 après 72h d'exposition. Une induction de l'expression des gènes de *CYP1A1*, *1B1* et AhRR a également été observée avec Ovrevik et collaborateurs suite à l'exposition des cellules BEAS-2B pendant 10 h à 15 µM de B[a]P (Ovrevik *et al.*, 2010).

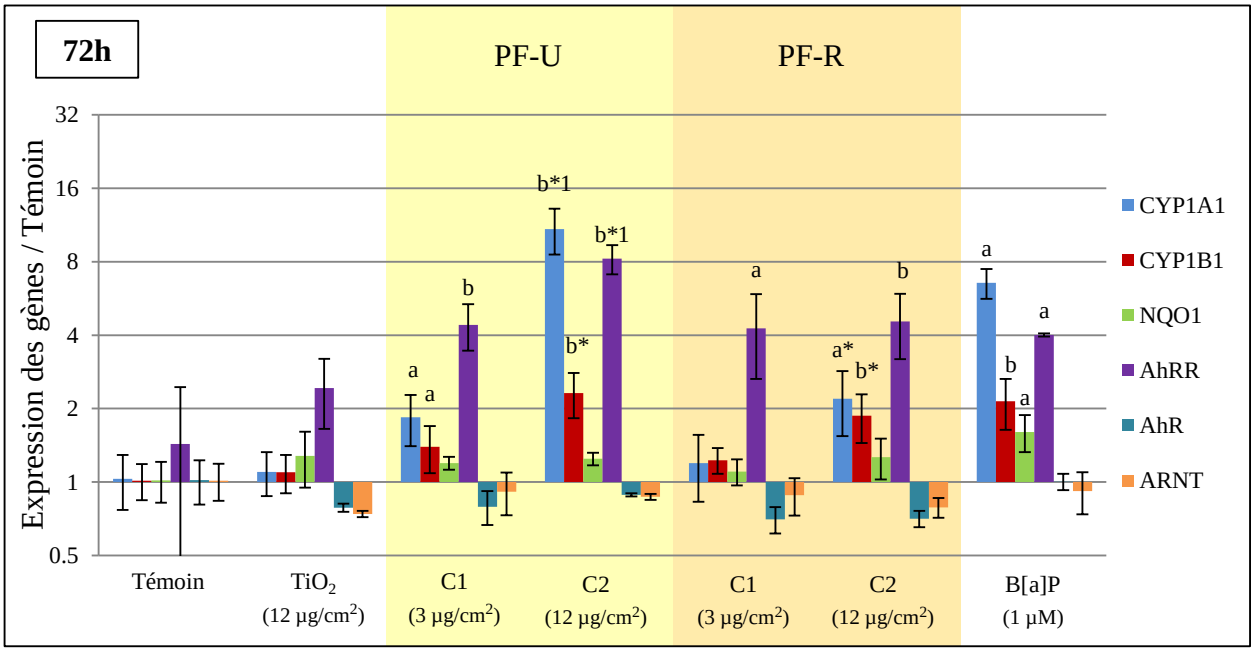


Figure IV-15 : Expression génique des enzymes du métabolisme des composés organiques (*CYP1A1*, *CYP1B1* et NQO1), de leur récepteur et leur translocateur cellulaires (AhR et ARNT) et du répresseur d'AhR (AhRR) dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 72 h aux composites de PF collectées en milieux urbain et rural (C1 = 3 µg/cm² et C2 = 12 µg/cm²), au TiO_2 (12 µg/cm²) et au témoin positif (B[a]P, 1 µM). Les résultats sont décrits par les moyennes et les écarts types de 8 réplicats (témoins) et de 4 réplicats (cellules exposées). [Test U de Mann-Whitney ; *vs* témoins (a : p<0,05 ; b : p<0,01 ; c : P<0,001) ; *vs* doses pour un même site (* : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : P<0,001) ; *vs* sites d'échantillonnage pour une même dose (1 : p<0,05 ; 2 : p<0,01 ; 3 : P<0,001)].

2.2. Particules ultrafines

Dans le cas des particules ultrafines, les cellules BEAS-2B ont été exposées aux :

- Echantillons composites de PUF récupérées dans l'eau (PUF-U_{aq} et PUF-R_{aq}), aux deux concentrations C1 = 3 µg/cm^2 et C2 = 12 µg/cm^2 pendant 24, 48 et 72 h.
- extraits organiques des échantillons composites de PUF : PUF-U_{org} (C1 = 0,23 ng/cm^2 et C2 = 0,90 ng/cm^2) et PUF-R_{org} (C1 = 0,10 ng/cm^2 et C2 = 0,40 ng/cm^2) selon une cinétique de 3, 6, 12, 24, 48 et 72 h. Ce sont les concentrations en HAP équivalentes à celles trouvées dans 3 et 12 µg/cm^2 de PUF-U et de PUF-R respectivement.
- solutions de filtre blanc-aqueux (FB_{aq} ; C = 12 µg/cm^2) et filtre blanc-organique (FB_{org} ; 0,4 ng/cm^2)
- B[a]P (1 µM) comme témoin positif des composés organiques

Dans le cas des échantillons composites de PUF-U_{org} et PUF-R_{org}, les composés organiques ne sont plus fixés sur les particules et sont donc libres en solution ce qui nous a incité à étudier aussi l'expression génique pour la cinétique de 3, 6 et 12 h afin d'évaluer d'éventuels effets plus précoces.

Les résultats des échantillons composites de PUF_{org} et de PUF_{aq} sont respectivement regroupés dans les Tableaux IV-9 et IV-10. Les Figures IV-16, IV-17 et IV-18 représentent les résultats de l'expression des gènes étudiés après exposition des cellules BEAS-2B aux échantilons composites PUF_{org} pendant 3, 6 et 12h respectivement. Les résultats obtenus suite à l'exposition des cellules aux échantillons composites de PUF_{org} et de PUF_{aq} pendant 24, 48 et 72 h sont présentés respectivement dans les Figures IV-19, IV-20 et IV-21.

2.2.1. Echantillons composites de PUF_{org}

Aucune induction significative de l'expression des gènes étudiés (*CYP1A1*, *CYP1B1*, NQO1, AhRR, AhR et ARNT) n'a été observée dans les cellules exposées au FB_{org} à une concentration équivalente à 0,4 ng HAP/cm^2 quelque soit le temps d'exposition considéré (Tableau IV-9). Par conséquent, ce filtre blanc joue bien son rôle de contrôle, et toute induction significative de l'expression génique obtenue sera due uniquement aux composés organiques des particules.

Tableau IV-9 : Expression génique des enzymes du métabolisme des composés organiques (*CYP1A1*, *CYP1B1* et NQO1), de leur récepteur et leur translocateur cellulaires (AhR et ARNT) et du répresseur d'AhR (AhRR) dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 3, 6, 12, 24, 48 et 72 h aux extraits organiques des échantillons composites de PUF (sites urbain et rural).

Les résultats sont décrits par les moyennes et les écarts types de 8 réplicats (témoins) et de 4 réplicats (cellules exposées). [Test U de Mann-Whitney ; *vs* témoins (a : $p<0,05$; b : $p<0,01$; c : $p<0,001$) ; *vs* doses pour un même site (* : $p<0,05$; ** : $p<0,01$; *** : $p<0,001$) ; *vs* sites d'échantillonnage pour une même dose (1 : $p<0,05$; 2 : $p<0,01$; 3 : $p<0,001$)].

		FB_{org} (ng/cm^2)	B[a]P (µM)	$PUF\text{-}U_{org}$ (ng/cm^2)		$PUF\text{-}R_{org}$ (ng/cm^2)	
	Témoin	***C = 0,40***	***C = 1,00***	***C1 = 0,23***	***C2 = 0,92***	***C1 = 0,10***	***C2 = 0,40***
				CYP1A1			
3h	1,07 (±0,41)	1,15 (±0,11)	2,10 (±1,10)	13,16 (±3,10)^{a}	8,63 (±1,98)^{a}	10,17 (±2,80)^{a}	10,33 (±1,77)^{a}
6h	1,23 (±0,80)	1,50 (±0,60)	4,37 (±1,03)^{a}	25,47 (±13,02)^{a}	37,86 (±24,37)^{a}	53,08 (±23,49)^{a}	27,59 (±13,67)^{a}
12h	1,41 (±1,18)	1,75 (±0,88)	6,66 (±0,45)^{a}	13,74 (±3,49)^{a}	10,84 (±6,49)^{a}	15,75 (±4,50)^{a}	18,13 (±7,49)^{a}
24h	1,02 (±0,23)	1,55 (±0,58)	4,79 (±1,50)^{a}	26,74 (±13,90)^{a}	31,19 (±22,12)^{a}	21,63 (±12,39)^{a}	41,42 (±10,55)^{a}
48h	1,31 (±0,86)	1,20 (±0,51)	4,32 (±1,01)^{a}	59,78 (±16,89)^{a}	62,29 (±35,08)^{a}	45,17 (±7,95)^{a}	74,62 (±25,26)^{a}
72h	1,01 (±0,18)	0,99 (±1,13)	6,37 (±2,07)^{a}	26,74 (±5,91)^{a}	20,11 (±15,34)^{a}	24,94 (±11,71)^{a}	33,26 (±8,00)^{a}
				CYP1B1			
3h	1,03 (±0,28)	1,10 (±0,04)	0,99 (±0,05)	2,83 (±0,58)^{b1}	1,98 (±0,25)^{b}	1,97 (±0,18)^{b}	2,43 (±0,37)^{b}
6h	1,02 (±0,23)	1,09 (±0,03)	2,92 (±1,29)^{b}	2,53 (±0,89)^{b}	1,90 (±0,54)^{a}	2,62 (±0,31)^{b}	1,83 (±0,55)^{a}
12h	1,10 (±0,51)	0,94 (±0,20)	1,21 (±0,33)^{a}	2,45 (±1,22)^{a}	1,88 (±0,77)	1,78 (±0,65)	1,84 (±0,66)
24h	1,05 (±0,37)	1,35 (±0,50)	1,62 (±0,55)	1,60 (±0,25)^{a}	2,11 (±0,76)^{a}	1,76 (±0,31)^{a}	2,40 (±0,76)^{b}
48h	1,00 (±1,10)	1,09 (±0,14)	1,86 (±0,62)^{b}	2,13 (±0,29)^{b}	2,97 (±1,35)^{b}	1,73 (±0,57)^{b}	1,86 (±0,37)^{b}
72h	1,03 (±0,29)	1,37 (±0,49)	1,96 (±0,17)^{b}	2,82 (±0,64)^{b}	2,74 (±1,15)^{b}	2,68 (±0,43)^{b}	2,57 (±0,46)^{b}
				NQO1			
3h	1,01 (±0,16)	1,05 (±0,09)	0,96 (±0,13)	1,63 (±0,41)^{a}	1,15 (±0,13)	1,27 (±0,16)^{a}	1,26 (±0,23)
6h	1,06 (±0,34)	1,04 (±0,43)	1,72 (±0,57)	0,97 (±0,24)	1,71 (±0,29)^{a}	1,53 (±0,54)	0,98 (±0,12)
12h	1,02 (±0,20)	1,32 (±0,35)	1,31 (±0,19)^{a}	1,23 (±0,24)	1,42 (±0,33)^{a}	1,17 (±0,35)	1,48 (±0,44)^{a}
24h	1,01 (±0,13)	1,21 (±0,30)	1,18 (±0,14)	0,92 (±0,08)	1,60 (±0,36)^{a*}	1,15 (±0,09)	1,54 (±0,29)^{a}
48h	1,04 (±0,30)	1,27 (±0,34)	1,43 (±0,37)	1,50 (±0,57)	1,82 (±0,18)^{a}	0,98 (±0,32)	2,06 (±0,83)^{a}
72h	1,04 (±0,32)	1,21 (±0,45)	1,58 (±0,04)	1,69 (±0,16)	2,43 (±0,55)^{a}	2,40 (±1,08)	2,65 (±0,94)^{a}

Tableau IV-9 (suite) : Expression génique des enzymes du métabolisme des composés organiques (*CYP1A1*, *CYP1B1* et NQO1), de leur récepteur et leur translocateur cellulaires (AhR et ARNT) et du répresseur d'AhR (AhRR) dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 3, 6, 12, 24, 48 et 72 h aux extraits organiques des échantillons composites de PUF (sites urbain et rural).

Les résultats sont décrits par les moyennes et les écarts types de 8 réplicats (témoins) et de 4 réplicats (cellules exposées). [Test U de Mann-Whitney ; *vs* témoins (a : $p<0,05$; b : $p<0,01$; c : $p<0,001$) ; *vs* doses pour un même site (* : $p<0,05$; ** : $p<0,01$; *** : $p<0,001$) ; *vs* sites d'échantillonnage pour une même dose (1 : $p<0,05$; 2 : $p<0,01$; 3 : $p<0,001$)].

		FB_{org} (ng/cm^2)	B[a]P (µM)	$PUF\text{-}U_{org}$ (ng/cm^2)		$PUF\text{-}R_{org}$ (ng/cm^2)	
	Témoin	***C = 0,40***	***C = 1,00***	***C1 = 0,23***	***C2 = 0,92***	***C1 = 0,10***	***C2 = 0,40***
				AhRR			
3h	1,07 (±0,37)	1,30 (±0,50)	2,42 (±1,26)[a]	8,27 (±0,36)[a]	10,10 (±1,80)[a]	7,85 (±1,74)[a]	8,43 (±2,19)[a]
6h	1,08 (±0,47)	1,08 (±0,30)	4,00 (±1,07)[a]	9,27 (±4,20)[a]	4,28 (±0,75)[a]	8,26 (±2,95)[a]	4,92 (±2,32)[a]
12h	1,08 (±0,43)	1,34 (±0,62)	2,34 (±1,08)[a]	4,85 (±0,85)[b1]	4,02 (±1,19)[b]	2,67 (±0,32)[a]	3,28 (±1,28)[b]
24h	1,03 (±0,31)	1,42 (±0,62)	2,58 (±0,87)[a]	4,67 (±1,40)[a]	3,21 (±1,57)[a]	5,85 (±1,57)[a]	7,77 (±3,47)[a*]
48h	1,06 (±0,40)	1,38 (±0,61)	2,92 (±1,28)[a]	8,83 (±4,65)[b1]	7,38 (±1,93)[a]	2,56 (±1,43)[a]	2,14 (±0,06)[a]
72h	1,03 (±0,31)	1,10 (±0,09)	4,33 (±0,65)[a]	8,44 (±1,74)[b]	29,49 (±6,31)[a]	7,27 (±2,77)[b]	6,85 (±1,70)[a]
				AhR			
3h	1,01 (±0,19)	0,91 (±0,03)	0,80 (±0,04)[a]	1,24 (±0,08)	0,73 (±0,12)[a]	1,15 (±0,11)	0,89 (±0,11)
6h	1,02 (±0,22)	0,74 (±0,01)	1,05 (±0,37)	0,83 (±0,13)	1,04 (±0,25)	1,04 (±0,15)	0,81 (±0,21)
12h	1,02 (±0,20)	0,75 (±0,08)	0,98 (±0,22)	0,85 (±0,34)	0,74 (±0,15)[a]	0,79 (±0,20)	0,69 (±0,04)[a]
24h	1,04 (±0,29)	0,91 (±0,25)	0,83 (±0,09)	0,67 (±0,12)[a]	0,88 (±0,19)	0,80 (±0,19)	1,13 (±0,42)
48h	1,02 (±0,23)	0,90 (±0,11)	0,77 (±0,09)	0,97 (±0,26)	1,17 (±0,23)	0,89 (±0,29)	0,96 (±0,20)
72h	1,02 (±0,25)	1,00 (±0,10)	1,04 (±0,20)	1,03 (±0,04)	1,40 (±0,76)	1,34 (±0,36)	1,44 (±0,12)
				ARNT			
3h	1,05 (±0,35)	0,95 (±0,08)	0,89 (±0,07)	1,64 (±0,25)	1,38 (±0,30)	1,16 (±0,16)	1,30 (±0,24)
6h	1,06 (±0,40)	0,67 (±0,14)	1,16 (±0,20)	0,85 (±0,25)	0,78 (±0,26)	1,11 (±0,30)	0,79 (±0,32)
12h	1,01 (±0,16)	0,72 (±0,11)	1,14 (±0,45)	0,85 (±0,08)	0,60 (±0,09)[a]	1,02 (±0,28)	0,80 (±0,23)
24h	1,05 (±0,35)	0,74 (±0,18)	1,11 (±0,32)	0,66 (±0,10)[a]	0,81 (±0,09)	0,93 (±0,27)	1,04 (±0,36)
48h	1,06 (±0,38)	0,73 (±0,20)	0,75 (±0,25)	1,16 (±0,49)	0,90 (±0,26)	0,87 (±0,23)	0,68 (±0,13)
72h	1,03 (±0,30)	0,78 (±0,08)	1,24 (±0,13)	1,06 (±0,17)	1,08 (±0,07)	1,29 (±0,26)	1,42 (±0,29)

Pour l'ensemble des conditions d'exposition, l'expression des ARNm d'AhR et d'ARNT n'ont montré aucune induction significative. L'expression de ces gènes a plutôt tendance à être réprimée comme dans le cas des composites de particules fines (Tableau IV-9).

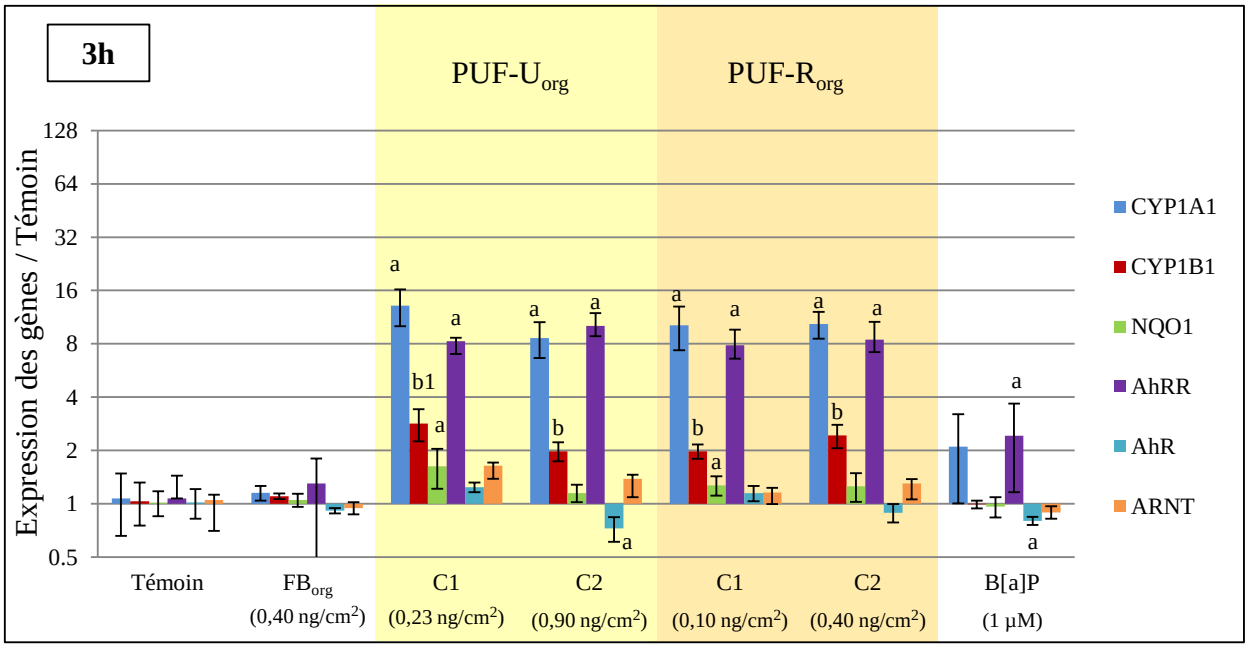


Figure IV-16 : Expression génique des enzymes du métabolisme des composés organiques (*CYP1A1*, *CYP1B1* et NQO1), de leur récepteur et leur translocateur cellulaires (AhR et ARNT) et du répresseur d'AhR (AhRR) dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 3 h aux extraits organiques de PUF (PUF_{org}) collectées en milieux urbain (C1 = 0,23 ng/cm^2 et C2 = 0,9 ng/cm^2) et rural (C1 = 0,1 ng/cm^2 et C2 = 0,4 ng/cm^2), au filtre blanc (FB_{org} ; 0,4 ng/cm^2) et au témoin positif (B[a]P, 1 µM). Les résultats sont décrits par les moyennes et les écarts types de 8 réplicats (témoins) et de 4 réplicats (cellules exposées). [Test U de Mann-Whitney ; *vs* témoins (a : p<0,05 ; b : p<0,01 ; c : p<0,001) ; *vs* doses pour un même site (* : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001) ; *vs* sites d'échantillonnage pour une même dose (1 : p<0,05 ; 2 : p<0,01 ; 3 : p<0,001)].

L'exposition aux échantillons composites de PUF-U_{org} et PUF-R_{org} a significativement induit l'activité transcriptionnelle du *CYP1A1*, du *CYP1B1* et d'AhRR dans les cellules BEAS-2B exposées aux deux concentrations de chaque échantillon et ce pour tous les temps d'exposition (3 à 72 h) à l'exception du CYP1B1 pour PUF-U_{org} à la plus petite concentration (C1 = 0,23 ng/cm^2) pendant 12h. Quant à la NQO1, une induction significative de son expression a été observée suite à l'exposition des cellules aux PUF-U_{org} C2 (6 à 72h), PUF-R_{org} C2 (24 et72 h) et PUF-U_{org} C1 et PUF-R_{org} C1 (3h). Le CYP1A1 présente le niveau d'expression le plus élevé (allant jusqu'à 75 fois celui du témoin) suite à l'exposition des cellules aux différentes conditions (quelque soit la concentration et le temps d'exposition considéré) (Figures IV-16 à IV-21).

De manière générale, l'expression génique de *CYP1A1*, *CYP1B1*, AhRR et NQO1 n'a montré aucune différence significative entre les deux concentrations utilisées de chaque échantillon composite de PUF_{org} quelque soit le temps d'exposition considéré, à l'exception de certains cas concernant AhRR et NQO1 (Figures IV-16 à IV-21). D'autre part, pour une même condition, des variations, généralement non significatives dans les niveaux d'expression des gènes (*CYP1A1*, *CYP1B1*, NQO1 et AhRR) entre les différents temps d'exposition ont été observées, principalement pour le CYP1A1 et à un moindre niveau pour l'AhRR (Figures IV-16 à IV-21).

Par conséquent, il semble que le niveau d'induction de l'expression de ces gènes par les extraits organiques des composites de PUF (PUF_{org}) soit indépendant de la concentration et de la durée d'exposition.

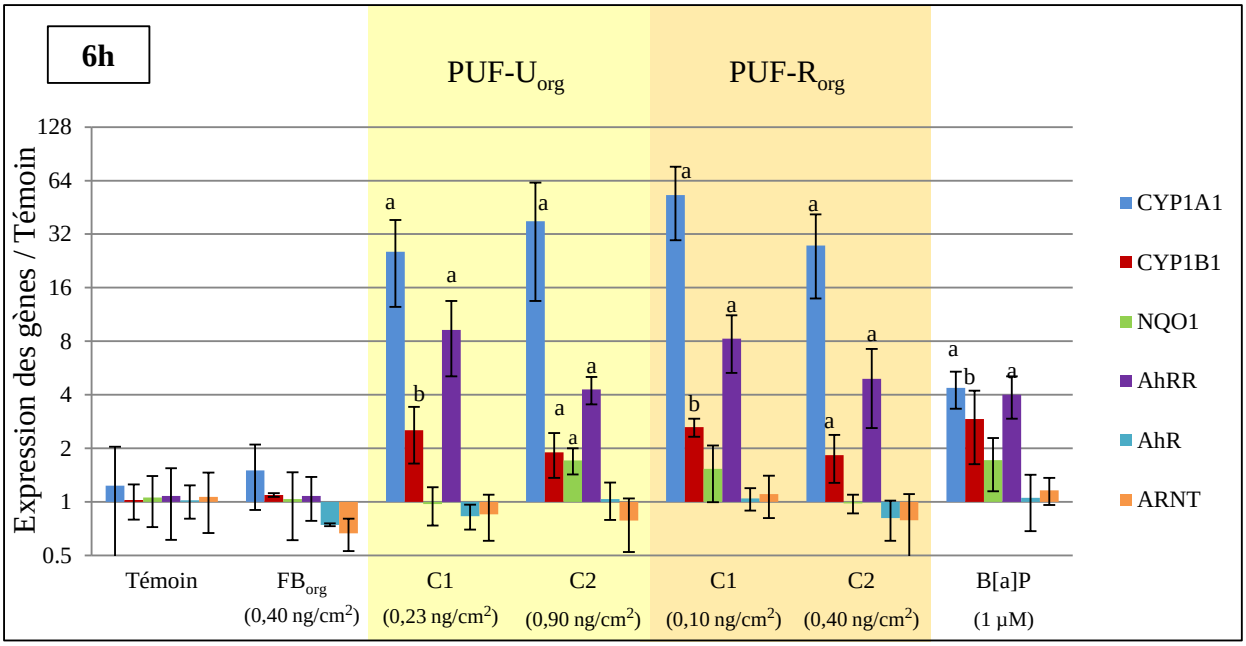


Figure IV-17 : Expression génique des enzymes du métabolisme des composés organiques (*CYP1A1*, *CYP1B1* et NQO1), de leur récepteur et leur translocateur cellulaires (AhR et ARNT) et du répresseur d'AhR (AhRR) dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 6 h aux extraits organiques de PUF (PUF_{org}) collectées en milieux urbain (C1 = 0,23 ng/cm^2 et C2 = 0,9 ng/cm^2) et rural (C1 = 0,1 ng/cm^2 et C2 = 0,4 ng/cm^2), au filtre blanc (FB_{org} ; 0,4 ng/cm^2) et au témoin positif (B[a]P, 1 µM). Les résultats sont décrits par les moyennes et les écarts types de 8 réplicats (témoins) et de 4 réplicats (cellules exposées). [Test U de Mann-Whitney ; *vs* témoins (a : $p<0,05$; b : $p<0,01$; c : $p<0,001$) ; *vs* doses pour un même site (* : $p<0,05$; ** : $p<0,01$; *** : $p<0,001$) ; *vs* sites d'échantillonnage pour une même dose (1 : $p<0,05$; 2 : $p<0,01$; 3 : $p<0,001$)].

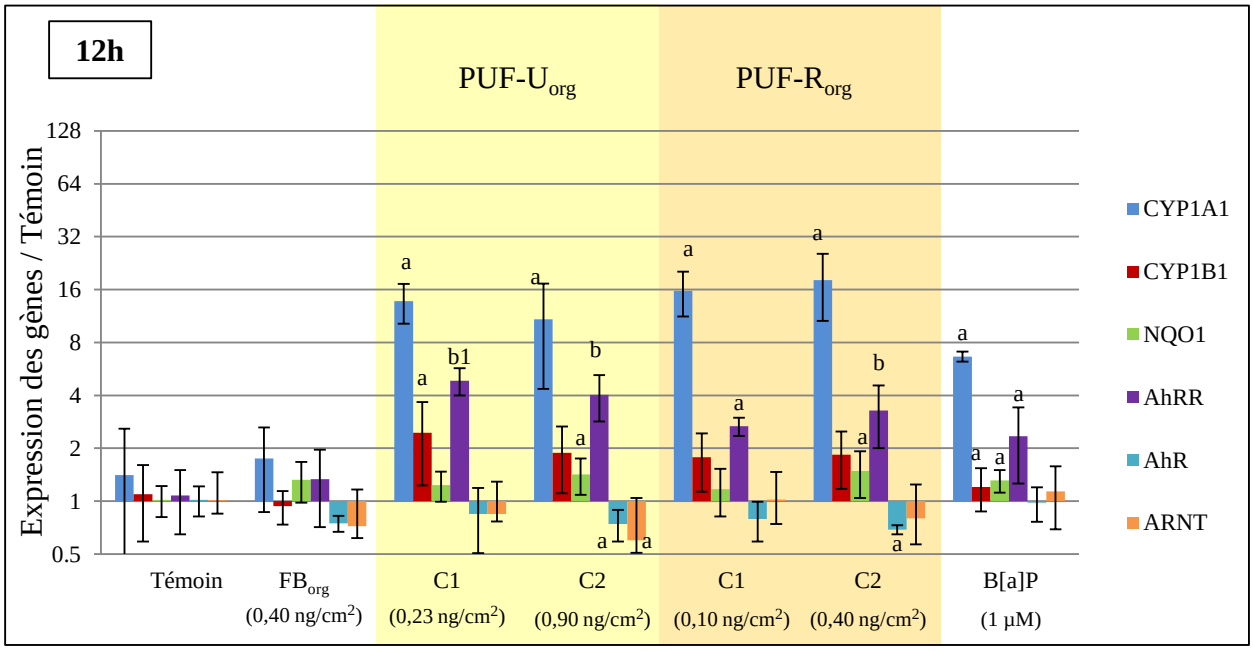


Figure IV-18 : Expression génique des enzymes du métabolisme des composés organiques (*CYP1A1*, *CYP1B1* et NQO1), de leur récepteur et leur translocateur cellulaires (AhR et ARNT) et du répresseur d'AhR (AhRR) dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 12 h aux extraits organiques de PUF (PUF$_{org}$) collectées en milieux urbain (C1 = 0,23 ng/cm^2 et C2 = 0,9 ng/cm^2) et rural (C1 = 0,1 ng/cm^2 et C2 = 0,4 ng/cm^2), au filtre blanc (FB$_{org}$; 0,4 ng/cm^2) et au témoin positif (B[a]P, 1 µM).

Les résultats sont décrits par les moyennes et les écarts types de 8 réplicats (témoins) et de 4 réplicats (cellules exposées). [Test U de Mann-Whitney ; *vs* témoins (a : p<0,05 ; b : p<0,01 ; c : p<0,001) ; *vs* doses pour un même site (* : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001) ; *vs* sites d'échantillonnage pour une même dose (1 : p<0,05 ; 2 : p<0,01 ; 3 : p<0,001)].

2.2.2. Echantillons composites de PUF$_{aq}$

Comme dans le cas des échantillons composites de PUF$_{org}$, la solution de FB$_{aq}$ n'a induit aucune modification significative de l'expression quelque soit le gène étudié suite à l'exposition des cellules BEAS-2B à une concentration équivalente à 12 µg/cm^2, et ce quelque soit le temps d'exposition considéré (Tableau IV-10). Par conséquent, toute induction significative de l'expression génique par les échantillons composites de PUF$_{aq}$ sera due aux particules.

Aucune induction significative de la transcription des ARNm d'AhR, d'ARNT et de la NQO1 n'a été observée dans les cellules exposées aux échantillons composites de PUF$_{aq}$, pour les deux concentrations étudiées (C1 = 3 µg/cm^2 et C2 = 12 µg/cm^2). L'expression d'AhR et d'ARNT tend à être réprimée surtout après 48 h d'exposition (Tableau IV-10).

Tableau IV-10 : Expression génique des enzymes du métabolisme (*CYP1A1*, *CYP1B1* et NQO1), de leur récepteur et leur translocateur cellulaires (AhR et ARNT) et du répresseur d'AhR (AhRR) dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 24, 48 et 72 h aux composites de PUF récupérées dans l'eau (sites urbain et rural). Les résultats sont décrits par les moyennes et les écarts types de 8 réplicats (témoins) et de 4 réplicats (cellules exposées). [Test U de Mann-Whitney ; *vs* témoins (a : $p<0,05$; b : $p<0,01$; c : $p<0,001$) ; *vs* doses pour un même site (* : $p<0,05$; ** : $p<0,01$; *** : $p<0,001$) ; *vs* sites d'échantillonnage pour une même dose (1 : $p<0,05$; 2 : $p<0,01$; 3 : $p<0,001$)].

		FB_{aq}	B[a]P (µM)	$PUF\text{-}U_{aq}$ (µg/cm^2)		$PUF\text{-}R_{aq}$ (µg/cm^2)	
	Témoin	***C = 12,00***	***C = 1,00***	***C1 = 3,00***	***C2 = 12,00***	***C1 = 3,00***	***C2 = 12,00***
CYP1A1							
24h	1,02 (±0,23)	1,20 (±0,30)	4,79 (±1,50)^{a}	4,15 (±1,36)^{a}	9,41 (±1,62)^{a*}	3,05 (±1,16)^{a}	9,52 (±3,07)^{a*}
48h	1,31 (±0,86)	0,98 (±0,21)	4,32 (±1,01)^{a}	1,76 (±0,53)	9,07 (±2,52)^{a}	3,46 (±1,36)^{a}	7,32 (±1,97)^{a*}
72h	1,01 (±0,18)	0,55 (±0,07)^{a}	6,37 (±2,07)^{a}	1,76 (±0,25)	2,12 (±0,51)	1,01 (±0,32)	2,87 (±0,98)
CYP1B1							
24h	1,05 (±0,37)	0,85 (±0,09)	1,62 (±0,55)	1,52 (±0,43)	1,54 (±0,15)^{a}	1,76 (±0,33)^{a}	1,51 (±0,07)
48h	1,00 (±0,10)	0,97 (±0,09)	1,86 (±0,62)^{b}	1,37 (±0,15)^{b}	1,98 (±0,20)^{b*}	1,34 (±0,14)^{a}	1,98 (±0,26)^{b*}
72h	1,03 (±0,29)	1,04 (±0,21)	1,96 (±0,17)^{b}	1,63 (±0,35)^{a}	2,22 (±0,39)^{b*}	1,82 (±0,45)^{a}	2,55 (±0,35)^{b}
NQO1							
24h	1,01 (±0,13)	0,87 (±0,06)	1,18 (±0,14)	0,88 (±0,11)	1,07 (±0,27)	0,91 (±0,12)	0,76 (±0,09)
48h	1,04 (±0,30)	0,97 (±0,20)	1,43 (±0,37)	0,88 (±0,24)	1,08 (±0,24)	0,84 (±0,33)	0,83 (±0,11)
72h	1,04 (±0,32)	0,82 (±0,03)	1,58 (±0,04)	1,23 (±0,37)	1,26 (±0,57)	1,19 (±0,39)	1,55 (±0,66)
AhRR							
24h	1,03 (±0,31)	0,82 (±0,24)	2,58 (±0,87)^{a}	1,24 (±0,24)	1,46 (±0,09)	0,52 (±0,02)^{a}	1,11 (±0,47)
48h	1,06 (±0,40)	0,83 (±0,41)	2,92 (±1,28)^{a}	1,28 (±0,54)	1,78 (±0,46)^{a}	0,97 (±0,17)	1,91 (±0,42)^{a*}
72h	1,03 (±0,31)	0,79 (±0,08)	4,33 (±0,65)^{a}	2,09 (±0,88)	3,20 (±0,63)^{a}	1,86 (±0,86)	3,00 (±0,45)^{a}
AhR							
24h	1,04 (±0,29)	0,87 (±0,12)	0,83 (±0,09)	1,12 (±0,28)	1,16 (±0,35)	1,08 (±0,19)	0,86 (±0,24)^{a}
48h	1,02 (±0,23)	1,03 (±0,06)	0,77 (±0,09)	1,06 (±0,28)	1,05 (±0,04)	1,03 (±0,26)	0,91 (±0,18)
72h	1,02 (±0,25)	1,47 (±0,33)^{a}	1,04 (±0,20)	1,16 (±0,19)	1,03 (±0,29)	1,18 (±0,16)	1,39 (±0,49)
ARNT							
24h	1,05 (±0,35)	0,91 (±0,22)	1,11 (±0,32)	0,88 (±0,28)	0,89 (±0,24)	1,10 (±0,38)	0,57 (±0,15)^{a}
48h	1,06 (±0,38)	0,85 (±0,21)	0,75 (±0,25)	0,70 (±0,23)	0,70 (±0,14)	0,68 (±0,11)	0,67 (±0,17)^{a}
72h	1,03 (±0,30)	1,39 (±0,61)	1,24 (±0,13)	1,09 (±0,32)	0,81 (±0,18)	1,11 (±0,45)	1,29 (±0,21)

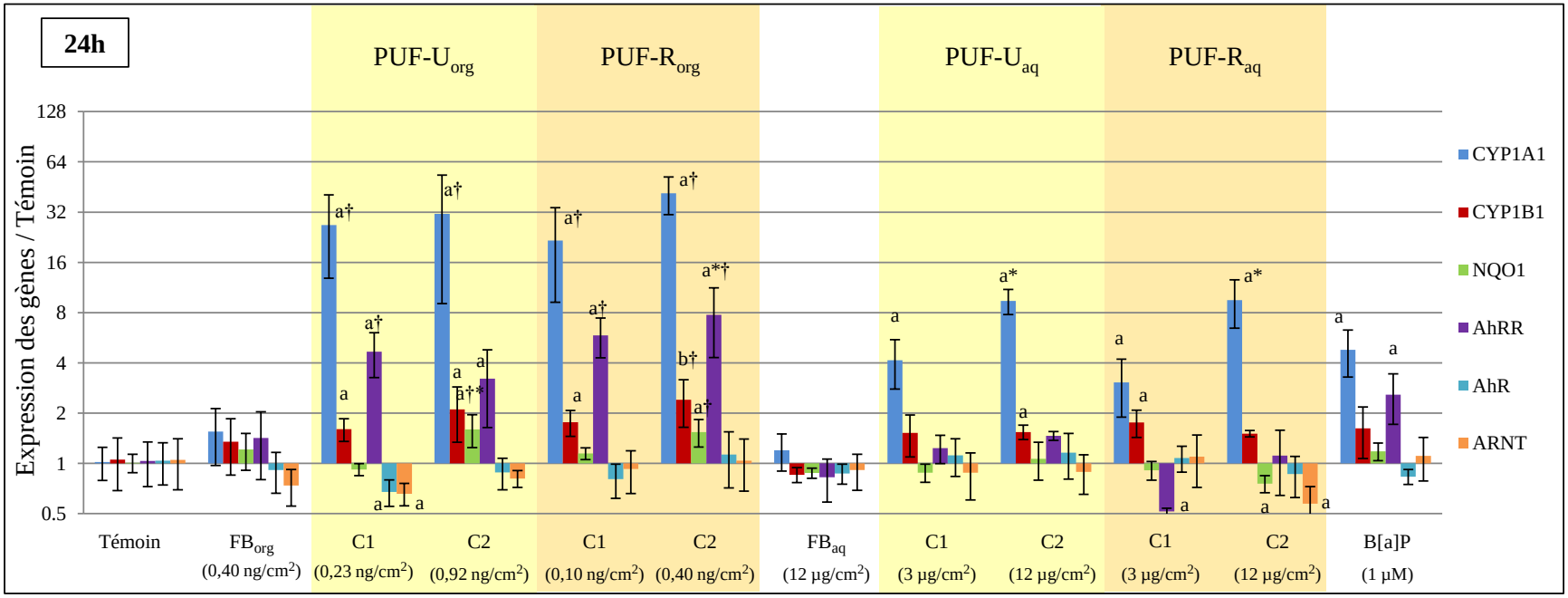


Figure IV-19 : Expression génique des enzymes du métabolisme des composés organiques (*CYP1A1*, *CYP1B1* et NQO1), de leur récepteur et leur translocateur cellulaires (AhR et ARNT) et du répresseur d'AhR (AhRR) dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 24 h aux échantillons composites de PUF récupérées dans l'eau (PUF-aq ; C1 = 3 µg/cm^2 et C2 = 12 µg/cm^2), aux extraits organiques de PUF (PUF$_{org}$) collectées en milieux urbain (C1 = 0,23 ng/cm^2 et C2 = 0,9 ng/cm^2) et rural (C1 = 0,1 ng/cm^2 et C2 = 0,4 ng/cm^2), aux filtres blancs (FB$_{aq}$; 12 µg/cm^2 et FB$_{org}$; 0,4 ng/cm^2) et au témoin positif (B[a]P, 1 µM).

Les résultats sont décrits par les moyennes et les écarts types de 8 réplicats (témoins) et de 4 réplicats (cellules exposées). [Test U de Mann-Whitney ; *vs* témoins (a : $p<0,05$; b : $p<0,01$; c : $p<0,001$) ; *vs* doses pour un même site (* : $p<0,05$; ** : $p<0,01$; *** : $P<0,001$) ; *vs* sites d'échantillonnage pour une même dose (1 : $p<0,05$; 2 : $p<0,01$; 3 : $p<0,001$) ; *vs* type de composite pour un même site († : $p<0,05$; †† : $p<0,01$; ††† : $p<0,001$)].

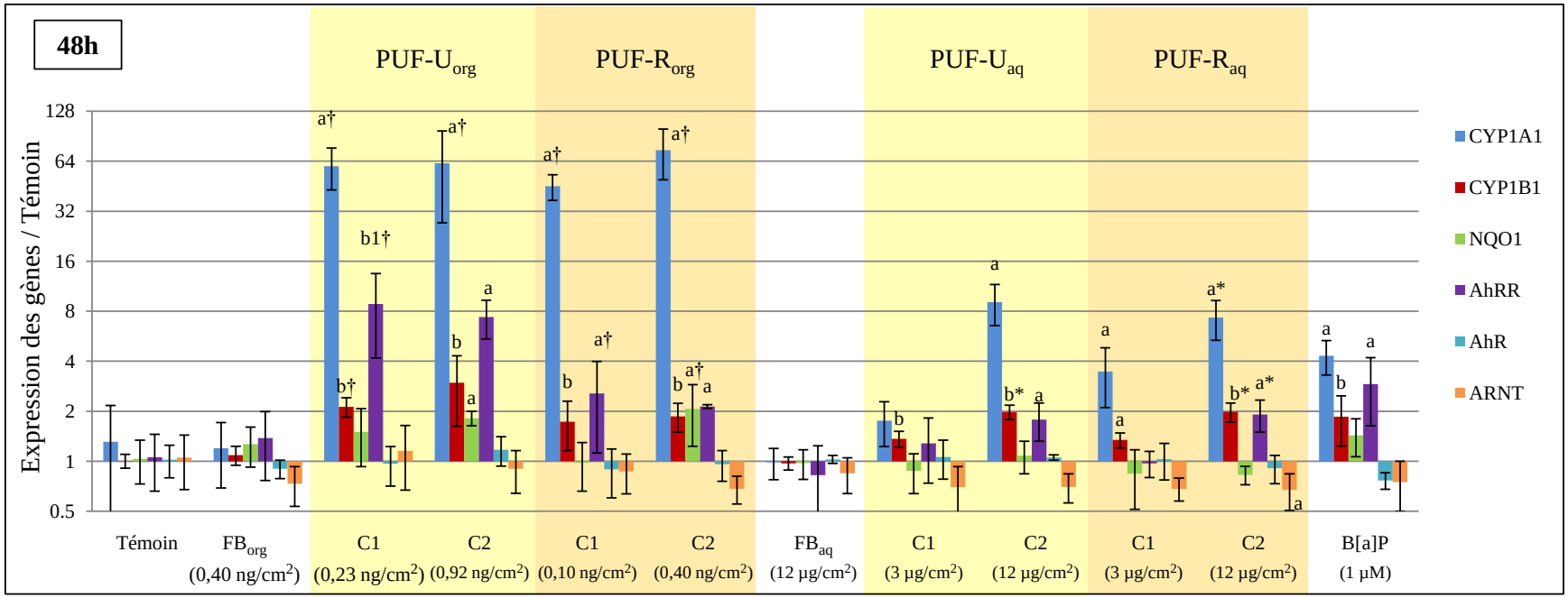


Figure IV-20 : Expression génique des enzymes du métabolisme des composés organiques (*CYP1A1*, *CYP1B1* et NQO1), de leur récepteur et leur translocateur cellulaires (AhR et ARNT) et du répresseur d'AhR (AhRR) dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 48 h aux échantillons composites de PUF récupérées dans l'eau (PUF-aq ; C1 = 3 µg/cm^2 et C2 = 12 µg/cm^2), aux extraits organiques de PUF (PUF$_{org}$) collectées en milieux urbain (C1 = 0,23 ng/cm^2 et C2 = 0,9 ng/cm^2) et rural (C1 = 0,1 ng/cm^2 et C2 = 0,4 ng/cm^2), aux filtres blancs (FB$_{aq}$; 12 µg/cm^2 et FB$_{org}$; 0,4 ng/cm^2) et au témoin positif (B[a]P, 1 µM).

Les résultats sont décrits par les moyennes et les écarts types de 8 réplicats (témoins) et de 4 réplicats (cellules exposées). [Test U de Mann-Whitney ; *vs* témoins (a : p<0,05 ; b : p<0,01 ; c : p<0,001) ; *vs* doses pour un même site (* : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001) ; *vs* sites d'échantillonnage pour une même dose (1 : p<0,05 ; 2 : p<0,01 ; 3 : p<0,001) ; *vs* type de composite pour un même site († : p<0,05 ; †† : p<0,01 ; ††† : p<0,001)].

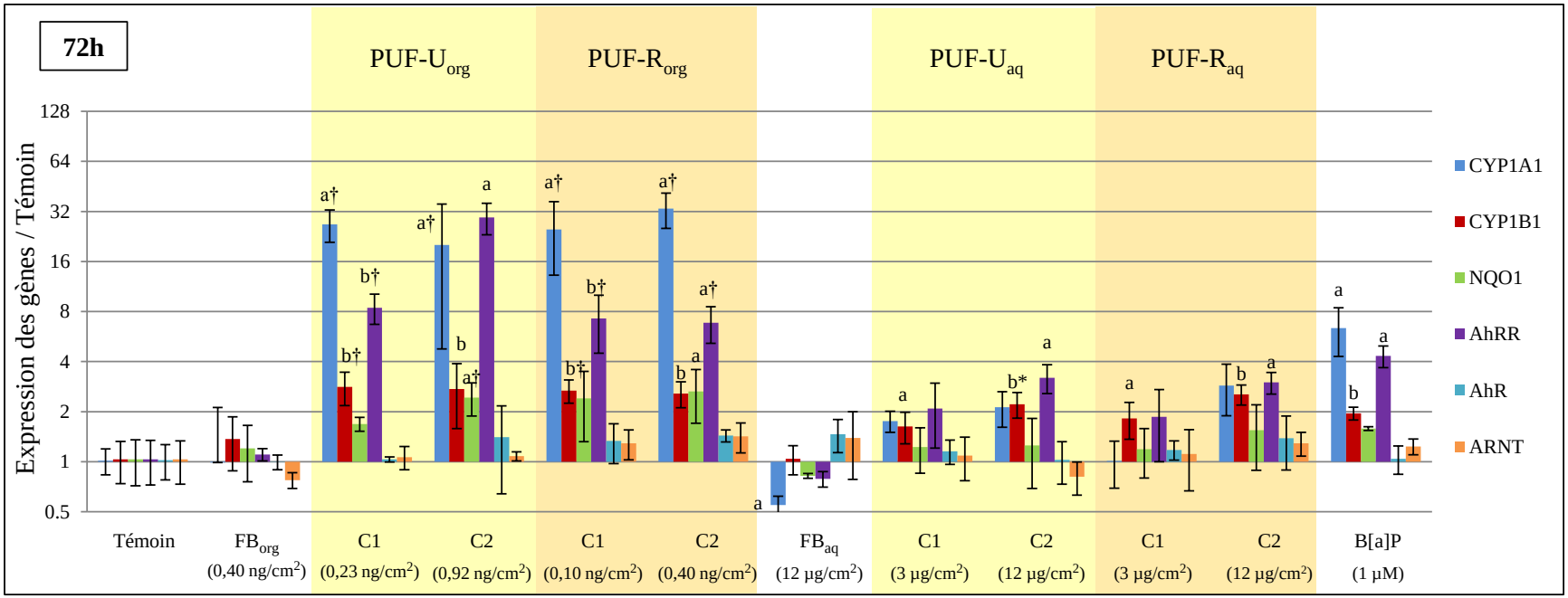


Figure IV-21 : Expression génique des enzymes du métabolisme des composés organiques (*CYP1A1*, *CYP1B1* et NQO1), de leur récepteur et leur translocateur cellulaires (AhR et ARNT) et du répresseur d'AhR (AhRR) dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 72 h aux échantillons composites de PUF récupérées dans l'eau (PUF-aq ; C1 = 3 µg/cm^2 et C2 = 12 µg/cm^2), aux extraits organiques de PUF (PUF$_{org}$) collectées en milieux urbain (C1 = 0,23 ng/cm^2 et C2 = 0,9 ng/cm^2) et rural (C1 = 0,1 ng/cm^2 et C2 = 0,4 ng/cm^2), aux filtres blancs (FB$_{aq}$; 12 µg/cm^2 et FB$_{org}$; 0,4 ng/cm^2)et au témoin positif (B[a]P, 1 µM).

Les résultats sont décrits par les moyennes et les écarts types de 8 réplicats (témoins) et de 4 réplicats (cellules exposées). [Test U de Mann-Whitney ; *vs* témoins (a : p<0,05 ; b : p<0,01 ; c : p<0,001) ; *vs* doses pour un même site (* : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001) ; *vs* sites d'échantillonnage pour une même dose (1 : p<0,05 ; 2 : p<0,01 ; 3 : p<0,001) ; *vs* type de composite pour un même site († : p<0,05 ; †† : p<0,01 ; ††† : p<0,001)].

D'autre part, l'expression des *CYP1A1* et *CYP1B1* a été significativement augmentée dans les cellules BEAS-2B suite à leur exposition pendant 24, 48 et 72 h aux différentes concentrations de PUF-U_{aq} et de PUF-R_{aq} à l'exception de PUF-U_{aq} C1 (48 et 72 h) pour *CYP1A1* et de PUF-U_{aq} C1 (24h) pour *CYP1B1*. Par contre, l'expression d'AhRR a été significativement induite seulement suite à l'exposition des cellules aux PUF-U_{aq} C2 et PUF-R_{aq} C2 pendant 48 et 72 h d'exposition (Figures IV-19 à IV-21). Contrairement à ce qui a été observé pour les PUF_{org}, une relation dose/réponse a été observée dans l'induction de l'expression de *CYP1A1*, *CYP1B1* et AhRR surtout pour les temps 24 et 48h (une expression plus élevée des gènes a été remarquée pour la concentration C2 des PUF-U_{aq} et PUF-R_{aq}) (Figures IV-19 à IV-21). De plus, une augmentation de l'expression d'AhRR avec le temps d'exposition a été remarquée suite à l'exposition des cellules aux différentes concentrations de PUF_{aq}.

Par ailleurs, une comparaison entre les résultats des échantillons composites de PUF_{aq} et de PUF_{org} a été réalisée et a montré une différence significative entre l'expression génique induite par les PUF_{aq} et celle induite par des concentrations équivalentes en HAP des PUF_{org} pour les gènes de *CYP1A1*, *CYP1B1*, NQO1 et AhRR (Figures IV-19 à IV-21) (les niveaux les plus élevés ont été observés pour les PUF_{org}). Quant au témoin positif, l'expression de C*YP1A1*, *CYP1B1* et AhRR dans les cellules BEAS-2B a été induite significativement à partir de 6 h d'exposition à 1 µM de B[a]P et de NQO1 pour 12 h d'exposition.

Les résultats de l'activation métabolique des échantillons composites de PUF (PUF_{org} et PUF_{aq}) sont résumés dans le paragraphe ci-dessous :

- L'expression des ARNm d'AhR et d'ARNT n'est pas induite dans les cellules BEAS-2B suite à leur exposition aux échantillons composites de PUF_{aq} (C1 et C2) et aux concentrations équivalentes en HAP (PUF_{org}) pour les deux sites d'échantillonnage et pour tous les temps d'exposition.
- Les niveaux d'expression des ARNm de CYP1A1, CYP1B1, AhRR et NQO1 dans les cellules BEAS-2B exposées aux échantillons composites de PUF_{org} ont été significativement plus élevés que ceux obtenus par les échantillons composites de PUF_{aq}.
- Une expression dose-dépendante (effet C2 > effet C1) des gènes de *CYP1A1*, *CYP1B1* et AhRR a été remarquée pour les échantillons composites de PUF_{aq} ce qui n'est pas le cas des échantillons composites de PUF_{org}.

2.3. Discussion

Pour l'ensemble des conditions d'exposition (échantillons composites de PF, PUF_{aq} et PUF_{org} pour les deux sites urbain et rural), et comme cela a déjà été mis en évidence dans d'autres études (Gualtieri *et al.,* 2011 ; Ovrevik *et al.,* 2010), l'expression des ARNm d'AhR et d'ARNT n'ont montré aucune induction significative dans les cellules BEAS-2B. En effet, leur expression à tendance à être réprimée par les échantillons composites de particules fines et ultrafines ainsi que par le B[a]P (témoin positif).

Les gènes du répresseur d'AhR (AhRR) et des enzymes de la phase I du métabolisme (CYP1A1 et CYP1B1), responsables de la formation des intermédiaires toxiques des HAP, ont été induits de façon dose dépendante par les PF. L'AhRR est capable de contrôler l'activité d'AhR par un rétrocontrôle négatif en inhibant son propre inducteur (AhR). L'AhRR se fixe sur ARNT à la place d'AhR. Le complexe AhRR/ARNT ainsi formé entre en compétition avec le complexe AhR/ARNT pour la fixation sur les régions XRE des gènes régulés par AhR (Haarmann-Stemmann et Abel, 2006 ; Mimura *et al.,* 1999). Des études récentes ont montrées que la compétition entre AhR et AhRR pour la fixation sur XRE n'est pas le seul mécanisme de répression mis en jeu (Evans *et al.,* 2008 ; Haarmann-Stemmann *et al.,* 2007 ; Mathews *et al.,* 2013) et des études supplémentaires sont nécessaires pour élucider ce mécanisme.

Concernant les échantillons composites de PUF, les extraits des composés organiques (PUF_{org}) ont provoqué une induction significative de l'expression des gènes d'AhRR, *CYP1A1* et *CYP1B1* indépendamment de la concentration utilisée. En outre une relation dose/réponse a été observée dans l'induction de l'expression de ces gènes par les composites de PUF_{aq} surtout pour les temps 24 et 48h. Malgré le fait que les concentrations des extraits organiques de PUF, correspondent à l'équivalent en HAP des concentrations de PUF_{aq}, une induction plus significative de l'expression des gènes a été remarquée pour les PUF_{org}, probablement dû à l'état solubilisé des composés organiques qui y sont donc plus biodisponibles.

A la même concentration, l'échantillon composite de PF-U a provoqué une induction des gènes d'AhRR, *CYP1A1* et *CYP1B1* plus élevée que celle provoquée par l'échantillon composite de PF-R. Alors qu'aucune différence entre les deux sites d'échantillonnage n'a été observée pour les échantillons composites de PUF. Les résultats de PF sont en accord avec l'analyse chimique des composites. En effet, l'échantillon composite de PF-U est plus riche en composés organiques

que celui de PF-R, ce dernier ayant une concentration totale en HAP cinq fois inférieure à celle de PF-U, ce qui peut donc expliquer cette augmentation dans l'expression des gènes dans le cas de PF-U. Ceci permet de mettre en évidence une toxicité plus élevée des PF-U, par leur potentialité à induire la formation d'une plus grande quantité des produits mutagènes et cancérigènes. A noter qu'une influence des émissions de diesel et d'essence sur la composition des HAP des particules atmosphériques a été mise en évidence pour les deux sites d'échantillonnage avec une moindre influence de l'essence concernant le site rural. Ceci met en évidence la contribution importante du trafic routier à la toxicité des aérosols atmosphériques, surtout d'origine urbaine.

Par ailleurs, l'expression de la NQO1 n'a pas été induite ni par les PUF_{aq} ni par les PF hormis pour les cellules BEAS-2B exposées pendant 48 h à la plus grande concentration de PF-U (C2 = 12µg/cm^2) uniquement. Cette enzyme a pour rôle la détoxification des HAP *o*-quinones qui sont formés durant la biotransformation des HAP, et qui sont capables de former des adduits à l'ADN (Penning, 1996). Cette induction retardée de NQO1 avec un niveau d'expression inférieur à celui de CYP1A1 (Brauze, 2004) peut être expliquée par le fait que l'expression de la NQO1, ainsi que celle des autres enzymes de la phase II du métabolisme, est également contrôlée par l'intermédiaire du facteur de transcription Nrf2 (Brauze et *al.*, 2006 ; Talalay *et al.*, 2003 ; Tarantini, 2009). Ce dernier est activé par les métabolites électrophiles obtenus suite à la biotransformation des HAP par les enzymes de la phase I (Burczynski et Penning, 2000). Le lien entre la batterie de gènes AhR et Nrf2 peut s'expliquer par le fait que Nrf2 est un gène cible d'AhR (Miao *et al.*, 2005). Quant aux PUF_{org}, une induction précoce de l'expression de la NQO1 a été observée avec des niveaux d'expression plus élevés que celui obtenu par les PF-U, mais qui restent toujours inférieurs aux niveaux d'expression du CYP1A1. Cette induction précoce peut être due au fait que les composés organiques dans les échantillons composites de PUF_{org} sont libres en solution et donc sont plus biodisponibles que les composés organiques adsorbés à la surface des particules et pourraient donc être métabolisés plus rapidement, formant ainsi une grande quantité de métabolites électrophiles capables d'induire significativement l'expression de la NQO1 plus précocement.

Pour la suite de notre étude, les résultats seront présentés uniquement pour les échantillons composites de particules fines (PF-U et PF-R).

3. Expression génique des miARNs

Expression génique des miARNs Par la suite, nous avons évalué les modifications épigénétiques en réponse aux PF, pour leur implication potentielle dans la cancérogenèse broncho-pulmonaire. En effet, nous avons évalué la modification de l'expression génique de trois miARNs (miR-21, miR-26b et miR-27a) dans les cellules BEAS-2B par PCR en temps réel suite à l'exposition de ces cellules pendant 24, 48 et 72 h aux échantillons composites de particules fines collectées en milieux urbain et rural (PF-U et PF-R) aux concentrations C1 (3 µg/cm^2) et C2 (12 µg/cm^2), et aux particules de TiO_2 (12 µg/cm^2) comme témoins particulaires. Les résultats, normalisés par rapport au témoin, sont regroupés dans le Tableau IV-11 et illustrés dans la Figure IV-22.

D'après la Figure IV-22, aucune induction significative de l'expression des miR-21, miR-26b et miR-27a n'a été observée suite à l'exposition des cellules BEAS-2B à 12 µg/cm^2 du témoin particulaire (TiO_2), et ce pour les 3 temps d'exposition.

Tableau IV-11 : Expression génique des miARNs (miR-21, miR-26b et miR-27a) dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 24, 48 et 72 h aux échantillons composites de particules fines collectées en milieux urbain et rural (C1 = 3 µg/cm^2 et C2 = 12 µg/cm^2) et au TiO_2 (12 µg/cm^2).
Les résultats sont décrits par les moyennes et les écarts types de 8 réplicats (témoins) et de 4 réplicats (cellules exposées). [Test U de Mann-Whitney ; *vs* témoins (a : p<0,05 ; b : p<0,01 ; c : p<0,001) ; *vs* doses pour un même site (* : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001) ; *vs* sites d'échantillonnage pour une même dose (1 : p<0,05 ; 2 : p<0,01 ; 3 : p<0,001)].

		TiO_2 (µg/cm^2)	PF-U (µg/cm^2)		PF-R (µg/cm^2)	
	Témoin	***C = 12,00***	***C1 = 3,00***	***C2 = 12,00***	***C1 = 3,00***	***C2 = 12,00***
miR-21						
24h	1,02 (±0,18)	1,16 (±0,16)	1,83 (±0,32)^{b1}	2,65 (±0,28)^{b}	0,87 (±0,19)	2,50 (±0,58)^{b*}
48h	1,01 (±0,13)	1,20 (±0,30)	1,62 (±0,23)^{b}	5,72 (±0,63)^{b*1}	1,31 (±0,30)^{a}	3,74 (±0,40)^{b*}
72h	1,05 (±0,36)	0,90 (±0,15)	1,42 (±0,17)^{a}	3,87 (±0,51)^{b*1}	1,41 (±0,29)^{a}	1,97 (±0,49)^{b}
miR-26b						
24h	1,02 (±0,21)	1,12 (±0,30)	1,33 (±0,15)	1,22 (±0,26)	0,94 (±0,32)	1,19 (±0,28)
48h	1,02 (±0,22)	0,81 (±0,21)	0,94 (±0,22)	1,51 (±0,22)^{a}	0,78 (±0,23)	1,15 (±0,18)
72h	1,05 (±0,34)	0,72 (±0,08)	0,77 (±0,13)	1,07 (±0,36)	1,13 (±0,27)	0,78 (±0,36)
miR-27a						
24h	1,04 (±0,33)	1,03 (±0,25)	1,00 (±0,10)	0,89 (±0,24)	1,28 (±0,53)	1,11 (±0,36)
48h	1,03 (±0,25)	0,88 (±0,43)	0,90 (±0,26)	1,02 (±0,19)	0,80 (±0,18)	0,96 (±0,26)
72h	1,05 (±0,35)	0,71 (±0,02)^{a}	0,78 (±0,06)	0,95 (±0,27)	1,20 (±0,22)	0,76 (±0,21)

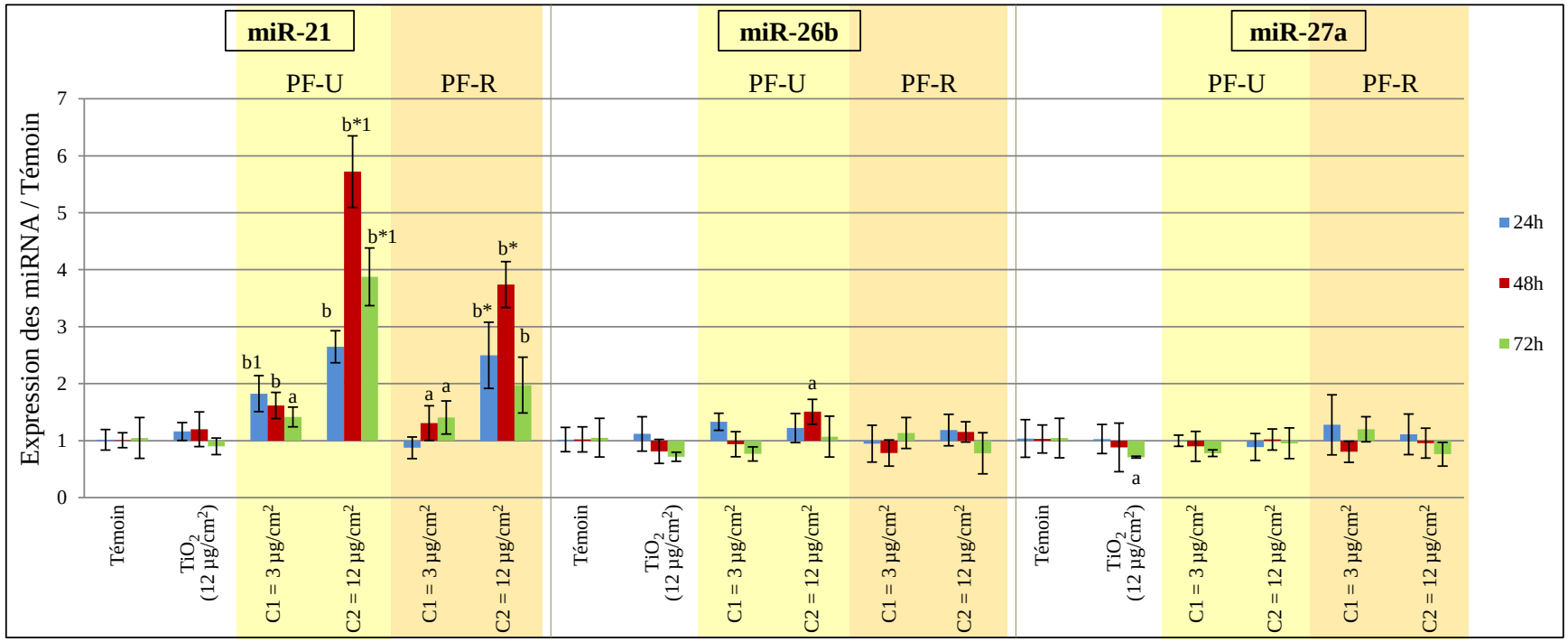


Figure IV-22 : Expression génique des miARNs (miR-21, miR-26b et miR-27a) dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 24, 48 et 72 h aux échantillons composites de particules fines collectées en milieux urbain et rural (C1 = 3 µg/cm^2 et C2 = 12 µg/cm^2) et au TiO_2 (12 µg/cm^2).

Les résultats sont décrits par les moyennes et les écarts types de 8 réplicats (témoins) et de 4 réplicats (cellules exposées). [Test U de Mann-Whitney ; *vs* témoins (a : p<0,05 ; b : p<0,01 ; c : p<0,001) ; *vs* doses pour un même site (* : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001) ; *vs* sites d'échantillonnage pour une même dose (1 : p<0,05 ; 2 : p<0,01 ; 3 : p<0,001)].

L'expression du miR-21 a été significativement induite dans les cellules BEAS-2B après exposition aux deux concentrations des échantillons composites de PF-U et de PF-R pour les trois temps d'exposition, à l'exception de PF-R à la concentration C1 (3 µg/cm^2) pendant 24h (Figure IV-22). Nous pouvons constater que l'induction de l'expression du miR-21 par les échantillons composites de PF est dépendante de la dose. En effet, à la concentration la plus élevée des échantillons composites de PF-U et de PF-R (C2 = 12 µg/cm^2), le niveau d'expression du miR-21 a été environ 3 fois plus élevé que celui obtenu à la plus petite concentration (C1 = 3 µg/cm^2) après 48 et 72 h d'exposition au PF-U et après 24 et 48 h d'exposition au PF-R (Tableau IV-11). D'autre part, à la même concentration, une induction site-dépendante de l'expression du miR-21 a été observée : l'expression du miR-21 induite par l'échantillon composite de PF-U est significativement supérieure à celle induite par l'échantillon composite de PF-R à la C1 (3 µg/cm^2) pour 24 h d'exposition et à la C2 (12 µg/cm^2) pour 48 et 72 h d'exposition montrant ainsi une toxicité plus élevée des PF-U (Figure IV-22).

Concernant les miARNs miR-26b et miR-27a, aucune induction significative de leur expression n'a été observée dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 24, 48 et 72 h aux deux concentrations de PF-U ou de PF-R. A l'exception du PF-U qui a provoqué une légère induction significative de l'expression du miR-26b après 48h d'exposition à la plus grande concentration (C2 = 12 µg/cm^2) (Figure IV-22). L'expression de ces miARNs a même parfois tendance à être réduite sans avoir une répression significative.

3.1. Discussion

Récemment, des recherches ont émergé suggérant que les changements de l'expression de certains miARNs peuvent être impliqués dans les réponses physiopathologiques dues aux polluants atmosphériques. Jusqu'à présent, très peu d'études ont mis en évidence l'impact de la pollution atmosphérique sur les profils d'expression des miARNs dans le système pulmonaire chez l'Homme (jardim, 2011).

En effet, miR-21 est le miARN oncogène « oncomiR » le plus abondant, jouant un rôle fonctionnel important dans plusieurs types de cancers (Asangani *et al.*, 2008 ; Corsten *et al.*, 2007 ; Ribas *et al.*, 2009 ; Wang *et al.*, 2009) y compris le cancer pulmonaire (Liu *et al.*, 2011 ; Seike *et al.*, 2009). Des travaux antérieurs ont révélé que miR-21 favorise la croissance cellulaire

et augmente l'invasion tumorale et les métastases dans le cancer de poumon (Zhang *et al.,* 2010 ; Zhu S *et al.,* 2008) en réduisant l'expression d'un ensemble spécifique de gènes cibles dont la plupart sont des suppresseurs de tumeurs. D'autres études ont montré également que la surexpression de miR-21 module le nombre, la fréquence et/ou la taille des tumeurs pulmonaires chez la souris (Frezzetti *et al.,* 2011 ; Hatley *et al.,* 2010).

De plus, il a été montré que l'expression du miR-21 augmente suite à la stimulation de cardiomyocytes par le peroxyde d'hydrogène et qu'il participe aux réponses protectrices coordonnés au stress oxydatif (Cheng *et al.,* 2009). Il est également impliqué dans les réponses inflammatoires, comme suggéré par le modèle animal d'allergie des voies respiratoires, montrant que le miR-21 module l'expression de l'interleukine-12 (IL-12) (Lu *et al.,* 2009) et qu'il est induit dans la réponse immunitaire innée de poumons de souris exposés à du lipopolysaccharide (LPS) en aérosol (Moschos *et al.,* 2007). De plus, Bollati et collaborateurs ont montré que miR-21 surexprimé dans les leucocytes du sang périphérique d'ouvriers d'une aciérie exposés à la matière particulaire, est associé au stress oxydant via la mesure de la 8-hydroxydeoxyguanine (8-OH-dG) dans l'ADN sanguin (Bollati *et al.,* 2010).

Ceci nous permet de mettre en évidence la toxicité de nos particules fines, notamment celles d'origine urbaine, par leur capacité à induire l'expression de l'oncogène miR-21 dans les cellules BEAS-2B. Le mécanisme par lequel les particules ont provoqué cette induction, ainsi que la ou les cible(s) potentiel(s) du miR-21 demeurent cependant encore inconnues. Par conséquent, des études supplémentaires sont indispensables afin de mieux comprendre le mode d'action de l'oncogène miR-21 dans les cellules BEAS-2B suite à leur exposition aux particules atmosphériques.

D'autre part, d'après la littérature, le miARN miR-26b est réprimé dans les cellules épithéliales bronchiques humaines exposées aux particules d'échappement diesel (Jardim *et al.,* 2009), dans les poumons des rats exposés aux fumées de cigarettes (Izotti *et al.,* 2009) ainsi que dans les cellules humaines cancéreuses du sein (Li *et al.,* 2013 ; Liu *et al.,* 2011). Cependant, une surexpression de miR-26b a été observée dans un environnement hypoxique favorisant ainsi le développement d'un cancer en inhibant le signal pro-apoptotique (Kulshreshtha *et al.,* 2007).

Concernant le miR-27a, alors qu'il a été montré comme étant réprimé dans les cellules épithéliales bronchiques humaines exposées aux particules d'échappement diesel (Jardim *et al.,*

2009), une surexpression a été mise en évidence dans le cancer pancréatique, favorisant le comportement maligne des cellules cancéreuses (Ma *et al.,* 2010). D'autre part, miR-27a est réprimé dans le carcinome hépatique humain aboutissant à une augmentation du niveau de la P-glycoprotéine. Cette dernière confie aux cellules cancéreuses la résistance aux substances chimiothérapiques (Chen *et al.,* 2013). Une contradiction a été remarquée dans le travail de Zhu et collaborateurs où une surexpression du miR-27a a abouti à l'activation de la P-glycoprotéine par inhibition de son suppresseur dans des lignées cellulaires humaines du carcinome du col utérin et du cancer ovarien (Zhu H *et al.,* 2008).

Les rôles des miR-26b et miR-27a ainsi que leurs cibles potentielles, surtout dans les cellules pulmonaires sont encore mal élucidés. Leur expression varie selon le type de cellules et pourrait avoir des contributions différentes quant à la survenue de certaines pathologies ou du cancer. Dans notre étude, les niveaux d'expression de ces miARNs n'ont, de manière générale, pas montré de différences significatives par rapport au témoin. Malgré l'avancement réalisé dans la recherche des miARNs et la détermination de leurs cibles et de leurs mécanismes de régulation, des lacunes persistent toujours surtout dans le domaine de la pollution de l'air et des études supplémentaires s'avèrent indispensables afin d'élucider les mécanismes mis en jeu.

4. Activité de la télomérase

Nous avons ensuite étudié la génotoxicité des PF induite par un mécanisme indirect pouvant aboutir soit à l'instabilité génomique soit à l'immortalisation cellulaire, tel que la modification de l'activité de la télomérase. Cette activité a été déterminée, dans notre étude, dans les cellules BEAS-2B après exposition aux échantillons composites de particules fines collectées en milieux urbain (PF-U) et rural (PF-R) selon une cinétique de 24, 48 et 72h. Le TiO_2 (12 µg/cm^2) a été utilisé comme témoin particulaire. Le Tableau IV-12 regroupe les résultats de l'activité de la télomérase rapportés à ceux du témoin. Une représentation graphique de ces résultats est illustrée dans la Figure IV-23.

Dans notre étude, l'exposition des cellules BEAS-2B aux échantillons composites de particules fines (PF-U et PF-R), a abouti à une induction de l'activité de la télomérase après 48 et 72 h d'exposition à la C2 = 12 µg/cm^2 de PF-U avec un effet plus prononcé à 72 h. De plus, une activation de la télomérase a été aussi observée dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 72

h à la C1 = 3 µg/cm^2 de PF-R. Par contre, le témoin particulaire (TiO_2, 12 µg/cm^2) n'a présenté aucun effet sur l'activité de la télomérase dans les cellules BEAS-2B (Figure IV-23).

Tableau IV-12 : Activité de la télomérase rapportée à celle du témoin dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 24, 48 et 72 h aux échantillons composites de particules fines collectées en milieux urbain et rural (C1 = 3 µg/cm^2 et C2 = 12 µg/cm^2) et au TiO_2 (12 µg/cm^2).
Les résultats sont décrits par les moyennes et les écarts types de 8 réplicats (témoins) et de 4 réplicats (cellules exposées). [Test U de Mann-Whitney ; *vs* témoins (a : p<0,05 ; b : p<0,01 ; c : p<0,001)].

		TiO_2 (µg/cm^2)	PF-U (µg/cm^2)		PF-R (µg/cm^2)	
	Témoin	***C = 12,00***	***C1 = 3,00***	***C2 = 12,00***	***C1 = 3,00***	***C2 = 12,00***
Activité de la télomérase						
24h	1,00 (±0,05)	0,79 (±0,08)	1,03 (±0,16)	1,07 (±0,17)	1,02 (±0,12)	1,01 (±0,08)
48h	1,00 (±0,11)	0,80 (±0,15)	0,96 (±0,06)	1,20 (±0,06)[a]	1,03 (±0,12)	0,98 (±0,11)
72h	1,00 (±0,12)	0,95 (±0,16)	1,04 (±0,13)	1,46 (±0,14)[a]	1,26 (±0,01)[a]	0.98 (±0,06)

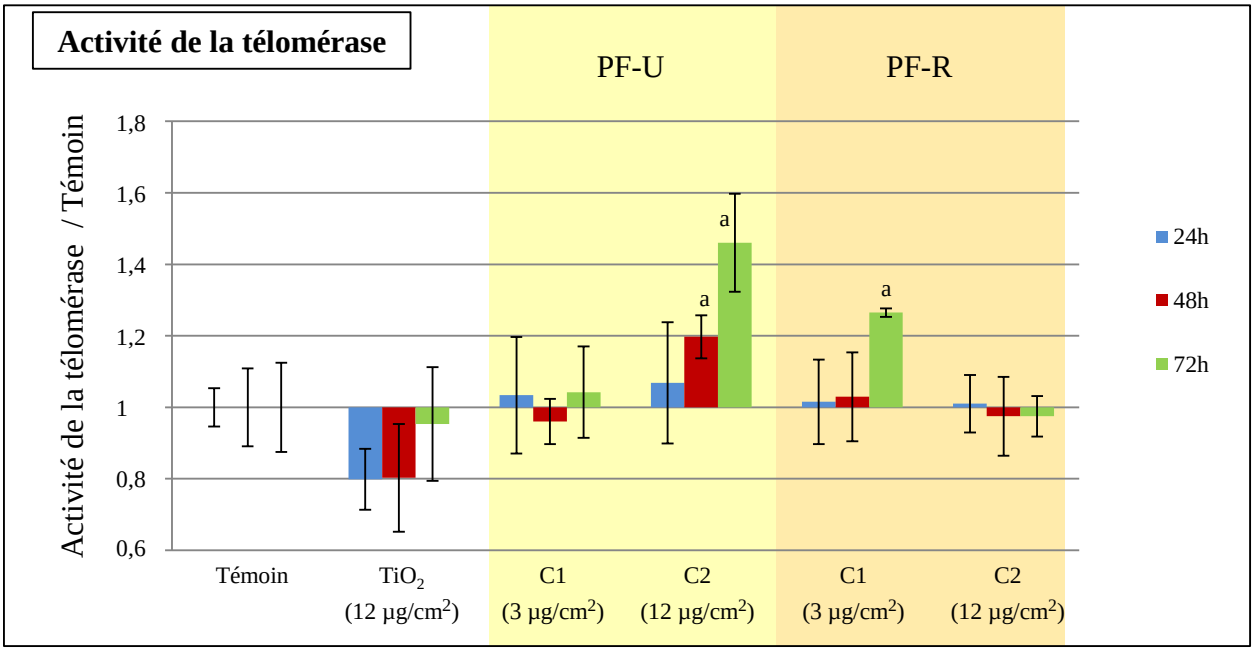


Figure IV-23 : Activité de la télomérase rapportée à celle du témoin dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 24, 48 et 72 h aux échantillons composites de particules fines collectées en milieux urbain et rural (C1 = 3 µg/cm^2 et C2 = 12 µg/cm^2) et au TiO_2 (12 µg/cm^2).
Les résultats sont décrits par les moyennes et les écarts types de 8 réplicats (témoins) et de 4 réplicats (cellules exposées). [Test U de Mann-Whitney ; *vs* témoins (a : p<0,05 ; b : p<0,01 ; c : p<0,001)].

4.1. Discussion

Nos résultats sont en accord avec ceux de Yim et collaborateurs (Yim *et al.*, 2007) qui ont trouvé une association entre le tabagisme et l'activité de la télomérase dans l'épithélium bronchique normal. D'après les auteurs, cette augmentation de l'activité de la télomérase pourrait

prolonger la durée de vie des cellules et contribuer ainsi à la carcinogenèse pulmonaire. De plus, concernant certains éléments pris isolément, le cadmium semble induire une augmentation de l'activité télomérase dans les hépatocytes de rat (Dai *et al.,* 2010).

Rappelons que la télomérase est une ribonucléoprotéine à activité de transcriptase inverse et son rôle consiste à allonger les extrémités télomériques des chromosomes par addition de séquences spécifiques répétées. Son inactivation peut conduire à une instabilité génétique (Frias *et al.,* 2012), alors que son activation est associée à une perte de la sénescence réplicative, phénomène impliqué dans la promotion tumorale (Olaussen *et al.,* 2006). En dehors de son rôle de régulateur de la taille des télomères, la télomérase pourrait favoriser la survie des cellules en leur conférant une protection vis-à-vis de l'apoptose (Lee *et al.,* 2005 ; Li *et al.,* 2004 ; Massard *et al.,* 2006 ; Rahman *et al.,* 2005 ; Zhong *et al.,* 2010). Des études antérieures ont montré que la télomérase est activée dans différents types de cancer, (Engelhardt *et al.,* 1997 ; Hiyama *et al.,* 1996 ; Mekhail *et al.,* 2003 ; Gelmini *et al.,* 2000) y compris le cancer pulmonaire (Chen *et al.,* 2006 ; Lee *et al.,* 1998 ; Nassani *et al.,* 2013 ; Sen *et al.,* 2001 ; Xinarianos *et al.,* 2000). Cependant, très peu d'étude ont évalué l'effet de la pollution atmosphérique (surtout les PM) sur l'activité de la télomérase.

Par conséquent, nos résultats mettent en évidence la capacité des particules atmosphériques, notamment celles d'origine urbaines, à activer la télomérase dans les cellules épithéliales bronchiques. Ceci pourrait aboutir à la conservation de la longueur des télomères au cours des divisions cellulaires et/ou inhiber/ou activer les signaux pro/ou anti-apoptotiques, rendant les cellules immortelles et favorisant ainsi leur développement en cellules cancéreuses. En effet, la réactivation de la télomérase dans les cellules cancéreuses est en grande partie la conséquence de la réexpression du gène d'hTERT. Alors que la composante hTR est exprimée de façon constitutive et ubiquitaire (Feng *et al.,* 1995), hTERT semble être le facteur limitant et déterminant pour l'activité télomérasique. Ainsi, il serait intéressant d'évaluer l'expression du gène de hTERT dans les cellules BEAS-2B exposées aux particules fines ainsi que de déterminer les mécanismes par lesquels ce gène a été activé.

5. Phosphorylation de l'histone H2AX

Nous avons poursuivi l'étude des lésions primaires de l'ADN induites par les PF par l'analyse spécifique des cassures double-brin de l'ADN (DSB) et cela par évaluation des niveaux de phosphorylation du H2AX (γH2AX). En effet, γH2AX fait partie des événements les plus précoces qui suivent la formation des cassures doubles-brin de l'ADN, et c'est le signal majeur pour le recrutement de protéines de réparation de l'ADN dans les régions endommagées.

Afin de déterminer si nos particules sont capables de provoquer des cassures dans l'ADN, la phosphorylation de H2AX dans les cellules BEAS-2B a été évaluée par cytométrie en flux après exposition de ces cellules pendant 24, 48 et 72 h aux échantillons composites de particules fines d'origine urbaine et rurale (PF-U et PF-R) aux deux concentrations (C1 = 3 µg/cm^2 et C2 = 12 µg/cm^2) et aux particules de TiO_2 (12 µg/cm^2). Comme témoin positif induisant des cassures d'ADN, et donc une phosphorylation de H2AX, les cellules ont été exposées à 1 µM de H_2O_2 pendant 20 min.

Les niveaux de H2AX phosphorylées (P-H2AX ou γH2AX) dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 24, 48 et 72h aux différentes conditions, sont normalisés par rapport à la quantité d'ADN et les résultats sont rapportés à ceux du témoin pour chaque phase du cycle cellulaire : G0/G1, S et G2/M (avec G0, G1 et G2 = Growth phase 0, 1 et 2 ; S = Synthèse de l'ADN ; M = Mitose). Les résultats sont regroupés dans le Tableau IV-13 et illustrés dans la Figure IV-24.

Le même profil de phosphorylation de H2AX a été observé dans les cellules pour les différentes phases du cycle cellulaire. A la plus faible concentration de PF-R (C1 = 3 µg/cm^2), aucune phosphorylation significative de H2AX n'a été observée pour les 3 temps d'exposition. Par contre à la même concentration, l'échantillon composite de PF-U a provoqué une phosphorylation significative de H2AX dans les cellules BEAS-2B après 24h d'exposition (Figure IV-24).

A la concentration la plus élevée (C2 = 12 µg/cm^2), une phosphorylation significative de H2AX a été observée après 24 et 48 h d'exposition aux particules fines urbaines et rurales. Dans certains cas, cette phosphorylation a été détectée seulement dans les cellules en phase G2/M ou en phase S. Ces phases du cycle cellulaire concernent moins de cellules, ce qui permet peut être une détection plus efficace du phénomène recherché (Figure IV-24).

Tableau IV-13 : Niveaux de H2AX phosphorylés (γH2AX) normalisés par rapport à la quantité d'ADN et rapportés à ceux du témoin dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 24, 48 et 72 h aux échantillons composites de particules fines collectées en milieu urbain (PF-U) et rural (PF-R) (C1 = 3 µg/cm^2 et C2 = 12 µg/cm^2), au TiO_2 (12 µg/cm^2) et pendant 20 min au H_2O_2 1 µM (témoin positif) pour chaque phase du cycle cellulaire (G0/G1, S et G2 /M).

Les résultats sont décrits par les moyennes et les écarts types de 8 réplicats (témoins) et de 4 réplicats (cellules exposées). [Test U de Mann-Whitney ; *vs* témoins (a : p<0,05 ; b : p<0,01 ; c : p<0,001) ; *vs* doses pour un même site (* : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001)].

		TiO_2 (µg/cm^2)	**H_2O_2 (µM)**	**PF-U (µg/cm^2)**		**PF-R (µg/cm^2)**	
	Témoin	***C = 12,00***	***C = 1,00***	***C1 = 3,00***	***C2 = 12,00***	***C1 = 3,00***	***C2 = 12,00***
Phase G0/G1							
24h	1,00 (±0,08)	0,71 (±0,11)	-	1,28 (±0,09)^a	1,18 (±0,20)	1,05 (±0,20)	1,12 (±0,15)
48h	1,00 (±0,16)	0,96 (±0,09)	-	1,09 (±0,08)	1,24 (±0,09)^a	1,14 (±0,10)	1,35 (±0,08)^{a*}
72h	1,00 (±0,25)	0,93 (±0,15)	-	1,05 (±0,03)	1,25 (±0,16)*	0,99 (±0,22)	1,33 (±0,21)
20 min	-	-	2,18 (±0,36)^a	-	-	-	-
Phase S							
24h	1,00 (±0,04)	0,74 (±0,12)	-	1,18 (±0,06)^a	1,22 (±0,16)^b	1,01 (±0,14)	1,17 (±0,15)
48h	1,00 (±0,10)	0,87 (±0,05)	-	1,07 (±0,22)	1,30 (±0,11)^a	0,99 (±0,11)	1,26 (±0,11)^{a*}
72h	1,00 (±0,09)	0,95 (±0,06)	-	1,04 (±0,09)	1,18 (±0,14)	0,98 (±0,05)	1,25 (±0,23)
20 min	-	-	1,41 (±0,27)^a	-	-	-	-
Phase G2/M							
24h	1,00 (±0,06)	0,80 (±0,10)	-	1,19 (±0,05)^a	1,20 (±0,12)^a	1,04 (±0,14)	1,17 (±0,11)^a
48h	1,00 (±0,09)	0,92 (±0,04)	-	1,08 (±0,21)	1,27 (±0,08)^a	1,01 (±0,12)	1,26 (±0,11)^{a*}
72h	1,00 (±0,07)	0,98 (±0,04)	-	1,05 (±0,06)	1,,17 (±0,14)	0,98 (±0,04)	1,22 (±0,18)
20 min	-	-	1,78 (±0,30)^a	-	-	-	-

Phases G0, G1 et G2 = Growth phase 0, 1 et 2 ; phase S = synthèse de l'ADN ; phase M = mitose).

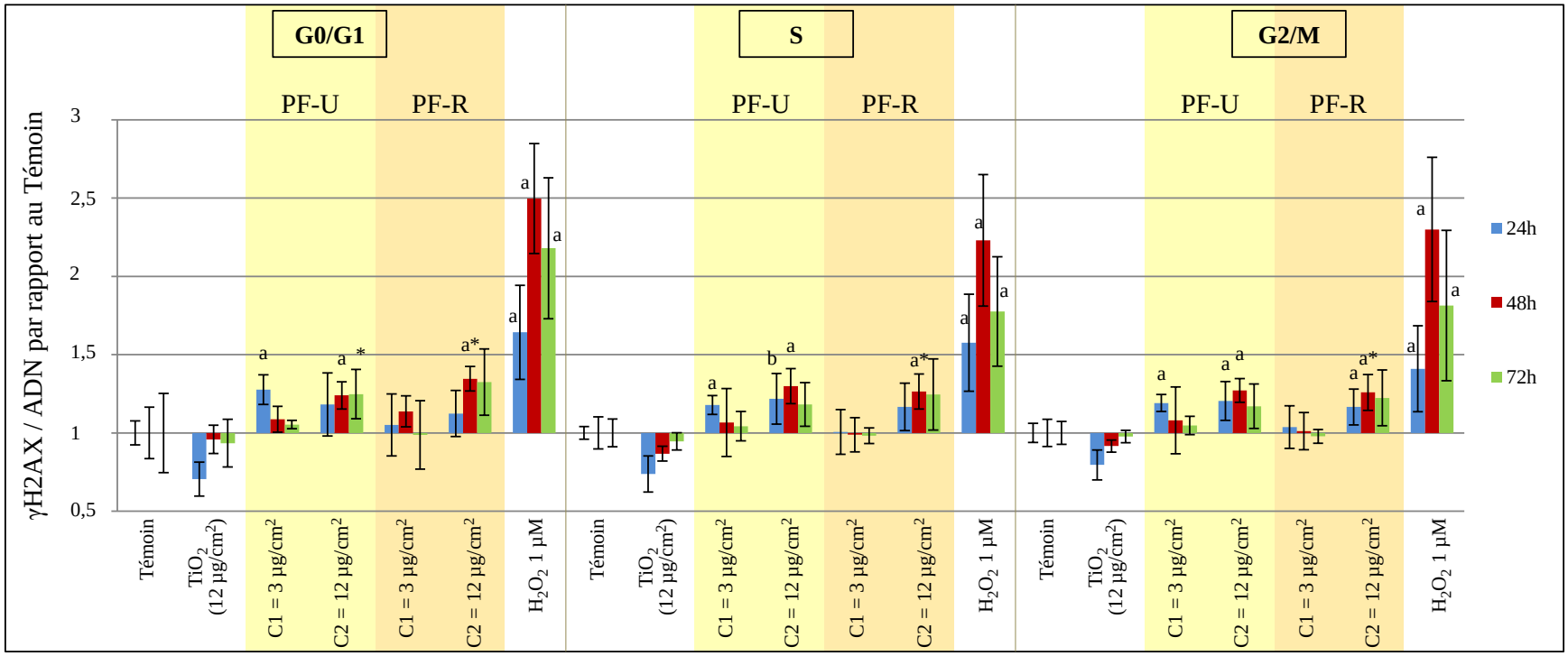


Figure IV-24 : Niveaux de H2AX phosphorylés (γH2AX) normalisés par rapport à la quantité d'ADN et rapportés à ceux du témoin dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 24, 48 et 72 h aux échantillons composites de particules collectées en milieu urbain (PF-U) et rural (PF-R) (C1 = 3 µg/cm^2 et C2 = 12 µg/cm^2) et au TiO_2 (12 µg/cm^2) pour chaque phase du cycle cellulaire (G0/G1, S et G2 /M).
Les résultats sont décrits par les moyennes et les écarts types de 8 réplicats (témoins) et de 4 réplicats (cellules exposées). [Test U de Mann-Whitney ; *vs* témoins (a : p<0,05 ; b : p<0,01 ; c : p<0,001) ; *vs* doses pour un même site (* : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001)].

Les particules de TiO_2 n'ont pas provoqué de phosphorylation de l'histone H2AX dans les cellules BEAS-2B quelque soit le temps d'exposition, et par conséquent les particules en tant que telles ne provoquent pas des cassures de l'ADN. Par contre, une phosphorylation significative des H2AX a été observée dans les cellules BEAS-2B après leur exposition au témoin positif (H_2O_2) pendant 20 min, et ce, avec des niveaux supérieurs à ceux provoqués par les échantillons de particules (Tableau IV-13).

5.1. Discussion

Nos résultats sont en accord avec les études réalisées par Sanchez-Perez et collaborateurs (2009), et Gualtieri et Collaborateurs (2011). Une phosphorylation du H2AX a été observée dans des cellules BEAS-2B exposées aux $PM_{2,5}$ collectées en Milan (Italie) (Gualtieri *et al.,* 2011) ainsi que dans des cellules A549 exposées aux PM_{10} (Sánchez-Pérez *et al.,* 2009) suite à l'apparition de cassures au niveau de l'ADN.

Une augmentation des niveaux de γH2AX a été observée également dans des études *in vitro* après exposition des cellules à des composés endommageant l'ADN, comme la fumée de cigarette (Albino *et al.,* 2004), le dinitrobenzo[e]pyrène (Kawanishi *et al.,* 2009), les métaux lourds (Peterson *et al.,* 2005), les HAP (Toyooka et Ibuki, 2006 ; Mattsson *et al.,* 2009) et les nitro-HAP (Oya *et al.,* 2011). γH2AX a également été observée dans les lésions pré-cancéreuses chez l'Homme (Gorgoulis *et al.,* 2005), et dans une grande variété de tumeurs (Banáth *et al.,* 2004 ; Sedelnikova et Bonner, 2006 ; Warters *et al.,* 2005).

L'induction de mécanismes de toxicité, susceptibles de conduire à des altérations décrites dans les étapes d'initiation et éventuellement de promotion de la cancérogenèse, mettent en évidence le pouvoir génotoxique de nos particules collectées au Liban, notamment celles d'origine urbaine. En effet ces particules sont capables de provoquer des lésions au niveau de l'ADN qui, une fois non réparées, peuvent créer des mutations ou des translocations chromosomiques provoquant ainsi l'instabilité génomique et par conséquent le développement du cancer (Jeggo et Löbrich, 2007 ; McKinnon et Caldecott, 2007). Les dommages de l'ADN induits par les PM ont été principalement liés aux teneurs en métaux tels que le Cu, le Fe, le Ni, le V, le Zn et le Pb et en HAPs (Binková *et al.,* 2003 ; Knaapen *et al.,* 2002 ; Sánchez-Pérez *et al.,* 2009 ; Shi *et al.,* 2006). Ces derniers peuvent être métabolisés en métabolites réactifs électrophiles qui

se lient de façon covalente à l'ADN (Billet *et al.*, 2008) ; en outre, les deux groupes de composés, ainsi que la particule en tant que telle peuvent augmenter la formation des ERO dans les cellules exposées (Billet *et al.*, 2008 ; Møller, *et al.*, 2008). Les ERO peuvent interagir directement avec l'ADN et produire différents types de dommages, y compris les dommages oxydatifs à l'ADN (Shi *et al.*, 2003 ; Valavanidis *et al.*, 2005). Dans notre étude, nous avons pu déterminer que les HAPs sont capables d'induire l'expression des *CYP1A1* et *CYP1B1*, et par conséquent susceptibles d'être métabolisés en métabolites réactifs.

6. Discussion générale

Durant ces dernières années, une grande importance a été attribuée aux matières particulaires qui sont actuellement reconnues pour avoir un impact majeur sur la santé humaine. De nombreuses études épidémiologiques ont associé la pollution atmosphérique, notamment particulaire (PM_{10} et $PM_{2,5}$), à l'augmentation des taux de mortalité et de morbidité par cause respiratoire et cardiovasculaire (Pope *et al.*, 2009 ; Puett *et al.*, 2009) et ont montré que l'exposition aux $PM_{2,5}$ peut engendrer plusieurs formes de pathologies respiratoires, y compris la bronchite et l'asthme (Silverman et Ito, 2009), la BPCO (Tsai *et al.*, 2013), ainsi que des maladies cardiovasculaires (Puett *et al.*, 2011) et de cancer du poumon (Tie *et al.*, 2009). Ce dernier constitue la principale cause de décès par cancer, tuant plus d'un million de personnes chaque année dans le monde (Jemal *et al.*, 2010). D'autre part, des études épidémiologiques ont trouvé des associations entre les PUF et la survenue des effets néfastes respiratoires (Evans *et al.*, 2014) et cardiovasculaires (Franck *et al.*, 2011).

En dépit de la relation clairement établie par les études épidémiologiques, entre l'exposition aux aérosols et l'apparition des maladies respiratoires et cardiovasculaires, des incertitudes subsistent encore quant aux mécanismes physiopathologiques responsables de ces maladies. Au cours des dernières années, les études toxicologiques ont joué un rôle important dans la compréhension des effets biologiques des particules atmosphériques. Ces études *in vivo* ou *in vitro*, permettent d'établir une relation dose/effet très difficile à mettre en évidence dans les études épidémiologiques. De plus, elles sont nécessaires pour mieux appréhender les mécanismes d'action des aérosols atmosphériques qui sont potentiellement responsables des réponses physiopathologiques chez les individus exposés. En effet, des études *in vitro* réalisées sur des lignées de cellules pulmonaires ont montrés la capacité des PF à provoquer des réactions

inflammatoires et un stress oxydant (Dergham *et al.,* 2012 ; Dieme *et al.,* 2012). D'autre part, d'autres études ont mis en évidence la capacité des PUF à pénétrer dans des cellules épithéliales pulmonaires, de provoquer un stress oxydant par la production des ERO (Chuang *et al.,* 2013 ; Gasparotto *et al.,* 2013 ; Müller *et al.,* 2009), d'induire la mort cellulaire par nécrose ou apoptose (Pan *et al.,* 2009 ; Sydlik *et al.,* 2006) et de provoquer des réactions inflammatoires (Gasparotto *et al.,* 2013).

Malgré l'avancement de la recherche dans le domaine des PF et leurs effets sur la santé et à une moindre mesure pour les PUF, le rôle des différents composés qui constituent les particules ainsi que les processus impliqués dans leurs toxicités restent mal compris et des études supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre leurs mécanismes d'action et leur implication dans l'apparition de nombreuses maladies notamment le cancer du poumon.

En raison de sa localisation sur le côté Est du bassin méditerranéen à l'intersection des 3 continents, plusieurs facteurs influencent la qualité de l'air au Liban tels que les tempêtes de poussière provenant des déserts d'Arabie et du Sahara, le transport à longue distance de polluants provenant de l'Europe, l'enrichissement des masses d'air par des aérosols marins à cause de sa proximité de la mer ainsi que le faible niveau de précipitation accompagné d'un rayonnement solaire intense durant l'été (Saliba *et al.,* 2007a). En plus de ces inévitables sources, la principale source de pollution atmosphérique au Liban, et plus particulièrement dans l'agglomération de Beyrouth, est le trafic routier, l'activité industrielle étant peu développée (Afif *et al.,* 2008). Les émissions dues au trafic routier peuvent être directes suite à la combustion des combustibles fossiles, et indirectes suite à l'usure des pneus et des freins ainsi que suite à la remise en suspension des particules déposées en raison de la turbulence générée par les roues (Thorpe et Harrison, 2008 ; Kupiainen *et al.,* 2005). Les particules issues des freins, des pneus et celles remises en suspension peuvent contenir des substances toxiques et cancérigènes notamment des métaux lourds et des HAP (Schauer *et al.,* 2006).

Très peu d'études ont été réalisées au Liban sur la qualité de l'air, et aucune étude n'a évalué l'impact sanitaire de la pollution atmosphérique hormis quelques études épidémiologiques (Borgie *et al.,* 2014 ; Mrad-Nakhlé *et al.,* 2013) menées afin de déterminer le lien entre la pollution atmosphérique et la survenue des maladies respiratoires, des morbidités et des mortalités. En 1999, 80 décès supplémentaires par an, 3000 admissions à l'hôpital dont 400 dues

à des crises cardiaques et des problèmes respiratoires et 2800 admissions en urgence ont été estimés suite à l'augmentation de 10 µg/m^3 de TSP (Djoundourian *et al.*, 1999). Durant la même année, une autre étude a associé l'augmentation de 10 µg/m^3 de particules à une augmentation de 1% de la mortalité totale et de 2% des admissions hospitalières totales et des admissions par cause respiratoires et cardiovasculaires (METAP III, 1999). Ensuite, en 2000, il a été montré qu'entre 15-214 et 35-498 cas de Pneumonie et de BPCO peuvent être évités par une réduction de 10 µg/m^3 de PM_{10} (El-Fadel et Massoud, 2000). Une baisse importante des admissions aux Urgences hospitalières par cause respiratoire a été enregistrée pour les enfants âgés de moins de 17 ans à Beyrouth après un an d'interdiction des véhicules à moteur diesel (El-Zein *et al.*, 2007). D'autre part, en 2000, Kobrossi a évalué les effets de la pollution atmosphérique sur la santé des enfants, en particulier ceux qui vivent dans les villes localisées autour des industries dans les régions de Chekka et de Selaata. Il a ainsi mis en évidence une corrélation entre la proximité des industries, l'exposition aux polluants atmosphériques, et le risque de contracter des maladies respiratoires (bronchite chronique, asthme, sifflements, etc.) (Kobrossi, 2000). Récemment, une relation dose-effet a été observée chez des personnes adultes vivantes à proximité d'une route très fréquentée et d'une source locale d'échappement diesel d'une part, et la survenue de la bronchite chronique à Beyrouth d'autre part (Salameh *et al.*, 2012).

Ce travail de thèse sera donc le premier à déterminer, à l'aide des tests *in vitro*, les effets toxiques des particules atmosphériques collectées à Sin El-Fil (Beyrouth), site urbain de fond, et dans un site rural de référence à Bejje (Byblos) sur une lignée cellulaire épithéliale bronchique humaine (BEAS-2B). Nous nous sommes intéressés aux particules ayant un diamètre aérodynamique inférieur ou égal à 2,5 µm, car celles-ci se déposent dans les voies respiratoires profondes en proportion nettement plus grande que les particules les plus grosses. En pénétrant profondément, elles atteignent les alvéoles pulmonaires au niveau desquelles s'effectuent les échanges gazeux entre l'air et le sang et persistent longtemps dans l'organisme, car elles résistent en partie aux processus d'élimination. De plus, les très petites particules (diamètre inférieur à 0,1 µm) peuvent être en nombre très important, et elles offrent de ce fait une surface de contact plus importante (Airparif, 2008).

Dans le cadre de notre projet, des échantillons composites de particules fines (PF-U et PF-R) et de particules ultrafines (PUF-U_{aq}, PUR-R_{aq}, PUF-U_{org} et PUF-R_{org}) des deux sites d'échantillonnage ont été préparés suite à la collecte des aérosols atmosphériques par un

impacteur en cascade à haut débit. Leur caractérisation physico-chimique, présentée dans la partie A de ce chapitre, a été effectuée avant qu'ils ne soient utilisés pour exposer des cellules épithéliales bronchiques humaines non cancéreuses (BEAS-2B), immortalisées suite à une infection par le virus hybride AD12-SV40 afin d'étudier leur cytotoxicité globale et les mécanismes d'action sous-jacents.

Les effets génotoxiques et les modifications épigénétiques que nous avons étudiés mettent en évidence l'implication potentielle des particules fines surtout celles d'origine urbaine dans la cancérogenèse broncho-pulmonaire. Ces particules sont capables d'une part, d'induire l'expression des enzymes du métabolisme qui assurent la biotransformation des composés organiques en métabolites plus toxiques voire cancérigènes, et d'autres part, d'induire l'expression de l'oncomiR miR-21 qui favorise la croissance cellulaire et augmente l'invasion tumorale et les métastases dans le cancer de poumon par la réduction de l'expression des gènes suppresseurs de tumeur. De plus, nos résultats ont souligné le rôle des particules fines collectées au Liban dans l'activation de la télomérase, ce qui peut rendre les cellules immortelles, et ont également mis en évidence leur capacité à induire des cassures au niveau de l'ADN augmentant ainsi le risque de mutations ou des translocations chromosomiques qui aboutissent à l'instabilité génomique. Tous ces facteurs favorisent la transformation des cellules pulmonaires en cellules immortelles, et par conséquent le développement du cancer.

Conclusion et perspectives

Notre étude avait pour objectif de déterminer les caractéristiques physico-chimiques des échantillons de particules fines et ultrafines collectées au Liban, sous influence urbaine et rurale, durant la période mai-octobre 2011, et d'évaluer *in vitro* leur capacité à induire des altérations potentiellement impliquées dans le processus de cancérogénèse.

A l'issu de ce travail, nous avons pu constater que le niveau moyen de $PM_{2,5}$ obtenu en zone urbaine (40 µg/m^3) est supérieur à celui obtenu en zone rurale (23 µg/m^3) mais ces concentrations dépassent toutes deux la norme annuelle fixée par l'OMS (10 µg/m^3). De plus, l'évaluation de la cytotoxicité globale des PF collectées sur des cellules épithéliales bronchiques humaines (BEAS-2B) a mis en évidence un effet plus prononcé et plus précoce provoqué par les PF collectées en milieu urbain (Beyrouth). Les mécanismes de toxicité que nous avons étudiés sont potentiellement impliqués dans l'initiation ou la promotion de la cancérogenèse et ont été induits par les PF collectées, avec une fois encore un effet plus prononcé des particules d'origine urbaine. Parmi ces processus, nous pouvons citer *(i)* l'activation métabolique des composés organiques adsorbés à la surface des particules qui peut aboutir à la formation des métabolites cancérigènes, *(ii)* le processus d'altération des mécanismes épigénétiques avec notamment l'induction de l'oncogène miR-21 qui favorise la croissance cellulaire et la réduction de l'expression des gènes suppresseurs de tumeur, et *(iii)* le processus de génotoxicité, d'une part, par activation de la télomérase qui peut rendre les cellules immortelles, et d'autre part, par induction de cassures au niveau de l'ADN, augmentant ainsi le risque de mutations ou des translocations chromosomiques qui aboutissent à l'instabilité génomique.

Par ailleurs, à partir des analyses chimiques, nous avons pu remarquer que l'influence des sources de combustions, majoritaires en milieu urbain, est plus notable pour les particules collectées à Sin El-Fil (Beyrouth) et cela par l'abondance de carbone total, des composés organiques (HAP, PCDD, PCDF et PCB), des métaux et des ions inorganiques secondaires, principalement les ions SO_4^{2-}. Parmi ces composés, les métaux et les HAP sont bien connus pour être potentiellement responsables des mécanismes de toxicité que nous avions étudiés.

Etant la principale source de pollution dans l'agglomération de Beyrouth, le trafic routier est responsable de la majorité des émissions polluantes et pourrait donc être à l'origine, au moins

en partie, des effets toxiques observés sur les cellules BEAS-2B suite à l'exposition aux particules urbaines. En effet, les émissions dues au trafic routier peuvent être directes suite à la combustion des carburants (essence dans les voitures et diesel dans les camions et les bus), et indirectes suite à l'usure des pneus et des freins ainsi qu'à la remise en suspension des particules déposées sur les voies. Les particules émises par le trafic routier peuvent contenir des substances toxiques et cancérigènes notamment des éléments métalliques et des HAP (Schauer *et al.,* 2006).

L'accès gratuit à un air pur est un besoin et un droit fondamental pour tous les citoyens. Au Liban, le problème de la pollution atmosphérique devient une préoccupation majeure de santé publique, surtout en absence de nouvelles lois sur la qualité de l'air et/ou l'absence d'application des lois existantes qui permettraient de réduire les émissions, et par conséquent d'améliorer la qualité de l'air. Par conséquent, les premières mesures à prendre devraient être tournées vers les moyens de transport, de manière à réduire les émissions atmosphériques liées au trafic routier. De plus, les citoyens devraient adopter une attitude plus respectueuse de l'environnement, de manière à contribuer, à leur niveau, à une amélioration de la qualité de l'air. Parmi les solutions possibles, il apparait urgent que le Liban acquiert de nouveaux bus équipés de moyens de motorisation plus performants, consommant moins de carburants et également moins émissifs de polluants atmosphériques. Une solution serait aussi de choisir un nouveau parc de véhicules, fonctionnant au gaz naturel liquifié. Il faudrait également explorer la possibilité de voies réservées aux bus aux fins de réduire le temps de trajet et de renforcer la confiance du consommateur dans le service public. C'est une mesure prioritaire, absente au Liban, qui permettrait la fluidification du trafic et atténuerait donc la pollution atmosphérique.

Afin de compléter ces investigations *in vitro* et de conforter les résultats obtenus, il serait important d'évaluer l'activité enzymatique du CYP1A1, qui se caractérise par l'expression génique la plus induite par les HAP adsorbés sur nos particules. Il serait également intéressant d'opter pour une étude métabolomique qui nous permettrait de mettre en évidence, dans les matrices intra- et extracellulaires, des intermédiaires de dégradations de composés organiques (métabolites nucléophiles) et/ou des signes de perturbation/modulation du métabolisme cellulaire après exposition aux particules atmosphériques. En outre, la recherche des cibles potentielles de l'oncogène miR-21 dont l'expression a été induite dans les cellules BEAS-2B exposées aux PF, serait également importante. De plus, l'évaluation de l'expression d'autres miARNs dans les cellules exposées aux PF s'avère nécessaire afin de mieux comprendre les effets toxiques de ces

particules. Parmi ces miARNs, nous citons le miR-191 qui est surexprimé par les dioxines et ayant comme rôle d'inhiber l'apoptose (Elyakim *et al.,* 2010) et le miR-96 qui est réprimé dans des cellules épithéliales des voies respiratoires humaines exposées aux particules d'échappement diesel (Jardim *et al.,* 2009). Ce miARN inhibe la synthèse de l'arginine méthyl transférase (PRMT) qui assure la méthylation de l'histone aboutissant ainsi à une diminution de l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs (Pal *et al.,* 2007). D'autre part, nous avons pu montrer la capacité de nos PF à activer la télomérase. Il serait donc important de déterminer si cette activation a abouti à un allongement des télomères ou à une inhibition de l'apoptose, ce qui, dans les deux cas, favorise l'immortalisation des cellules. Notons que les miARNs et la télomérase sont de plus en plus décrits comme étant de potentielles cibles thérapeutiques des cancers. De même, l'évaluation de la capacité de nos particules à induire un stress oxydant *via* la formation des ERO serait importante pour mettre en évidence un rôle des métaux dans les effets génotoxiques provoqués par les particules.

Enfin, ayant une taille très petite leur conférant la possibilité de pénétrer très profondément dans le poumon, avec éventuellement la possibilité de franchir les barrières alvéolo-capillaires pour rejoindre la circulation sanguine, et possédant une surface spécifique très importante favorisant ainsi l'adsorption des composés toxiques et augmentant leur surface de contact avec le poumon, les particules ultrafines (PUF) semblent être plus toxiques que les particules plus grossières. Il est donc important de réaliser des études supplémentaires pour déterminer les effets génotoxiques et épigénétiques de ces PUF dans les cellules BEAS-2B.

D'un point de vue technique, nous avions collecté les particules ultrafines sur des filtres en fibre de verre bien adaptés pour les analyses simultanées des composés organiques et des métaux, et adéquats pour l'impacteur à haut débit utilisé dans notre étude, mais ayant l'inconvénient d'avoir des teneurs élevées en certains éléments dans ces fibres. Pour pouvoir exposer les cellules aux PUF, un protocole de récupération de ces particules par ultrasons dans l'eau a été adapté. Ce type de filtre présente cependant l'inconvénient de libérer des fibres suite au traitement par ultrasons, de plus, l'efficacité d'extraction des PUF collectées sur ce filtre ne peut pas être mesurée (Happo *et al.,* 2007 ; Jalava *et al.,* 2007 ; Schirilo *et al.,* 2010) et les concentrations en particules ont été déterminées en considérant que toutes les particules impactées sur les filtres étaient extraites et récupérées dans l'eau (Hutchison *et al.,* 2005 ; Jalava *et al.,* 2006 ; Schirilo *et al.,* 2010). Il apparait donc important d'améliorer le protocole de

récupération de ces particules à partir des filtres et cela en essayant de trouver un filtre ayant moins de limites pour les analyses chimiques et toxicologiques.

Bien que les études toxicologiques présentent aussi des limites, dans la mesure où il est impossible de reconstituer au laboratoire la complexité de l'environnement humain, ni la complexité de l'appareil respiratoire avec les mécanismes de défense mis en jeu, elles demeurent cependant un des maillons essentiels parmi l'ensemble des éléments qui aboutissent à l'évaluation du risque. Dans les perspectives de ce travail, il serait donc important de faire évoluer le modèle cellulaire grâce au modèle MucilAir™. L'épithélix mucilair est un modèle *in vitro* reconstitué en 3D de l'épithélium des voies respiratoires humaines, qui possède, au contraire de la grande majorité des lignées cellulaires pulmonaires, une longue durée de vie. Ce modèle est formé de cellules humaines primaires isolées de la cavité nasale, la trachée et les bronches et mis en culture à l'interface air-liquide. Une fois différencié, cet épithélium mime le tissu *in vivo* de l'épithélium respiratoire humain et reste fonctionnel durant un an. L'utilisation du modèle MucilAir™ dans l'évaluation des effets toxiques des PM nous permettrait donc de mieux comprendre les interactions entre les PM et l'épithélium respiratoire et de s'approcher au plus près de la réalité et de la complexité des voies respiratoires humaines (cils, mucus, différents types cellulaires et interactions entre les cellules). De plus, il nous permet de mimer l'exposition environnementale et donc d'étudier les effets toxiques d'une exposition chronique à faible dose de PM.

Références bibliographiques

Abu-Allaban, M., Gertler, A., & Lowenthal, D. (2002). A preliminary apportionment of the sources of ambient PM10, PM2,5, and VOCs in Cairo. *Atmospheric Environment, 36*, 5549–5557.

ACS. (2006). Administration centrale de la Statistique. Compendium statistique national sur les statistiques de l'environnement au Liban. République libanaise- présidence du conseil des ministères . 1-38.

Adachi, K., & Tainosho, Y. (2004). Characterization of heavy metal particles embedded in tire dust. *Environment International, 30*, 1009–1017.

Adcock, I., Ford, P., Ito, K., & Barnes, P. (2006). Epigenetics and airways disease. *Respiratory Research, 7*.

Afif, C., Chélala, C., Borbon, A., Abboud, M., Adjizian-Gérard, J., Farah, W., et al. (2008). SO2 in Beirut: air quality implication and effects of local emissions and long-range transport. *Air Qual Atmos Health, 1*, 167–178.

Afif, C., Dutot, A., Jambert, C., Abboud, M., Adjizian-Gérard, J., Farah, W., et al. (2009). Statistical approach for the characterization of NO2 concentrations in Beirut. *Air Qual Atmos Health, 2*, 57-67.

Airparif. (2008). Synthèse des connaissances sur les particules en suspension dans l'air et des travaux d'Airparif sur ces polluants.

Akerman, M., Chan, W., Laakkonen, P., Bhatia, S., & Ruoslahti, E. (2002). Nanocristal targeting in vivo. *PNAS, 99*, 12 617-12 621.

Akyüz, M., & Çabuk, H. (2008). Particle-associated polycyclic aromatic hydrocarbons in the atmospheric environment of Zonguldak, Turkey. *Science of the Total Environment , 405*, 6 2 – 7 0.

Albino, A., Huang, X., Jorgensen, E., Yang, J., Gietl, D., Traganos, F., et al. (2004). Induction of H2AX phosphorylation in pulmonary cells by tobacco smoke: a new assay for carcinogens. *Cell Cycle, 3*, 1062-1068.

Aldabe, J., Elustondo, D., Santamaría, C., Lasheras, E., Pandolfi, M., Alastuey, A., et al. (2011). Chemical characterisation and source apportionment of PM2.5 and PM10 at rural, urban and traffic sites in Navarra (North of Spain). *Atmospheric Research, 102*, 191–205.

Al-Momani, I., Daradkeh, A., Haj-Hussein, A., Yousef, Y., Jaradat, Q., & Momani, K. (2005). Trace elements in daily collected aerosols in Al-Hashimya, central Jordan. *Atmospheric Research, 73*, 87– 100.

Anderson, N., Strader, R., & Davidson, C. (2003). Airborne reduced nitrogen: ammonia emissions from agriculture and other sources. *Environment International, 29*, 277– 286.

Andreae, M. (1995). Climatic effects of changing atmospheric aerosol levels. *Future Climates of the World : a Modelling Perspective, World Survey of Climatology. (A. Henderson-Sellers, ed.) Elsevier, New-York, 16*, 347-398.

Andreeva, A., Kutuzov, M., & Voyno-Yasenetskaya, T. (2007). Regulation of surfactant secretion in alveolar type II cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol,, 293* , L259-L271.

Andreou, G., & Rapsomanikis, S. (2009). Polycyclic aromatic hydrocarbons and their oxygenated derivatives in the urban atmosphere of Athens. *Journal of Hazardous Materials, 172*, 363–373.

Ansari, A., & Pandis, S. (1999). Prediction of multicompnent inorganic atmospheric aerosol behavior. *Atmos. Environ, 33*, 745-757.

AQ-Monitoring-Report. (2012). Consultant to identify air pollution hotspots in Lebanon as component C(II) establishing a monitoring and reporting program for air pollution, including monitoring station in key heavily inhabited spots and display of public information.

Arruti, A., Fernández-Olmo, I., & Irabien, A. (2011). Regional evaluation of particulate matter composition in an Atlantic coastal area (Cantabria region, northern Spain): Spatial variations in different urban and rural environments. *Atmospheric Research, 101*, 280-293.

Artinano, B., Salvador, P., Alonso, D., Querol, X., & Alastuey, A. (2003). Anthropogenic and natural influence on the PM10 and PM2.5 aerosol in Madrid (Spain). Analysis of high concentration episodes. *Environmental Pollution, 125*, 453–465.

Asangani, I., Rasheed, S., Nikolova, D., Leupold, J., Colburn, N., Post, S., et al. (2008). MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pdcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene, 27*, 2128–2136.

ATSDR. (2000). Toxicological Profiles for PCB. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA: U.S department of Health and Human Services, Public Health Services. htpp://www.atsdr.cdc.gov/.

Autexier, C., & Lue, N. (2006). The structure and function of telomerase reverse transcriptase. *Annu Rev Biochem, 75*, 493-517.

Aydin, F., Aydin, I., Erdogan, S., Akba, O., Isik, B., & Hamamci, C. (2012). Chemical Characteristics of Settled Particles during a Dust-Storm. *Pol. J. Environ. Stud., 21*, 533-537.

Baccarelli, A., & Bollati, V. (2009). Epigenetics and environmental chemicals. *Current Opinion in Pediatrics, 21*, 243–251.

Baccarelli, A., Wright, R., Bollati, V., Tarantini, L., Litonjua, A., Suh, H., et al. (2009). Rapid DNA Methylation Changes after Exposure to Traffic Particles. *Am J Respir Crit Care Med, 179*, 572–578.

Bachand, F., & Autexier, C. (1999). Le rôle de la télomérase et des télomères dans l'immortalisation cellulaire. *médecine/sciences, 15*, 1286-1291.

Bakkenist, C., & Kastan, M. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature, 421*, 499-506.

Banáth, J., Macphail, S., & Olive, P. (2004). Radiation sensitivity, H2AX phosphorylation, and kinetics of repair of DNA strand breaks in irradiated cervical cancer cell lines. *Cancer Res, 64*, 7144-7149.

Barrado, A., García, S., Barrado, E., & Pérez, R. (2012). PM2.5-bound PAHs and hydroxy-PAHs in atmospheric aerosol samples: Correlations with season and with physical and chemical factors. *Atmospheric Environment, 49*, 224-232.

Bassart, E. (2006). Anatomie-Physiologie. http://brassart.iut-amiens.fr/perso/fichier/N4_anatomie_juin_2006.pdf .

Bassing, C., & Alt, F. (2004). The cellular response to general and programmed DNA double strand breaks. *DNA Repair , 3*, 781–796.

Baulig, A., Singh, S., Marchand, A., Schins, R., Barouki, R., Garlatti, M., et al. (2009). Role of Paris PM2.5 components in the pro-inflammatory response induced in airway epithelial cells. *Toxicology, 261*, 126–135.

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. *Toxicology in Vitro, 17*, 567–573.

Berezikov, E., Chung, W., Willis, J., Cuppen, E., & Lai, E. (2007). Mammalian mirtron genes. *Mol Cell, 28*, 328-336.

Bernstein, J., Alexis, N., Bacchus, H., Bernstein, I., Fritz, P., Horner, E., et al. (2008). The health effects of nonindustrial indoor air pollution. *The Journal of Allergy and Clinical immunology, 121*, 585-591.

BéruBé, K., Prytherch, Z., Job, C., & Hughes, T. (2010). Human primary bronchial lung cell constructs: The new respiratory models. *Toxicology, 278*, 311–318.

Bhalla, A., Mahi, S., Sharma, N., & Singh, S. (2011). Glycopyrrolate in toxic exposure to ammonia gas. *J Emerg Trauma Shock, 4*, 140–141.

Billet, S., Abbas, I., Le Goff, J., Verdin, A., André, V., Lafargue, P., et al. (2008). Genotoxic potential of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons-coated onto airborne Particulate Matter (PM2.5) in human lung epithelial A549 cells. *Cancer Letters, 270*, 144–155.

Binková, B., Cerná, M., Pastorková, A., Jelínek, R., Benes, I., Novák, J., et al. (2003). Biological activities of organic compounds adsorbed onto ambient air particles: comparison between the cities of Teplice and Prague during the summer and winter seasons 2000-2001. *Mutat Res, 525*, 43-59.

Bock, K., Raschko, F., Gschaidmeier, H., Seidel, A., Oesch, F., Grove, A., et al. (1999). Mono- and diglucuronide formation from benzo[a]pyrene and chrysene diphenols by AHH-1 cell-expressed UDP-glucuronosyltransferase UGT1A7. *Biochemical Pharmacology, 57*, 653-656.

Bodian, D., & Howe, H. A. (1941a). Experimental studies on intraneural spread of poliomyelitis virus. *Bulletin of the Johns Hopkins Hospital , 68*, 248–267.

Bodian, D., & Howe, H. A. (1941b). The rate of progression of poliomyelitis virus in nerves. *Bulletin of the Johns Hopkins Hospital, 69*, 79–85.

Bodin, N., Abarnou, A., Fraisse, D., Defour, S., Loizeau, V., & Le Guellec, A.-M. P. (2007b). PCB, PCDD/F and PBDE levels and profiles in crustaceans from the coastal waters of Brittany and Normandy (France). *Marine Pollution Bulletin, 54*, 657–668.

Bollati, V., Marinelli, B., Apostoli, P., Bonzini, M., Nordio, F., Hoxha, M., et al. (2010). Exposure to Metal-Rich Particulate Matter Modifies the Expression of Candidate MicroRNAs in Peripheral Blood Leukocytes. *Environmental Health Perspectives, 118*, 763-768.

Borgen, A., Darvey, H., Castagnoli, N., Crocker, T., Rasmussen, R., & Wang, I. (1973). Metabolic conversion of benzo[a]pyrene by Syrian hamster liver microsomes and binding of metabolites to deoxyribonucleic acid. *Journal of Medicinal Chemistry , 16*, 502-506.

Borgie, M., Garat, A., Cazier, F., Delbende, A., Allorge, D., Ledoux, F., et al. (2014). Traffic-related air pollution. A pilot exposure assessment in Beirut, Lebanon. *Chemosphere, 96*, 122–128.

Bougiatioti, A., Zarmpas, P., Koulouri, E., Antoniou, M., Theodosi, C., Kouvarakis, G., et al. (2013). Organic, elemental and water-soluble organic carbon in size segregated aerosols, in the marine boundary layer of the Eastern Mediterranean. *Atmospheric Environment, 64*, 251-262.

Brambilla, E. (2009b). Modifications épigénétiques dans le cancer du poumon. *Annales de pathologie, 29S*, S31-S33.

Brauze, D. (2004). Comparison of the induction of a 4S β-naphthoflavone-binding protein, cytochrome P450 1A1 and NAD(P)H:quinone oxidoreductase in β-naphthoflavone-treated rats. *Toxicology Letters, 152*, 111–116.

Brauze, D., Widerak, M., Cwykiel, J., Szyfter, K., & Baer-Dubowska, W. (2006). The effect of aryl hydrocarbon receptor ligands on the expression of AhR, AhRR, ARNT, Hif1α, CYP1A1 and NQO1 genes in rat liver. *Toxicology Letters, 167*, 212–220.

Brigden, K., Stringer, R., & Santillo, D. (2002). Heavy metal and radionuclide contamination of fertilizer products and phosphogypsum waste produced by the Lebanese Chemical Company, Lebanon, 2002. Greenpeace Research Laboratories - Department of Biological Sciences. University of Exter (UK).

Brown, J., Zeman, K., & Benneth, W. (2002). Ultrafine particle deposition and clearance in the healthy and obstructed lung. *Am J Resp Crit Care Med, 166*, 1240-1247.

Brunekreef, B., & Holgate, S. (2002). Air pollution and health. *Lancet, 360*, 1233–1242.

Bryan, T., Englezou, A., Gupta, J., Bacchetti, S., & Reddel, R. (1995). Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *Embo J, 14*, 4240 4248.

Büchner, N., Ale-Agha, N., Jakob, S., Sydlik, U., Kunze, K., Unfried, K., et al. (2013). Unhealthy diet and ultrafine carbon black particles induce senescence and disease associated phenotypic changes. *Experimental Gerontology, 48*, 8–16.

Burczynski, M., & Penning, T. (2000). Genotoxic Polycyclic Aromatic Hydrocarbon ortho-Quinones Generated by Aldo-Keto Reductases Induce CYP1A1 via Nuclear Translocation of the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Cancer Res, 60*, 908-915.

Bushati, N., & Cohen, S. (2007). microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol, 23*, 175-205.

Cairney, C., & Keith, W. (2008). Telomerase redefined: integrated regulation of hTR and hTERT for telomere maintenance and telomerase activity. *Biochimie, 90*, 13-23.

Calderón-Garcidueñas, L., Azzarelli, B., Acuna, H., Garcia, R., Gambling, T., Osnaya, N., et al. (2003). Air pollution and brain damage. *Toxicol Path, 30*, 373-389.

Cao, Y., Li, H., Deb, S., & Liu, J. (2002). TERT regulates cell survival independent of telomerase enzymatic activity. *Oncogene, 21*, 3130-3138.

Carazo Fernández, L., Fernández Alvarez, R., González-Barcala, F., & Rodríguez Portal, J. (2013). Indoor air contaminants and their impact on respiratory pathologies. *Arch Bronconeumol , 49*, 22–27.

Carvalho, T., Peters, J., & Williams III, R. (2011). Influence of particle size on regional lung deposition – What evidence is there? *International Journal of Pharmaceutics, 406*, 1–10.

Cavalieri, E., & Rogan, E. (1985). Role of Radical Cations in Aromatic Hydrocarbon Carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives, 64*, 69-84.

Cavanagh, J., Trought, K., Brown, L., & Duggan, S. (2009). Exploratory investigation of the chemical characteristics and relative toxicity of ambient air particulates from two New Zealand cities. *Science of the Total Environment, 407*, 5007–5018.

Cech, T., & Lingner, J. (1997). Telomerase and the chromosome end replication problem. *Ciba Foundation symposium , 211*, 20-34.

Chang, H., Chang, L., Cheng, Y., Tsai, W., Tsai, M., & Lin, P. (2006). Preferential induction of CYP1A1 and CYP1B1 in CCSP-positive cells. *Toxicol.Sci, 89*, 205-213.

Chang, K., Jeng, F., Tsai, Y., & Lin, P. (2000). Modeling of long-range transport on Taiwan's acid deposition under di!erent weather conditions. *Atmospheric Environment, 34*, 3281-3295.

Chao, M., Hu, C., Chen, Y., Chang-Chien, G., Lee, W., Chang, L., et al. (2004). Approaching gas–particle partitioning equilibrium of atmospheric PCDD/Fs with increasing distance from an incinerator: measurements and observations on modeling. *Atmospheric Environment, 38*, 1501–1510.

Chelala, C. (2008). Transports routiers et pollution de l'air en NO2 dans Beyrouth (Liban), application du modèle Street. Thèse de l'Université Saint-Joseph de Beyrouth.

Chen, J., Blasco, M., & Greider, C. (2000). Secondary structure of vertebrate telomerase RNA. *Cell, 100*, 503-514.

Chen, K., Lee, L., Yu, C., Lee, Y., Kuo, S., & Yang, P. (2006). Elevation of telomerase activity positively correlates to poor prognosis of patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Letters, 240*, 148–156.

Chen, L., Devanesan, P., Higginbotham, S., Ariese, F., Jankowiak, R., Small, G., et al. (1996). Expanded Analysis of Benzo[a]pyrene−DNA Adducts Formed in Vitro and in Mouse Skin: Their Significance in Tumor Initiation. *Chemical Research in Toxicology, 9*, 897-903.

Chen, Y., Knösel, T., Kristiansen, G., Pietas, A., Garber, M., Matsuhashi, S., et al. (2003). Loss of PDCD4 expression in human lung cancer correlates with tumour progression and prognosis. *J Pathol, 200*, 640–646.

Chen, Z., Ma, T., Huang, C., Zhang, L., Lv, X., Xu, T., et al. (2013). MiR-27a modulates the MDR1/P-glycoprotein expression by inhibiting FZD7/β-catenin pathway in hepatocellular carcinoma cells. *Cellular Signalling, 25*, 2693–2701.

Cheng, Y., Liu, X., Zhang, S., Lin, Y., Yang, J., & Zhang, C. (2009). MicroRNA-21 protects against the H2O2-induced injury on cardiac myocytes via its target gene PDCD4. *J Mol Cell Cardiol, 47*, 5–14.

Chester, R., Nimmo, M., & Preston, M. (1999). The trace metal chemistry of atmospheric dry deposition samples collected at Cap Ferrat: a coastal site in the Western Mediterranean. *Marine Chemistry, 68*, 15–30.

Chuang, H., Cheng, Y., Lei, Y., Chang, H., & Cheng, T. (2013). Protective effects of pulmonary epithelial lining fluid on oxidative stress and DNA single-strand breaks caused by ultrafine carbon black, ferrous sulphate and organic extract of diesel exhaust particles. *Toxicology and Applied Pharmacology, 266*, 329–334.

CIRE-Rhône-Alpes. (2010). La cellule de l'InVS en région (Cire)-Rhône-Alpes. République française.

Cong, Y., Wen, J., & Bacchetti, S. (1999). The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter. *Human molecular genetics, 8*, 137 142.

Cong, Y., Wright, W., & J.W., S. (2002). Human Telomerase and Its Regulation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews , 66*, 407–425.

Cooper, C., Grover, P., & Sims, P. (1983). The metabolism and activation of benzo[a]pyrene. *Progress in Drug Metabolism, 7*, 295-396.

Corsten, M., Miranda, R., Kasmieh, R., Krichevsky, A., Weissleder, R., & Shah, K. (2007). MicroRNA-21 knockdown disrupts glioma growth in vivo and displays synergistic cytotoxicity with neural precursor cell delivered S-TRAIL in human gliomas. *Cancer Res, 67*, 8994-9000.

Counter, C., Avilion, A., LeFeuvre, C., Stewart, N., Greider, C., Harley, C., et al. (1992). Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *The EMBO journal, 11*, 1921-1929.

Cuccia, E., Massabò, D., Ariola, V., Bove, M., Fermo, P., Piazzalunga, A., et al. (2013). Size-resolved comprehensive characterization of airborne particulate matter. *Atmospheric Environment, 67*, 14e26.

Daher, N., Saliba, N., Shihadeh, A., Jaafar, M., Baalbaki, R., & Sioutas, C. (2013). Chemical composition of size-resolved particulate matter at nearfreeway and urban background sites in the greater Beirut area. *Atmospheric Environment, 80*, 96-106.

Dai, W., Chen, H., Yu, R., He, L., Chen, B., & Chen, X. (2010). Effects of cadmium on telomerase activity, expressions of TERT, c-myc and P53, and apoptosis of rat hepatocytes. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. med. Sci, 30*, 709-713.

Dall'Osto, M., Harrison, R., Highwood, E., O'Dowd, C., Ceburnis, D., Querol, X., et al. (2010). Variation of the mixing state of Saharan dust particles with atmospheric transport. *Atmospheric Environment, 44*, 3135-3146.

d'Almeida, G., Koepke, P., & Shettle, E. (1991). Atmospheric Aerosols, Global Climatology and Radiative Characteristics. Deepak Publishing, Virginia.

Dasgupta, P., Campbell, S., Al-Horr, R., Rahmat Ullah, S., Li, J., Amalfitano, C., et al. (2007). Conversion of sea salt aerosol to NaNO3 and the production of HCl: Analysis of temporal behavior of aerosol chloride/nitrate and gaseous HCl/HNO3 concentrations with AIM. *Atmospheric Environment, 41*, 4242–4257.

Davidson, B., & McCray, P. (2011). Current prospects for RNA interference-based therapies. *Nat Rev Genet, 12*, 329-340.

De Bock, L., Van Malderen, H., & R, V. G. (1994). Individual Aerosol Particle Gomposition Variations in Air Masses Grossing the North Sea. *Environmental Science & Technology, 28*, 1513-1520.

de Lange, T. (2002). Protection of mammalian telomeres. *Oncogene, 21*, 532-540.

de Lorenzo, A. (1970). The olfactory neurron and the blood-brain barrier. *Taste and smell in vertebrates. Wolstenholme G, Knight J, eds: J and A. Churchill.* , 151-176.

Delmas, Méguie, & Peuch. (2007). Physique et chimie de l'atmosphère, Belin.

den Hartigh, L., Lamé, M., Hamc, W., Kleeman, M., Tablin, F., & Wilson, D. (2010). Endotoxin and polycyclic aromatic hydrocarbons in ambient fine particulate matter from Fresno, California initiate human monocyte inflammatory responses mediated by reactive oxygen species. *Toxicology in Vitro, 24*, 1993–2002.

Dergham, D., Lepers, C., Verdin, A., Billet, S., Cazier, F., Courcot, D., et al. (2012). Prooxidant and Proinflammatory Potency of Air Pollution Particulate Matter (PM2.5−0.3) Produced in Rural, Urban, or Industrial Surroundings in Human Bronchial Epithelial Cells (BEAS-2B). *Chemical Research in Toxicology, 25*, 904−919.

Dieme, D., Cabral-Ndior, M., Garçon, G., Verdin, A., Billet, S., Cazier, F., et al. (2012). Relationship between physicochemical characterization and toxicity of fine particulate matter (PM2.5) collected in Dakar city (Senegal). *Environmental Research, 113*, 1–13.

Djoundourian, S., Nuwayhid, I., & Chaaban, F. (1999). The Social and Economic Impacts of Mobile Source Pollution on Public Health in Greater Beirut, Lebanon. Final Report. Report prepared under METAPIII/MedPolicies Initiatives. .

Doetzlhofer, A., Rotheneder, H., Lagger, G., Koranda, M., Kurtev, V., Brosch, G., et al. (1999). Histone deacetylase 1 can repress transcription by binding to Sp1. *Molecular and cellular biology, 19*, 5504-5511.

Dolovich, M. (2000). Influence of inspiratory flow rate, particle size, and airway caliber on aerosolized drug delivery to the lung. *Respir. Care, 45*, 597–608.

Dominici, F., McDermott, A., Daniels, M., Zeger, S. L., & Samet, J. M. (2005). Revised analyses of the National Morbidity, Mortality, and Air Pollution Study: mortality among residents of 90 cities. *J Toxicol Environ Health, 68*, 1071-92.

Douki, T., Ksoury, Z., Marie, C., Favier, A., Ravanat, J., & Maitre, A. (2008). Genotoxicity of combined exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and UVA - A mechanistic study. *Photochemistry and Photobiology, 84*, 1133-1140.

Draxler, R. R., & Rolph, G. D. (2013). Hybrid Single-Particle Lagrangian Integrated Trajectory. (National Oceanic and Atmospheric Administration) Retrieved Juin 23, 2012, from http://ready.arl.noaa.gov/HYSPLIT.php.

Duong, A., Steinmaus, C., McHale, C., Vaughan, C., & Zhang, L. (2011). Reproductive and developmental toxicity of formaldehyde: A systematic review. *Mutation Research, 728*, 118–138.

Dupre, A., Boyer-Chatenet, L., & Gautier, J. (2006). Two-step activation of ATM by DNA and the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Nat Struct Mol Biol, 13*, 451-457.

El-Fadel, M., & Bou-Zeid, E. (1999). Transportation GHG emissions in developing countries. The case of Lebanon. *Transportation Research Part D, 4*, 251-264.

El-Fadel, M., & Bou-Zeid, E. (2000). Transportation emissions in Lebanon: Extent and mitigation. Fifth International Conference on Urban Transport and the Environment for the 21st Century Southampton, GB, Wessex Institute of Technology. 149-158.

El-Fadel, M., & Massoud, M. (2000). Particulate matter in urban areas: health-based economic assessment. *The Science of the Total Environment, 257*, 133]146.

El-Fadel, M., Abi-Esber, L., & Ayash, T. (2009). Managing emissions from highly industrialized areas: Regulatory compliance under uncertainty. *Atmospheric Environment, 43*, 5015–5026.

El-Fadel, M., Abou Najm, M., & Sbayti, H. (1999). Air Quality Modeling at Grade Separation Intersections in Greater Beirut Area, American. University of Beirut, Department of Civil and Environmental Engineering.

El-Fadel, M., Zeinati, M., & Jamali, D. (2000a). Framework for environmental impact assessment in Lebanon. *Environmental Impact Assessment Review, 20*, 579–604.

El-Fadel, M., Zeinati, M., Ghaddar, N., & Mezher, T. (2001). Uncertainty in estimating and mitigating industrial related GHG emissions. *Energy Policy, 29*, 1031–1043.

Elichegaray, C., Bouallala, S., Maitre, A., & Ba, M. (2010). État et évolution de la pollution atmosphérique. *Revue française d'allergologie, 50*, 381–393.

Elyakim, E., Sitbon, E., Faerman, A., Tabak, S., Montia, E., Belanis, L., et al. (2010). hsa-miR-191 is a candidate oncogene target for hepatocellular carcinoma therapy. *Cancer Research, 70*, 8077-8087.

El-Zein, A., Nuwayhid, I., El-Fadel, M., & Mroueh, S. (2007). Did a ban on diesel-fuel reduce emergency respiratory admissions for children? *Science of the Total Environment, 384*, 134–140.

Engelhardt, M., Drullinsky, P., Guillem, J., & Moore, M. (1997). Telomerase and Telomere Lenghtine the Development and Progression of Premalignant Lesions to Colorectal cancer. *Clinical Cancer Research, 3*, 1931-1941.

Engels, W., Johnson-Schlitz, D., Eggleston, W., & Sved, J. (1990). High-frequency P element loss in Drosophila is homolog dependent. *Cell, 62*, 515-525.

ERS. (2010). Euroean Respiratory society. Qualité de l'air et santé.

Evagelopoulos, V., Albanis, T., Asvesta, A., & Zoras, S. (2010). Polycylcic Aromatic Hydrocarbon (PAHs) In Fine And Coarse Particles . *Global NEST Journal, 12*, 63-70.

Evans, B., Karchner, S., Allan, L. .., Pollenz, R., Tanguay, F., Jenny, M., et al. (2008). Repression of Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR) Signaling by AHR Repressor: Role of DNA Binding and Competition for AHR Nuclear Translocator. *Mol Pharmacol, 73*, 387–398.

Evans, K., Halterman, J., Hopke, P., Fagnano, M., & Rich, D. (2014). Increased ultrafine particles and carbon monoxide concentrations are associated with asthma exacerbation among urban children. *Environmental Research, 129*, 11-19.

Fehrenbach, H. (2001). Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. *Respir Res, 2*, 33-46.

Feng, J., Funk, W., Wang, S., Weinrich, S., Avilion, A., Chiu, C., et al. (1995). The RNA component of human telomerase. *Science, 269*, 1236-1241.

Fontan, J. (2003). Les pollutions de l'air. Les connaître pour les combattre. Vuibert.

Franck, U., Odeh, S., Wiedensohler, A., Wehner, B., & Herbarth, O. (2011). The effect of particle size on cardiovascular disorders — The smaller the worse. *Science of the Total Environment, 409*, 4217–4221.

Franklin, S., & Zweidler, A. (1977). Non-allelic variants of histones 2a, 2b and 3 in mammals . *Nature, 266*, 273-275.

Frezzetti, D., De Menna, M., Zoppoli, P., Guerra, C., Ferraro, A., AM., B., et al. (2011). Upregulation of miR-21 by Ras in vivo and its role in tumor growth. *Oncogene, 30*, 275-286.

Frias, C., pampalona, J., Genesca, A., & Tusell, L. (2012). Telomere dysfunction and genome instability. *Front Biosci, 17*, 2181-2196.

Friedman, R., Farh, K., Burge, C., & Bartel, D. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res, 19*, 92-105.

Fuentes-Mattei, E., Rivera, E., Gioda, A., Sanchez-Rivera, D., Roman-Velazquez, F., & Jimenez-Velez, B. (2010). Use of human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) to study immunological markers resulting from exposure to PM2.5 organic extract from Puerto Rico. *Toxicology and Applied Pharmacology, 243*, 381–389.

Fujita, S., Ito, T., Mizutani, T., Minoguchi, S., Yamamichi, N., Sakurai, K., et al. (2008). MiR-21 Gene expression triggered by AP-1 is sustained through a double-negative feedback mechanism. *J Mol Biol, 378*, 492–504.

Gabriely, G., Wurdinger, T., Kesari, S., Esau, C., Burchard, J., Linsley, P., et al. (2008). MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators. *Mol Cell Biol, 28*, 5369–5380.

Garcia-Canton, C., Minet, E., Anadon, A., & Meredith, C. (2013). Metabolic characterization of cell systems used in in vitro toxicology testing: Lung cell system BEAS-2B as a working example. *Toxicology in Vitro, 27*, 1719–1727.

Garçon, G., Gosset, P., Maunit, B., Casset, A., Hannothiaux, M., Muller, J., et al. (2003). Mécanismes celluaires de la synérgie d'action de polluants atmosphériques (Fe2O3 et HPA) dans l'apparition du cancer broncho-pulmonaire . *Revue Française des Laboratoires*.

Gasparotto, J., Somensi, N., Caregnato, F., Rabelo, T., DaBoit, K., Oliveira, M., et al. (2013). Coal and tire burning mixtures containing ultrafine and nanoparticulate materials induce oxidative stress and inflammatory activation in macrophages. *Science of the Total Environment, 463–464*, 743–753.

Geiser, M., Rothen-Rutishauser, B., Kapp, N., Schürch, S., Kreyling, W., Schulz, H., et al. (2005). Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environ Health Perspect, 113*, 1555-1560.

Gelmini, S., Crisci, A., Salvadori, B., Pazzagli, M., Selli, C., & Orlando, C. (2000). Comparison of Telomerase Activity in Bladder Carcinoma and Exfoliated Cells Collected in Urine and Bladder Washings, Using a Quantitative Assay. *Clinical Cancer Research, 6*, 2771–2776.

Gerard, J. (2009). GHG inventory report: Synthesis.

Germann, W., & Stanfield, C. (2004). Principles of Human Physiology. Benjamin Cummings, New York.

Gietl, J. K., Lawrence, R., Thorpe, A. J., & Harrison, R. M. (2010). Identification of brake wear particles and derivation of a quantitative tracer for brake dust at a major road. *Atmospheric Environment, 44*, 141-146.

Giraldez, A. J., Mishima, Y., Rihel, J., Grocock, R., Van Dongen, S., Inoue, K., et al. (2006). Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science, 312*, 75-79.

Gire, V., Roux, P., Wynford-Thomas, D., Brondello, J., & Dulic, V. (2004). DNA damage checkpoint kinase Chk2 triggers replicative senescence. *EMBO J, 23*, 2554–2563.

Glatt, H. (2000). Sulfotransferases in the bioactivation of xenobiotics. *Chemico-Biological Interactions, 129*, 141-170.

Glavas, S., Nikolakis, P., Ambatzoglou, D., & Mihalopoulos, N. (2008). Factors affecting the seasonal variation of mass and ionic composition of PM2.5 at a central Mediterranean coastal site. *Atmospheric Environment, 42*, 5365-5373.

Gorgoulis, V., Vassiliou, L., Karakaidos, P., Zacharatos, P., Kotsinas, A., Liloglou, T., et al. (2005). Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature, 434*, 907-913.

Grahame, T., & Schlesinger, R. (2012). Oxidative stress-induced telomeric erosion as a mechanism underlying airborne particulate matter-related cardiovascular disease. *Particle and Fibre Toxicology, 9*.

Gualtieri, M., Mantecca, P., Corvaja, V., Longhin, E., Perrone, M. G., Bolzacchini, E., et al. (2009). Winter fine particulate matter from Milan induces morphological and functional alterations in human pulmonary epithelial cells (A549). *Toxicology Letters, 188*, 52–62.

Gualtieri, M., Øvrevik, J., Mollerup, S., Asare, N., Longhin, E., Dahlman, H., et al. (2011). Airborne urban particles (Milan winter-PM2.5) cause mitotic arrest and cell death: Effects on DNA, mitochondria, AhR binding and spindle organization. *Mutation Research, 713*, 18-31.

Haarmann-Stemmann, T., & Abel, J. (2006). The arylhydrocarbon receptor repressor (AhRR): structure, expression, and function. *Biol Chem, 387*, 1195-1199.

Haarmann-Stemmann, T., Bothe, H., Kohli, A., Sydlik, U., Abel, J., & Fritsche, E. (2007). Analysis of the Transcriptional Regulation and Molecular Function of the Aryl Hydrocarbon Receptor Repressor in Human Cell Lines. *Drug Metabolism and Disposition, 35*, 2262–2269.

Hamilton, R., & Mansfield, T. (1991). Airborne particulate elemental carbon: its sources, transport and contribution to dark smoke and soiling. . *Atmos. Environ, 25A*, 715-723.

Happo, M., Salonen, R., Hälinen, A., Jalava, P., Pennanen, A., Kosma, V., et al. (2007). Dose and Time Dependency of Inflammatory Responses in the Mouse Lung to Urban Air Coarse, Fine, and Ultrafine Particles From Six European Cities. *Inhalation Toxicology, 19*, 227–246.

Harley, C. B., Futcher, A. B., & Greider, C. W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature , 345*, 458-460.

Harley, C., Vaziri, H., Counter, C., & Allsopp, R. (1992). The telomere hypothesis of cellular aging. *Experimental gerontology, 27*, 375-382.

Harrison, R. (1996). Pollution, Causes, Effects and Control. Royal Society of Chemistry.

Harvey, R. (1991). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, chemistry and carcinogenicity. New York: Syndicate of the University of Cambridge.

Hashisho, Z., & El-Fadel, M. (2001b). A case study in socio-economic benefits of the phase-out of leaded gasoline: the case of Lebanon. *Environmental Management and Health, 12*, 389-406.

Hatley, M., Patrick, D., Garcia, M., Richardson, J., Bassel-Duby, R., van Rooij, E., et al. (2010). Modulation of K-Ras-Dependent Lung Tumorigenesis by MicroRNA-21. *Cancer Cell, 18*, 203-205.

Hayflick, L. (1965). The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Experimental cell research, 37*, 614-636.

Hidy, G. (1984). Aerosols: an Industrial and Environmental Science. Academic Press.

Hiyama, E., Gollahon, L., Kataoka, T., Kuroi, K., Yokoyama, T., Gaidar, A., et al. (1996). Telomerase Activity in Human Breast Tumors. *Journal of the National Cancer Institute, 88*, 116-122.

Hodgson, E. (2004). A textbook of modern toxicology. By John Wiley & Sons, Inc.

Hodzic, A., Bessagnet, B., & R., V. (2006). A model evaluation of coarse-mode nitrate heterogeneous formation on dust particles. *Atmospheric Environment, 40*, 4158–4171.

Hou, L., Wang, S., Dou, C., Zhang, X., Yu, Y., Zheng, Y., et al. (2012). Air pollution exposure and telomere length in highly exposed subjects in Beijing, China: A repeated-measure study. *Environment International, 48*, 71–77.

Hutchison, G., Brown, D., Hibbs, L., Heal, M., Donaldson, K., Maynard, R., et al. (2005). The effect of refurbishing a UK steel plant on PM10 metal composition and ability to induce inflammation. *Respiratory Research, 6*.

Hwang, H., & Ro, C. (2006). Direct observation of nitrate and sulfate formations from mineral dust and sea-salts using low-Z particle electron probe X-ray microanalysis. *Atmospheric Environment, 40*, 3869–3880.

IARC. (2010). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 92. Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures.

IARC. (2012). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Chemical agents and related occupations. Volume 100 F. A review of human carcinogens.

INERIS. (2005). Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques, Dioxines.

INERIS. (2005). Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques, polychlorobiphényles.

INERIS. (2011). Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques, SO2.

INRS. (2006). Institut National de Recherche dt de Sécurité. le point des connaissances ED 5024, Dioxines et furanes.

Inserm. (2001). Susceptibilités génétiques et expositions professionnelles. Rapport. Paris : Les éditions Inserm, XII- 143 p. - (Expertise collective). - http://hdl.handle.net/10608/179.

Izzotti, A., Calin, G., Arrigo, P., Steele, V., Croce, C., & De Flora, S. (2009). Downregulation of microRNA expression in the lungs of rats exposed to cigarette smoke. *The FASEB Journal, 23*, 806-812.

Jacob, J., & Grimmer, G. (1996). Metabolism and excretion of polycyclic aromatic hydrocarbons in rat and in human. *Central European journal of public health , 4 Suppl*, 33-39.

Jaenicke, R. (1993). Tropospheric aerosols. *Aerosol Cloud Climate Interactions (P.V. Hobbs, ed.), Academic Press, San Diego,* , 1-31.

Jalava, P., Salonen, R., Hälinen, A., Penttinen, P., Pennanen, A., Sillanpää, M., et al. (2006). In vitro inflammatory and cytotoxic effects of size-segregated particulate samples collected during long-range transport of wildfire smoke to Helsinki. *Toxicology and Applied Pharmacology, 215*, 341–353.

Jalava, P., Salonen, R., Nuutinen, K., Pennanen, A., Happo, M., Tissari, J., et al. (2010). Effect of combustion condition on cytotoxic and inflammatory activity of residential wood combustion particles. *Atmospheric Environment, 44*, 1691e1698.

Jalava, P., Salonen, R., Pennanen, A., Sillanpää, M., Hälinen, A., Happo, M., et al. (2007). Heterogeneities in Inflammatory and Cytotoxic Responses of RAW 264.7 Macrophage Cell Line to Urban Air Coarse, Fine, and Ultrafine Particles From Six European Sampling Campaigns. *Inhalation Toxicology, 19*, 213–225.

Jardim, M. (2011). microRNAs: Implications for air pollution research. *Mutation Research, 717*, 38-45.

Jardim, M. J., Fry, R. C., Jaspers, I., Dailey, L., & Diaz-Sanchez, D. (2009). Disruption of MicroRNA Expression in Human Airway Cells by Diesel Exhaust Particles Is Linked to Tumorigenesis-Associated Pathways. *Environmental Health Perspectives, 117*, 1745–1751.

Jaurand, M., Marano, F., Wallaërt, B., Gosset, P., & Haddad-Romet, S. (1995). Toxicité respiratoire in vitro. *in Toxicologie cellulaire in vitro - Méthodes et applications, de M. Adolphe, Guillouzo, A., et Marano, F. (Eds) , 9*, 237-283.

Jeggo, P., & Löbrich, M. (2007). DNA double-strand breaks: their cellular and clinical impact? *Oncogene, 26*, 7717–7719.

Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., & Ward, E. (2010). Cancer Statistics, 2010. *American Cancer Society, 60*, 277-300.

Jernstrom, B., Funk, M., Frank, H., Mannervik, B., & Seidel, A. (1996). Carcinogenesis: Glutathione S-transferase A1-1-catalysed conjugation of bay and fjord region diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons with glutathione. *Carcinogenesis , 17*, 1491-1498.

Jiang, H., Gelhaus, S., Mangal, D., Harvey, R., Blair, I., & Penning, T. (2007). Metabolism of benzo[a]pyrene in human bronchoalveolar H358 cells using liquid chromatography-mass spectrometry. *Chemical Research in Toxicology, 20*, 1331-1341.

Jirtle, R., & Skinner.M.K. (2007). Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nature Reviews Genetics, 8*, 253-262.

Joseph, P., & Jaiswal, A. (1994). NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 (DT diaphorase) specifically prevents the formation of benzo[a]pyrene quinone-DNA adducts generated by cytochrome P4501A1 and P450 reductase. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA, 91*, 8413-8417.

Kalderon-Asael, B., Erel, Y., Sandler, A., & Dayan, U. (2009). Mineralogical and chemical characterization of suspended atmospheric particles over the east Mediterranean based on synoptic-scale circulation patterns. *Atmospheric Environment, 43*, 3963-3970.

Karam, G. .., & Tabbara, M. (2004). Air quality management and estimated health impact of pollutants in urban and industrial areas. Chekka and Koura region. American University of Beirut – USAID. http://chekka.info/pollutioninchekkanews.htm.

Karanasiou, A., Siskos, P., & Eleftheriadis, K. (2009). Assessment of source apportionment by Positive Matrix Factorization analysis on fine and coarse urban aerosol size fractions. *Atmospheric Environment, 43*, 3385–3395.

Karlseder, J., Smogorzewska, A., & de Lange, T. (2002). Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. *Science (New York, NY), 295*, 2446-2449.

Katsouyanni, K., Touloumi, G., Spix, C., & al. (1997). Short term effects of ambient sulphur dioxide and particulate matter on mortality in 12 European cities : results from time series data from the APHEA project. *British Medical Journal, 314*, 1658-63.

Kawanishi, M., Watanabe, T., Hagio, S., Ogo, S., Shimohara, C., Jouchi, R., et al. (2009). Genotoxicity of 3,6-dinitrobenzo[e]pyrene, a novel mutagen in ambient air and surface soil, in mammalian cells in vitro and in vivo. *Mutagenesis, 24*, 279-284.

Keeney, S., & Neale, M. (2006). Initiation of meiotic recombination by formation of DNA double-strand breaks: mechanism and regulation. *Biochem Soc Trans, 34*, 523-525.

Kelleher, C., Teixeira, M., Forstemann, K., & Lingner, J. (2002). Telomerase: biochemical considerations for enzyme and substrate. *Trends in biochemical sciences, 27*, 572-579.

Kelly, F., & Fussell, J. (2011). Air pollution and airway disease. *Clinical & Experimental Allergy, 41*, 1059-1071.

Kfoury, A. (2013). Origine et physicochimie des particules atmosphériques PM2.5 dans des villes du littoral de la région Nord-Pas-de-Calais. Thèse de l'Université du Littoral Côte d'Opale.

Kfoury, A., Ledoux, F., El Khoury, B., El Nakat, H., Nouali, H., Cazier, F., et al. (2009). A Study Of The Inorganic Chemical Composition Of Atmospheric Particulate Matter In The Region Of Chekka, North Lebanon. *Lebanese Science Journal, 10*.

Khanna, K., & Jackson, S. (2001). DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat. Genet, 27*, 247–254.

Khvorova, A., Reynolds, A., & Jayasena, S. D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell, 115*, 209-216.

Kilian, A., Bowtell, D., Abud, H., Hime, G., Venter, D., Keese, P., et al. (1997). Isolation of a candidate human telomerase catalytic subunit gene, which reveals complex splicing patterns in different cell types. *Human Molecular genetics, 6*, 2011-2019.

Kim, H., Kim, M., Lee, S., Oh, S., & Chung, K. (2011). Genotoxic effects of silver nanoparticles stimulated by oxidative stress in human normal bronchial epithelial (BEAS-2B) cells. *Mutation Research, 726*, 129-135.

Kim, H., Kwack, S., & Lee, B. (2000). Lipid peroxidation, antioxidant enzymes, and benzo[a]pyrene-quinones in the blood of rats treated with benzo[a]pyrene. *Chemico-Biological Interactions , 127*, 139-150.

Kim, N., Piatyszek, M., Prowse, K., Harley, C., West, M., Ho, P., et al. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science (New York, NY) , 266*, 2011-2015.

Kleinman, M., Araujo, J., Nel, A., Sioutas, C., Campbell, A., Cong, P., et al. (2008). Inhaled ultrafine particulate matter affects CNS inflammatory processes and may act via MAP kinase signaling pathways. *Toxicology Letters, 178*, 127–130.

Kloosterman, W. P., & Plasterk, R. H. (2006). The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev Cell , 11*, 441-450.

Knaapen, A., Shi, T., Borm, P., & Schins, R. (2002). Soluble metals as well as the insoluble particle fraction are involved in cellular DNA damage induced by particulate matter. *Mol Cell Biochem, 234-235*, 317-326.

Kobrossi, R. (2000). Health effects of air pollution in the regions of Koura, Batroun, and Jbeil. Master thesis, American University of Beirut. 155p.

Koçak, M., Kubilay, N., & Mihalopoulos, N. (2004). Ionic composition of lower tropospheric aerosols at a Northeastern Mediterranean site: implications regarding sources andlong-range transport. *Atmospheric Environment, 38*, 2067–2077.

Koçak, M., Mihalopoulos, N., & Kubilay, N. (2007b). Chemical composition of the fine and coarse fraction of aerosols in the northeastern Mediterranean. *Atmospheric Environment, 41*, 7351–7368.

Kouyoumdjian, H., & Saliba, N. A. (2006). Mass concentration and ion composition of coarse and fine particles in an urban area in Beirut: effect of calcium carbonate on the absorption of nitric and sulfuric acids and the depletion of chloride. *Atmos. Chem. Phys, 6*, 1865–1877.

Kroll, J., & Seinfeld, J. (2008). Chemistry of secondary organic aerosol: Formation and evolution of low-volatility organics in the atmosphere. *Atmospheric Environment, 42*, 3593–3624.

Kubilay, N., Nickovic, S., Moulin, C., & Dulac, F. (2000). An illustration of the transport and deposition of mineral dust onto the Eastern Mediterranean. *Atmospheric Environment, 34*, 1293 1303.

Kulshreshtha, R., Ferracin, M., Wojcik, S., Garzon, R., Alder, H., Agosto-Perez, F., et al. (2007). A MicroRNA Signature of Hypoxia. *Molecular and Cellular Biology, 27*, 1859–1867.

Kupiainen, K., Tervahattu, H., Räisänen, M., Mäkelä, T., Aurela, M., & Hillamo, R. (2005). Size and Composition of Airborne Particles from Pavement Wear, Tires, and Traction Sanding. *Environ. Sci. Technol, 39*, 699–706.

Lecomte, T., Laurent-Puig, P., & Loriot, M. (2006). Pharmacogénétique en hépato-gastroentérologie. *Hépato-Gastro, 13*, 275-287.

Ledoux, L., Courcot, L., Courcot, D., Aboukaïs, A., & Puskaric, E. (2006). A summer and winter apportionment of particulate matter at urban and rural areas in northern France. *Atmospheric Research, 82*, 633–642.

Lee, J., & Paull, T. (2005). ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science, 308*, 551-554.

Lee, J., Jong, H., Yoo, C., Koo Han, S., Shim, Y., & Whan Kim, Y. (1998). Telomerase activity in lung cancer cell lines and tissues. *Lung Cancer, 21*, 99–103.

Lee, M., Hande, M., & Sabapathy, K. (2005). Ectopic mTERT expression in mouse embryonic stem cells does not affect differentiation but confers resistance to differentiation- and stress-induced p53-dependent apoptosis. *J Cell Sci, 118*, 819-829.

Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H., et al. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *Embo J , 23*, 4051-4060.

Legassie, J., & Jarstfer, M. (2006). The unmasking of telomerase. *Structure, 14*, 1603-1609.

Lelieveld, J., Berresheim, H., Borrmann, S., Crutzen, P., Dentener, F., Fischer, H., et al. (2002). Global Air Pollution Crossroads over the Mediterranean. *Science, 298*, 794-799.

Lemarteleur, T. (2005). Etude de ligands de l'ADN G-quadruplexe sur la transcription et la prolifération dans des lignées cellulaires humaines. Thèse de l'Université de Reims Champagne Ardenne.

Lepers, C. (2013). Pollution atmosphérique de proximité et toxicité respiratoire : recherche in vitro des mécanismes d'action toxique induits par des aérosols atmosphériques particulaires (PM2.5) industriels, urbains et ruraux. Thèse de l'Université du Littoral Côte d'Opale.

Lepeule, J., Laden, F., Dockery, D., & Schwartz, J. (2012). Chronic Exposure to Fine Particles and Mortality: An Extended Follow-up of the Harvard Six Cities Study from 1974 to 2009. *Environmental Health Perspectives, 120*, 965-970.

Li, J., Kong, X., Zhang, J., Luo, Q., Li, X., & Fang, L. (2013). MiRNA-26b inhibits proliferation by targeting PTGS2 in breast cancer. *Cancer Cell International, 13*.

Li, R., Ning, Z., Cui, J., Khalsa, B., Ai, L., Takabe, W., et al. (2009). Ultrafine particles from diesel engines induce vascular oxidative stress via JNK activation. *Free Radical Biology & Medicine, 46*, 775–782.

Li, S., Rosenberg, J., Donjacour, A., Botchkina, I., Kit Hom, Y., Cunha, G., et al. (2004). Rapid Inhibition of Cancer Cell Growth Induced by Lentiviral Delivery and Expression of Mutant-Template Telomerase RNA and Anti-telomerase Short-Interfering RNA. *Cancer Research, 64*, 4833–4840.

Lin, R., Lin, Y., Chen, J., Kuo, H., Chen, Y., Diccianni, M., et al. (2010). microRNA signature and expression of Dicer and Drosha can predict prognosis and delineate risk groups in neuroblastoma. *Cancer Res , 70*, 7841-7850.

Lin, Y.-C., & Cheng, M.-T. (2007). Evaluation of formation rates of NO2 to gaseous and particulate nitrate in the urban atmosphere. *Atmospheric Environment, 41*, 1903–1910.

Linares, C., & Dıaz, J. (2010). Short-term effect of concentrations of fine particulate matter on hospital admissions due to cardiovascular and respiratory causes among the over-75 age group in Madrid, Spain. *Public Health, 124*, 23-36.

Lingner, J., Hughes, T., Shevchenko, A., Mann, M., Lundblad, V., & Cech, T. (1997). Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science (New York, NY), 276*, 561-567.

Liu, X., Sempere, L., Guo, Y., Korc, M., Kauppinen, S., Freemante, S., et al. (2011). Involvement of microRNAs in lung cancer biology and therapy. *Translational Research, 157*, 200–208.

Lopatina, N., Poole, J., Saldanha, S., Hansen, N., Key, J., Pita, M., et al. (2003). Control mechanisms in the regulation of telomerase reverse transcriptase expression in differentiating human teratocarcinoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications, 306*, 650-659.

Lu, S., Feng, M., Yao, Z., Jing, A., Yufang, Z., Wu, M., et al. (2011). Physicochemical characterization and cytotoxicity of ambient coarse, fine, and ultrafine particulate matters in Shanghai atmosphere. *Atmospheric Environment, 45*, 736e744.

Lu, T., Munitz, A., & Rothenberg, M. (2009). MicroRNA-21 Is Up-Regulated in Allergic Airway Inflammation and Regulates IL-12p35 Expression. *The Journal of Immunology, 182*, 4994–5002.

Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E., & Kutay, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science , 303*, 95-98.

Ly, H., Blackburn, E., & Parslow, T. (2003). Comprehensive structure-function analysis of the core domain of human telomerase RNA. *Molecular and cellular biology, 23*, 6849-6856.

Ma, Y., Yu, S., Zhao, W., Lu, Z., & Chen, J. (2010). miR-27a regulates the growth, colony formation and migration of pancreatic cancer cells by targeting Sprouty2. *Cancer Letters, 298*, 150–158.

MacIntyre, F. (1974). The top millimetre of the ocean. *Sci. Amer, 230*, 62.

Mamane, Y., Perrino, C., Yossef, O., & Catrambone, M. (2008). Source characterization of fine and coarse particles at the East Mediterranean coast. *Atmospheric Environment, 42*, 6114–6130.

Mantecca, P., Farina, F., Moschini, E., Gallinotti, D., Gualtieri, M., Rohrc, A., et al. (2010). Comparative acute lung inflammation induced by atmospheric PM and size-fractionated tire particles. *Toxicology Letters, 198*, 244–254.

Marano, F. (2007). A-t-on raison de considérer que les particules atmosphériques fines et ultrafines sont dangereuses pour la santé ? *Pollution atmosphérique n° 195*.

Marr, L., Dzepina, K., Jimenez, J., Riesen, F., Bethel, H., Arey, J., et al. (2006). Sources and transformations of particle-bound polycyclic aromatic hydrocarbons in Mexico City. . *Atmospheric Chemistry and Physics, 6*, 1733-1745.

Martellini, T., Giannoni, M., Lepri, L., Katsoyiannis, A., & Cincinelli, A. (2012). One year intensive PM2.5 bound polycyclic aromatic hydrocarbons monitoring in the area of Tuscany, Italy. Concentrations, source understanding and implications. *Environmental Pollution, 164*, 252-258.

Masclet, P., & Cachier, H. (1998). Atmospheric particles: Physicochemical characteristics. *Analysis magazine, 26*.

Mason, B. (1967). 3 éd. John Wiley & Sons Inc, Décembre. *Principles of Geochemistry*.

Massard, C., Zermati, Y., Pauleau, A., Larochette, N., Metivier, D., Sabatier, L., et al. (2006). hTERT: a novel endogenous inhibitor of the mitochondrial cell death pathway. *Oncogene, 25*, 4505-4514.

Massoud, R., Shihadeh, A., Roumié, M., Youness, M., Gerard, J., Saliba, N. A., et al. (2011). Intraurban variability of PM10 and PM2.5 in an Eastern Mediterranean city. *Atmospheric Research, 101*, 893-901.

Matthews, J. (2013). Alternative Negative Feedback Control in the Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling Pathway. *Drug Metab Toxicol, 4*, 1000e116.

Mattsson, A., Lundstedt, S., & Stenius, U. (2009). Exposure of HepG2 cells to low levels of PAH-containing extracts from contaminated soils results in unpredictable genotoxic stress responses. *Environ Mol Mutagen, 50*, 337-348.

McClintock, B. (1941). The Stability of Broken Ends of Chromosomes in Zea Mays. *Genetics, 26*, 234-282.

McKay, G. (2002). Dioxin characterisation, formation and minimisation during municipal solid waste (MSW) incineration: review. *Chemical Engineering Journal, 86*, 343–368.

McKinnon, P., & Caldecott, K. (2007). DNA Strand Break Repair and Human Genetic Disease. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet, 8*, 37–55.

Mekhail, T., Kawanishi-Tabata, R., Tubbs, R., Novick, A., Elson, P., Ganapathi, R., et al. (2003). Renal cell carcinoma (RCC) and telomerase activity: relationship to stage. *Urologic Oncology, 21*, 424–430.

Merritt, W., Lin, Y., Han, L., Kamat, A., Spannuth, W., Schmandt, R., et al. (2008). Dicer, Drosha, and outcomes in patients with ovarian cancer. *N Engl J Med, 359*, 2641-2650.

METAPIII. (1999). The Social and Economic Impacts of Mobile Source Pollution on Public Health in Greater Beirut, Lebanon Phase I.

Meyerson, M., Counter, C., Eaton, E., Ellisen, L., Steiner, P., Caddle, S., et al. (1997). hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell, 90*, 785-795.

Miao, W., Hu, L., Scrivens, P., & Batist, G. (2005). Transcriptional Regulation of NF-E2 p45-related Factor (NRF2) Expression by the Aryl Hydrocarbon Receptor-Xenobiotic Response Element Signaling Pathway. *The Journal of Biological Chemistry, 280*, 20340–20348.

Middleton, P. (1995). Sources of air pollutants. Composition, Chemistry and Climate of the Atmosphere (H.B. Singh, ed.) Van Nostrand Reinhold, New York.

Mills, N., Amin, N., Robinson, S., Anand, A., Davies, J., Patel, D., et al. (2006). Do inhaled carbon nanoparticles translocate directly into the circulation in humans? *Am J Respir Crit Care Med, 173*, 426-431.

Mimura, J., & Fujii-Kuriyama, Y. (2003). Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochimica et Biophysica Acta, 1619*, 263– 268.

Mimura, J., Ema, M., Sogawa, K., & Y., F.-K. (1999). Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes & Development, 3*, 20-25.

Mirante, F., Alves, C., Pio, C., Pindado, O., Perez, R., Aranzazu Revuelta, M., et al. (2013). Organic composition of size segregated atmospheric particulate matter, during summer and winter sampling campaigns at representative sites in Madrid, Spain. *Atmospheric Research, 132-133*, 345–361.

Mitchell, J., & Collins, K. (2000). Human telomerase activation requires two independent interactions between telomerase RNA and telomerase reverse transcriptase. *Molecular cell , 6*, 361-371.

Mitchell, J., Cheng, J., & Collins, K. (1999a). A box H/ACA small nucleolar RNAlike domain at the human telomerase RNA 3' end. *Molecular and cellular biology, 19*, 567-576.

MoE. (2001). Lebanese Ministry of the Evironment. Lebanon State of the Environment Report.

MoE/EU/NEAP. (2005u). National Environmental Action Plan, unpublished, Air Quality Chapter, MoE.

MoE/UNEP/GEF. (2012). Lebanon Technology Needs Assessment Report for Climate Change (Chapter 5), Beirut, Lebanon.

MoE/URC/GEF. (2012). Lebanon Technology Needs Assessment Report for Climate Change (Chapter 5), Beirut, Lebanon.

MoE-ECODIT. (2010). Etat de l'environnement et ses tendances au Liban, chapitre 4 : qualité de l'air.

Möller, D. (1995). Sulphate aerosols and their atmospheric precursors. Aerosol Forcing of Climate (R.J. Charlson and J. Heintzenberg, eds) Wiley and Sons, Chichester.

Møller, P., Folkmann, J., Forchhammer, L., Brauner, E., Danielsen, P., & Risom, L. (2008). Air pollution, oxidative damage to DNA, and carcinogenesis. *Cancer Letters, 266*, 84-97.

Monks, P., Granier, C., Fuzzi, S., Stohl, A., Williams, M., Akimoto, H., et al. (2009). Atmospheric composition change – global and regional air quality. *Atmospheric Environment, 43*, 5268–5350.

Moschos, S., Williams, A., Perry, M., Birrell, M., Belvisi, M., & Lindsay, M. (2007). Expression profiling in vivo demonstrates rapid changes in lung microRNA levels following lipopolysaccharide-induced inflammation but not in the anti-inflammatory action of glucocorticoids. *BMC Genomics, 8*.

Moussa, S., El-Fadel, M., & Saliba, N. (2006). Seasonal, diurnal and nocturnal behaviors of lower carbonyl compounds in the urban environment of Beirut, Lebanon. *Atmospheric Environment, 40*, 2459–2468.

Mrad Nakhlé, M., Farah, W., Ziade, N., Abboud, M., Gerard, J., Zaarour, R., et al. (2013). Analyse de la qualité des données issues des hopitaux de Beyrouth Municipe pour mesurer les effets à court terme de la pollution atmosphérique. *Revue d'Epidémiologie et de santé publique, 61*, 551–558.

Muhlfeld, C., Geiser, M., Kapp, N., Gehr, P., & Rothen-Rutishauser, B. (2007). Re-evaluation of pulmonary titanium dioxide nanoparticle distribution using the "relative deposition index": Evidence for clearance through microvasculature. *Part Fibre Toxicol, 4*, 7.

Müller, L., Riediker, M., Wick, P., Mohr, M., Gehr, P., & Rothen-Rutishauser, B. (2010). Oxidative stress and inflammation response after nanoparticle exposure: differences between human lung cell

monocultures and an advanced three-dimensional model of the human epithelial airways. *J. R. Soc. Interface, 7*, S27–S40.

Nakhlé, K. (2003). Le mercure, le cadmium, et le plomb dans les eaux littorales Libanaise : apports et suivi au moyen de bioindicateurs quantitatifs (Eponges, Bivalves et Gastéropodes). Thèse à l'Université Paris 7. 246.

Nassani, N., Khayat, G., Raad, I., Jiang, Y., Alaaeddine, N., & Hilal, G. (2013). Telomerase as a potential marker for inflammation and cancer detection in bronchial washing: A prospective study. *Clinical Biochemistry, 46*, 1701-1704.

Nawrot, T. S., Kuenzli, N., Sunyer, J., Shi, T., Moreno, T., Viana, M., et al. (2009). Oxidative properties of ambient PM2.5 and elemental composition: Heterogeneous associations in 19 European cities. *Atmospheric Environment, 43*, 4595-4602.

Nemmar, A., Hoet, P., Vanquickenborne, B., Dinsdale, D., Thomeer, M., Hoylaerts, M., et al. (2002). Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation, 105*, 411-414.

Nemmar, A., Hoylaerts, M., Hoet, P., & Nemery, B. (2004). Possible mechanisms of the cardiovascular effects of inhaled particles: systemic translocation and prothrombotic effects. *Toxicol Lett, 149*, 243–53.

Oberdorster, G., Oberdorster, E., & Oberdorster, J. (2005). Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect, 113*, 823-839.

Olaussen, K., K., D., Domonta, J., Spano, J., Sabatier, L., & Soria, J. (2006). Telomeres and telomerase as targets for anticancer drug development. *Critical Reviews in Oncology/Hematology, 57*, 191–214.

Olovnikov, A. (1973). A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *Journal of theoretical biology, 41*, 181-190.

OMS. (2011). Santé et qualité de l'air. Aide-mémoire Nº313. http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs313/fr/.

ORS. (2007). Observatoire régional de santé d'Ile-de-France. Les composés organiques volatils (COV).

Ovrevik, J., Arlt, V., Øya, E., Nagy, E., Mollerup, S., Phillips, D., et al. (2010). Differential effects of nitro-PAHs and amino-PAHs on cytokine and chemokine responses in human bronchial epithelial BEAS-2B cells. *Toxicology and Applied Pharmacology, 242*, 270–280.

Oya, E., Ovrevik, J., Arlt, V., Nagy, E., Phillips, D., & Holme, J. (2011). DNA damage and DNA damage response in human bronchial epithelial BEAS-2B cells following exposure to 2-nitrobenzanthrone and 3-nitrobenzanthrone: role in apoptosis. *Mutagenesis, 26*, 697–708.

Pacyna, J. (1984). Estimation of the atmospheric emissions of trace elements from anthropogenic sources in Europe. *Atmos. Environ, 18*, 41– 50.

Pal, S., Baiocchi, R., Byrd, J., Grever, M., Jacob, S., & Sif, S. (2007). Low levels of miR-92b/96 induce PRMT5 translation and H3R8/H4R3 methylation in mantle cell lymphoma. *EMBO Journal, 26*, 3558-3569.

Pan, Y., Leifert, A., Ruau, D., Neuss, S., Bornemann, J., Schmid, G., et al. (2009). Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage. *Small , 5*, 2067–2076.

Park, E., Yi, J., Chung, K., Ryu, D., Choi, J., & Park, K. (2008). Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicology Letters, 180*, 222–229.

Pateraki, S., Assimakopoulos, V., Bougiatioti, A., Kouvarakis, G., Mihalopoulos, N., & Ch., V. (2012b). Carbonaceous and ionic compositional patterns of fine particles over an urban Mediterranean area. *Science of the Total Environment, 424*, 251–263.

Paull, T., Rogakou, E., Yamazaki, V., Kirchgessner, C., Gellert, M., & Bonner, W. (2000). A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol, 10*, 886-895.

Pélassy, P. (1984). La composition chimique de l'aerosol atmospherique de Yaounde (Cameroun)-recherche de ses sources. *Atmospheric Environment (1967), 18*, 2245- 2259.

Pennanen, A., Sillanpää, M., Hillamo, R., Quass, U., John, A., Branis, M., et al. (2007). Performance of a high-volume cascade impactor in six European urban environments: Mass measurement and chemical characterization of size-segregated particulate samples. *Science of the Total Environment, 374*, 297–310.

Penning, T., Burczynski, M., Hung, C.-F., McCoull, K., Palackal, N., & Tsuruda, L. (1998). Dihydrodiol Dehydrogenases and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Activation: Generation of Reactive and Redox Active o-Quinones. *Chemical Research in Toxicology, 12*, 1-18.

Penning, T., Ohnishi, S., Ohnishi, T., & Harvey, R. (1996). Generation of Reactive Oxygen Species during the Enzymatic Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon trans-Dihydrodiols Catalyzed by Dihydrodiol Dehydrogenase. *Chem. Res. Toxicol., 9*, 84-92.

Perrone, M., Piazzalunga, A., Prato, M., & Carofalo, I. (2011). Composition of fine and coarse particles in a coastal site of the central Mediterranean: Carbonaceous species contributions. *Atmospheric Environment, 45*, 7470-7477.

Peters, L., & Meister, G. (2007). Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. *Mol Cell, 26*, 611-623.

Petersen, C. P., Bordeleau, M. E., Pelletier, J., & Sharp, P. A. (2006). Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell, 21*, 533-542.

Peterson-Roth, P., Reynolds, M., Quievryn, G., & Zhitkovich, A. (2005). Mismatch Repair Proteins Are Activators of Toxic Responses to Chromium-DNA Damage. *Mol. Cell. Bio, 25*, 3596-3607.

Pey, J., Querol, X., & Alastuey, A. (2009b). Variations of levels and composition of PM10 and PM2.5 at an insular site in the Western Mediterranean. *Atmospheric Research, 94*, 285–299.

Pilcer, G., & Amighi, K. (2010). Formulation strategy and use of excipients in pulmonary drug delivery. *Int. J. Pharm., 392*, 1–19.

Pilch, D., Sedelnikova, O., Redon, C., Celeste, A., Nussenzweig, A., & Bonner, W. (2003). Characteristics of gamma-H2AX foci at DNA double-strand breaks sites. *Biochem Cell Biol, 81*, 123-129.

Pillai, R. S., Artus, C. G., & Filipowicz, W. (2004). Tethering of human Ago proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis. *Rna, 10*, 1518-1525.

Poey, J., & Philibert, C. (2000). Toxicité des métaux . *Revue Fran?aise des Laboratoire*, 35-43.

Poitras, E., & Houde, A. (2002). La PCR en temps réel: principes et applications. *Biology and Biotechnology, 2*, 2-11.

Pope III, C. A., Burnett, R. T., Krewski, D., Jerrett, M., Shi, Y., Calle, E. E., et al. (2009). Cardiovascular mortality and exposure to airborne fine particulate matter and cigarette smoke: shape of the exposure – response relationship. *Circulation, 120*, 941-948.

Popescu, M., Blanchard, J.-M., & Carré, J. (1998). Analyse et traitement physico-chimique des rejets atmosphériques industriels. ed. Lavoisier Tec&Doc .

Prochaska, H., De Long, M., & Talalay, P. (1985). On the mechanisms of induction of cancer-protective enzymes: a unifying proposal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America , 82*, 8232-8236.

Pueschel, R. (1994). Atmospheric aerosols. Composition, Chemistry and Climate of the Atmosphere. (H.B. Sing, ed.), Van Nostrand Reinhold, New York.

Puett, R., Hart, J., Suh, H., Mittleman, M., & Laden, F. (2011). Particulate Matter Exposures, Mortality, and Cardiovascular Disease in the Health Professionals Follow-up Study. *Environmental Health Perspectives, 119*, 1130-1135.

Puett, R., Hart, J., Yanosky, J., Paciorek, C., Schwartz, J., Suh, H., et al. (2009). Chronic fine and coarse particulate exposure, mortality, and coronary heart disease in the Nurses' Health Study. . *Environ Health , 117*, 1697-1701.

Putaud, J.-P., Van Dingenen, R., Alastuey, A., Bauer, H., Birmili, W., Cyrys, J., et al. (2010). European aerosol phenomenology e 3: Physical and chemical characteristics of particulate matter from 60 rural, urban, and kerbside sites across Europe. *Atmospheric Environment, 44*, 1308-1320.

Rahman, R., Latonen, L., & Wiman, K. (2005). hTERT antagonizes p53-induced apoptosis independently of telomerase activity. *Oncogene, 24*, 1320-1327.

Rahn, K. (1976). The Chemical Composition of the Atmospheric Aerosol. Kingston, Rhode Island: Graduate School of oceanography, University of Rhode island.

Ramanathan, V., & Feng, Y. (2009). Air pollution, greenhouse gases and climate change: Global and regional perspectives. *Atmospheric Environment, 43*, Atmospheric Environment.

Ravindra, K. B., Roekens, E., Bleux, N., Bergmans, P., & Van Grieken, R. (2006a). Seasonal and site specific variation in vapor and aerosol phase PAHs over Flanders (Belgium) and their relation with anthropogenic activities. *Atmospheric Environment, 40*, 771-785.

Ravindra, K., Sokhi, R., & Van Grieken, R. (2008). Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation. *Atmospheric Environment, 42*, 2895–2921.

Reddel, R., Ke, Y., Gerwin, B., & al. (1988). Transformation of Human Bronchial Epithelial Cells by Infection with SV40 or Adenovirus-12 SV40 Hybrid Virus, or Transfection via Strontium Phosphate Coprecipitation with a Plasmid Containing SV40 Early Region Genes. *Cancer Research, 48*, 1904-1909.

Renard, J., Calidonna, S., & Henley, M. (2004). Fate of ammonia in the atmosphere-a review for applicability to hazardous releases. *Journal of Hazardous Materials B, 108*, 29–60.

Ribas, J., Ni, X., Haffner, M., Wentzel, E., Hassanzadeh Salmasi, A., Chowdhury, W., et al. (2009). MiR-21: an androgen receptorregulated microRNA that promotes hormone-dependent and hormone-independent prostate cancer growth. *Cancer Res, 69*, 7165-7169.

Robertson, K. (2005). DNA methylation and human disease. *Nature Reviews Genetics, 6*, 597-610.

Robinson, A., Donahue, N., Shrivastava, M., Weitkamp, E., Sage, A., Grieshop, A., et al. (2007). Rethinking organic aerosols: semivolatile emissions and photochemical aging. *Science, 315*, 1259–1262.

Rogakou, E., Pilch, D., Orr, A., Ivanova, V., & Bonner, W. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem, 273*, 5858-5868.

Rohde, V., Sattler, H., Bund, T., Bonkhoff, H., Fixemer, T., Bachmann, C., et al. (2000). Expression of the human telomerase reverse transcriptase is not related to telomerase activity in normal and malignant renal tissue. *Clin Cancer Res, 6*, 4803-4809.

Ross, D., & Siegel, D. (2004). NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1, DT-diaphorase), functions and pharmacogenetics. *Methods in enzymology, 382*, 115-144.

Ross, D., Kepa, J., Winski, S., Beall, H., Anwar, A., & Siegel, D. (2000). NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms. *Chemico-Biological Interactions, 129*, 77–97.

Salameh, P., Salame, J., Khayat, G., Akhdar, A., & Ziadeh, C. (2012). Exposure to outdoor air pollution and chronic bronchitis in adults: a case-control study. *The International Journal of Occupational and Environmental Medicine, 3*, 165-177.

Saliba, N. A., El Jam, F., El Tayar, G., Obeid, W., & Roumie, M. (2010). Origin and variability of particulate matter (PM10 and PM2.5) mass concentrations over an Eastern Mediterranean city. *Atmospheric Research, 97*, 106-114.

Saliba, N., & Chamseddine, A. (2012). Uptake of acid pollutants by mineral dust and their effect on aerosol solubility. *Atmospheric Environment, 46*, 256-263.

Saliba, N., Atallah, M., & Al-Kadamany, G. (2009). Levels and indoor–outdoor relationships of PM10 and soluble inorganic ions in Beirut, Lebanon. *Atmospheric Research, 92*, 131–137.

Saliba, N., Kouyoumdjian, H., & Roumié, M. (2007a). Effect of local and long-range transport emissions on the elemental composition of PM10–2.5 and PM2.5 in Beirut. *Atmospheric Environment, 41*, 6497–6509.

Saliba, N., Moussa, S., Salame, H., & El-Fadel, M. (2006). Variation of selected air quality indicators over the city of Beirut, Lebanon: Assessment of emission sources. *Atmospheric Environment, 40*, 3263–3268.

Salomon, S., Jenne, V., & Hoenig, M. (2002). Practical aspects of routine trace element environmental analysis by inductively coupled plasma–mass spectrometry. *Talanta, 57*, 157–168.

Samy, M. (2011). Télomérase et destin des tumeurs neuroblastiques. Thèse de l'Université Paris XI, Faculté de Médecine Paris-Sud.

Sánchez-Pérez, Y., Chirino, Y., Osornio-Vargas, A., Morales-Bárcenas, R., Gutiérrez-Ruíz, C., Vázquez-López, I., et al. (2009). DNA damage response of A549 cells treated with particulate matter (PM10) of urban air pollutants. *Cancer Letters, 278*, 192–200.

Sarnat, J., Moise, T., Shpund, J., Liu, Y., Pachon, J., Qasrawi, R., et al. (2010). Assessing the spatial and temporal variability of fine particulate matter components inIsraeli, Jordanian, and Palestinian cities. *Atmospheric Environment, 44*, 2383-2392.

Sax, S., Bennett, D., Chillrud, S., Ross, J., Kinney, P., & Spengler, J. (2006). A Cancer Risk Assessment of Inner-City Teenagers Living in New York City and Los Angeles. *Environ Health Perspect, 114*, 1558–1566.

Sbayti, H., El-Fadel, M., & Kaysi, I. (2002). Effect of roadway network aggregation levels on modeling of traffic-induced emission inventories in Beirut. *Transportation Research Part D, 7*, 163–173.

Schauer, J., Lough, G., Shafer, M., Christensen, W., Arndt, M., DeMinter, J., et al. (2006). Characterization of metals emitted from motor vehicles. *Res Rep Health Eff Inst, 133*, 1-88.

Schilirò, T., Alessandria, L., Degan, R., Traversi, D., & Gill, G. (2010). Chemical characterisation and cytotoxic effects in A549 cells of urban-air PM10 collected in Torino, Italy. *Environmental Toxicology and Pharmacology, 29*, 150–157.

Schins, R., Lightbody, J., Borm, P., Shi, T., Donaldson, K., & Stone, V. (2004). Inflammatory effects of coarse and fine particulate matter in relation to chemical and biological constituents. *Toxicology and Applied Pharmacology, 195*, 1– 11.

Schlesinger, R. B., & Cassee, F. (2003). Atmopsheric Secondary Inorganic Particulate Matter: the toxicological perspective as a basis for health effects risk assement. *Inhalation toxicology, 15*, 197-235.

Schmitz, G., & Muller, G. (1991). Structure and function of lamellar bodies, lipid-protein complexes involved in storage and secretion of cellular lipids. *J Lipid Res , 32*, 1539-1570.

Sedelnikova, O., & Bonner, W. (2006). GammaH2AX in cancer cells: a potential biomarker for cancer diagnostics, prediction and recurrence. *Cell Cycle, 5*, 2909-2913.

Seike, M., Goto, A., Okano, T., Bowman, E., Schetter, A., Horikawa, I., et al. (2009). MiR-21 is an EGFR-regulated anti-apoptotic factor in lung cancer in never-smokers. *Proc Natl Acad Sci U S A., 106*, 12085–12090.

Seinfeld, J. H., & Pandis, S. N. (2006). Atmospheric chemistry and Physics: from air pollution to climate change. United States of America: John Wiley & Sons, Inc.

Seinfeld, J., & Pandis, S. (1998). Atmospheric Chemistry and Physics: From Air Pollution to Climate Change. New York, NY: Wiley. 523– 539.

Seitz, H., & Zamore, P. D. (2006). Rethinking the microprocessor. *Cell, 125*, 827-829.

Sen, S., Reddy, V., Khanna, N., Guleria, R., Kapila, K., & Singh, N. (2001). A comparative study of telomerase activity in sputum, bronchial washing and biopsy specimens of lung cancer. *Lung Cancer, 33*, 41–49.

Shaka, H., & Saliba, N. A. (2004). Concentration measurements and chemical composition of PM10-2.5 and PM2.5 at a coastal site in Beirut, Lebanon. *Atmospheric Environment, 38*, 523–531.

Sharma, G., Gupta, A., Wang, H., Scherthan, H., Dhar, S., Gandhi, V., et al. (2003). hTERT associates with human telomeres and enhances genomic stability and DNA repair. *Oncogene, 22*, 131-146.

Sharpless, N., & DePinho, R. (2004). Telomeres, stem cells, senescence, and cancer . *The Journal of clinical investigation, 113*, 160-168.

Shay, J., Van Der Haegen, B., Ying, Y., & Wright, W. (1993). The frequency of immortalization of human fibroblasts and mammary epithelial cells transfected with SV40 large T-antigen. *Experimental cell research , 209*, 45-52.

Shi, T., Duffin, R., Borm, P., Li, H., Weishaupt, C., & Schins, R. (2006). Hydroxyl-radical-dependent DNA damage by ambient particulate matter from contrasting sampling locations. *Environmental Research, 101*, 18–24.

Shi, T., Knaapen, A., Begerow, J., Birmili, W., Borm, P., & Schins, R. (2003). Temporal variation of hydroxyl radical generation and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine formation by coarse and fine particulate matter. *Occup Environ Med, 60*, 315–321.

Shin, K., Kang, M., Dicterow, E., & Park, N. (2003). Hypermethylation of the hTERT promoter inhibits the expression of telomerase activity in normal oral fibroblasts and senescent normal oral keratinocytes. *British journal of cancer , 89*, 1473- 1478.

Silverman, R., & Ito, K. (2010). Age-related association of fine particles and ozone with severe acute asthma in New York City. *J Allergy Clin Immunol., 125*, 367-373.

SMAP. (2002). SMAP – Urban air quality improvement trough air quality and mobility plans and the institutional strengthens of local administration on air quality. Diagnosis of the present situation .

Smart, D., Ahmedi, K., Harvey, J., & Lynch, A. (2011). Genotoxicity screening via the gH2AX by flow assay. *Mutat. Res, 715*, 25–31.

Smith, L., Coller, H., & Roberts, J. (2003). Telomerase modulates expression of growth-controlling genes and enhances cell proliferation. *Nature cell biology, 5*, 474-479.

Smith, P., Krohn, R., Hermanson, G., Mallia, A., Gartner, F., Provenzano, M., et al. (1989). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem, 150*, 76-85.

Smogorzewska, A., & de Lange, T. (2004). Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Annual review of biochemistry, 73*, 177-208.

Soder, A., Going, J., Kaye, S., & Keith, W. (1998). Tumour specific regulation of telomerase RNA gene expression visualized by in situ hybridization. *Oncogene , 16*, 979-983.

Soder, A., Hoare, S., Muir, S., Going, J., Parkinson, E., & Keith, W. (1997). Amplification, increased dosage and in situ expression of the telomerase RNA gene in human cancer. *Oncogene , 14*, 1013-1021.

Spix, C., Anderson, H. R., Schwartz, J., & al. (1998). Short term effects of air pollution on hospital admissions of respiratory diseases in Europe : a quantitative summary of APHEA study results. *Arch Environ Health, 53*, 54-64.

Spycher, C., Miller, E., Townsend, K., Pavic, L., Morrice, N., Janscak, P., et al. (2008). Constitutive phosphorylation of MDC1 physically links the MRE11-RAD50-NBS1 complex to damaged chromatin. *J Cell Biol, 181*, 227-240.

Stewart, G., Wang, B., Bignell, C., Taylor, A., & Elledge, S. (2003). MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. *Nature, 421*, 961-966.

Stucki, M., & Jackson, S. (2006). gammaH2AX and MDC1: anchoring the DNAdamage- response machinery to broken chromosomes. *DNA Repair (Amst), 5*, 534-543.

Stucki, M., Clapperton, J., Mohammad, D., Yaffe, M., Smerdon, S., & Jackson, S. (2005). MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double strand breaks. *Cell, 123*, 1213-1226.

Su, T. (2006). Cellular responses to DNA damage: one signal, multiple choices. *Annu Rev Genet, 40*, 187-208.

Sutton, M., Dragosits, U., Tang, Y., & Fowler, D. (2000). Ammonia emissions from non-agricultural sources in the UK. *Atmospheric Environment, 34*, 855-869.

Sydlik, U., Bierhals, K., Soufi, M., Abel, J., Schins, R., & Unfried, K. (2006). Ultrafine carbon particles induce apoptosis and proliferation in rat lung epithelial cells via specific signaling pathways both using EGF-R. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 291*, L725-L733.

Szigeti, T., Mihucz, V., Óvári, M., Baysal, A., Atılgan, S., Akman, S., et al. (2013). Chemical characterization of PM2.5 fractions of urban aerosol collected in Budapest and Istanbul. *Microchemical Journal, 107*, 86–94.

Takakura, M., Kyo, S., Sowa, Y., Wang, Z., Yatabe, N., Maida, Y., et al. (2001). Telomerase activation by histone deacetylase inhibitor in normal cells. *Nucleic acids research, 29*, 3006-3011.

Talalay, P., Dinkova-Kostova, A., & Holtzclaw, W. (2003). Importance of phase 2 gene regulation in protection against electrophile and reactive oxygen toxicity and carcinogenesis. *Advan. Enzyme Regul., 43*, 121–134.

Tarantini, A. (2009). Modulation de la génotoxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) en mélanges.Thèse de l'Ecole doctorale Ingénierie pour la Santé, la Cognition et l'Environnement (ED-ISCE).

TEDO. (2009). Tripoli Environmental and Development Observatory. Report 27, 2009 and Report 28. Monitoring of Air quality.

ten Brink, H. (1998). Reactive Uptake Of HNO3 And H2SO4 In Sea-Salt (NaCl) Particles. *J. Arrosol Sci, 29*, 57-64.

Thorpe, A., & Harrison, R. M. (2008). Sources and properties of non-exhaust particulate matter from road traffic: A review. *Science of the Total Environment, 400*, 270-282.

Tie, X., Wu, D., & Brasseur, G. (2009). Lung cancer mortality and exposure to atmospheric aerosol particles in Guangzhou, China. *Atmospheric Environment, 43*, 2375–2377.

Toyooka, T., & Ibuki, Y. (2006). New Method for Testing Phototoxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Environ. Sci. Technol, 40*, 3603–3608.

Tsai, S., Chang, C., & Yang, C. (2013). Fine Particulate Air Pollution and Hospital Admissions for Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Case-Crossover Study in Taipei. *Int. J. Environ. Res. Public Health, 10*, 6015-6026.

Tsou, J., Galler, J., Siegmund, D., Laird, P., Turla, S., Cozen, W., et al. (2007). Identification of a panel of sensitive and specific DNA methylation markers for lung adenocarcinoma. *Molecular Cancer, 6*.

Ulaner, G., Hu, J., Vu, T., Oruganti, H., Giudice, L., & Hoffman, A. (2000). Regulation of telomerase by alternate splicing of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in normal and neoplastic ovary, endometrium and myometrium. *International journal of cancer, 85*, 330-335.

UNDP/GEF/MOPWT/DGU. (2005). Climatic zoning for building in Lebanon.

Uppstad, H., Øvrebø, S., Haugen, A., & Mollerup, S. (2010). Importance of CYP1A1 and CYP1B1 in bioactivation of benzo[a]pyrene in human lung cell lines. *Toxicology Letters, 192*, 221–228.

US-EPA. (2006). The National Ambient Air Quality Standards (NAAQS) for Particulate Matter (PM): EPA's 2006 Revisions and Associated Issues.

Usher, C., Michel, A., & Grassian, V. (2003). Reactions on Mineral Dust. *Chem. Rev, 103*, 4883-4939.

Vakharia, D., Liu, N., Pause, R., Fasco, M., Bessette, E., Zhang, Q., et al. (2001). Effect of Metals on Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Induction of CYP1A1 and CYP1A2 in Human Hepatocyte Cultures. *Toxicology and Applied Pharmacology, 170*, 93–103.

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 den Berg, M., Birnbaum, L., Denison, M., De Vito, M., Farland, W., Feeley, M., et al. (2006). The 2005 World Health Organization Reevaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-Like Compounds. *Toxicological Sciences, 93*, 223–24.

Vardoulakis, S., Solazzo, E., & Lumbreras, J. (2011). Intra-urban and street scale variability of BTEX, NO2 and O3 in Birmingham, UK: Implications for exposure assessment. *Atmospheric Environment, 45*, 5069-5078.

Venn, A., Cooper, M. A., Laughlin, C., Britton, J., & Lewis, S. (2003). Effects of volatile organic compounds, damp, and other environmental exposures in the home on wheezing illness in children. *Thorax, 58*, 955-960.

Villenave, E., Aymoz, G., Beekmann, M., Baeza-Squiban, A., & Colosio, J. (2012). Pollution Atmosphérique. *Numéro spécial*, 10-16.

Vincent, J. (1989). Aerosol sampling, Science and Practise, Ed. John Wiley and Sons. .

Waked, A., Afif, C., & Seigneur, C. (2012). An atmospheric emission inventory of anthropogenic and biogenic sources for Lebanon. *Atmospheric Environment, 50*, 88-96.

Walley, C. D., Ziegler, P., Cavazza, W., Robertson, A., & Crasquin-Soleau, S. (2001). The Lebanon passive margin and the evolution of the Levantine Neo-Tethys. *Mém. Mus. Nat. Hist. Nat, 186*, 407-439.

Wang, P., Zou, F., Zhang, X., Li, H., Dulak, A., Tomko Jr, R., et al. (2009). MicroRNA-21 negatively regulates Cdc25A and cell cycle progression in colon cancer cells. *Cancer Res, 69*, 8157-8165.

Warters, R., Adamson, P., Pond, C., & Leachman, S. (2005). Melanoma cells express elevated levels of phosphorylated histone H2AX foci. *J Invest Dermatol., 124*, 807-817.

Watson, J. D. (1972). Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol, 239*, 197-201.

Webb, J., Broomfield, M., Jones, S., & Donovan, B. (2014). Ammonia and odour emissions from UK pig farms and nitrogen leaching from outdoor pig production. A review. *Science of the Total Environment, 470-471*, 865–875.

Wedepohl, H. K. (1995). The composition of the continental crust. *Geochimica et Cosmochimica Acta, 59*, 1217-1232.

Wessel, N. (2010). Étude des voies de bioactivation du benzo[a]pyrène et du fluoranthène chez la sole commune (Solea solea) : Profil métabolique et génotoxicité. Thèse de l'Université de Nantes UFR Sciences et Techniques.

Whitby, K. (1977). Physical characterization of aerosols. Methods and standards for environmental measurement. . *Natl. Bur. Stand. Spec. Publ, 464*, 165-172.

WHO. (2005). World Health organization Air quality guidelines for particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide. Global update.

WHO. (2011). Health topics: air pollution. http://www.who.int/topics/air_pollution/en/.

Wick, M., Zubov, D., & Hagen, G. (1999). Genomic organization and promoter characterization of the gene encoding the human telomerase reverse transcriptase (hTERT). *Gene, 232*, 97-106.

Wiebert, P., Sanchez-Crespo, A., Seitz, J., Falk, R., Philipson, K., Kreyling, W., et al. (2006). Negligible clearance of ultrafine particles retained in healthy and affected human lungs. *Eur Respir J., 28*, 286-290.

Wolff, M. (1985). Occupational Exposure to Polychiorinated Biphenyls (PCBs). *Environmental Health Perspectives, 60*, 133-138.

Wright, W., Tesmer, V., Huffman, K., Levene, S., & Shay, J. (1997). Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. *Genes & development, 11*, 2801-2809.

Wu, R., Tsai, S., & Bonner, W. (1982). Patterns of histone variant synthesis can distinguish G0 from G1 cells. *Cell , 31*, 367-374.

Xinarianos, G., Scott, F., Liloglou, T., Prime, W., Turnbull, T., Walshaw, M., et al. (2000). Evaluation of telomerase activity in bronchial lavage as a potential diagnostic marker for malignant lung disease. *Lung Cancer, 28*, 37–42.

Xue, W., & Warshawsky, D. (2005). Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: A review. *Toxicology and Applied Pharmacology, 206*, 73– 93.

Yammine, P., Kfoury, A., El-Khoury, B., Nouali, H., El-Nakat, H., Ledoux, F., et al. (2010). A Preliminary Evaluation Of The Inorganic Chemical Composition Of Atmospheric TSP In The Selaata Region, North Lebanon . *Lebanese Science Journal, 11*.

Yang, M., Shen, H., Qiu, C., Ni, Y., Wang, L., Dong, W., et al. (2013). High expression of miR-21 and miR-155 predicts recurrence recurrence. *European Journal of Cancer, 49*, 604–615.

Yi, X., Tesmer, V., Savre-Train, I., Shay, J., & Wright, W. (1999). Both transcriptional and posttranscriptional mechanisms regulate human telomerase template RNA levels. *Molecular and cellular biology, 19*, 3989-3997.

Yim, H., Slebos, R., Randell, S., Umbach, D., Parsons, A., Rivera, M., et al. (2007). Smoking is associated with increased telomerase activity in short-term cultures of human bronchial epithelial cells. *Cancer Letters, 246*, 24–33.

Zakian, V. (1995). Telomeres: beginning to understand the end. *Science (New York, NY), 270*, 1601-1607.

Zeka, A., Zanobetti, A., & Schwartz, J. (2005). Short term effects of particulate matter on cause specific mortality: effects of lags and modification by city characteristics. *Occup Environ Med, 62*, 718-25.

Zhang, J., Wang, J., Zhao, F., Liu, Q., Jiang, K., & Yang, G. (2010). MicroRNA-21 (miR-21) represses tumor suppressor PTEN and promotes growth and invasion in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Clinica Chimica Acta, 411*, 846–852.

Zhao, J., Xie, Y., Qiana, C., Li, L., Jiang, R., Kan, H., et al. (2012). Imbalance of Th1 and Th2 cells in cardiac injury induced by ambient fine particles. *Toxicology Letters, 208*, 225– 231.

Zhong, Y., Xia, Z., Fu, Y., & Zhu, Z. (2010). . Knockdown of hTERT by SiRNA suppresses growth of Capan-2 human pancreatic cancer cell via the inhibition of expressions of Bcl-2 and COX-2. *Journal of digestive diseases, 11*, 176-184.

Zhu, H., Wu, H., Liu, X., Evans, B., Medina, D., Liu, C., et al. (2008). Role of MicroRNA miR-27a and miR-451 in the regulation of MDR1/P-glycoprotein expression in human cancer cells. *Biochem Pharmacol, 76*, 582–588.

Zhu, S., Si, M., Wu, H., & Mo, Y. (2007). MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin (TPM1). *J Biol Chem , 282*, 14328–14336.

Zhu, S., Wu, H., Wu, F., Nie, D., Sheng, S., & Mo, Y. (2008). MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. *Cell Research, 18*, 350-359.

Zufall, M. J., & Davidson, C. I. (1998). Dry deposition of particles. *Atmospheric particles , 5*, 425- 473.

Résumé :
Les principaux objectifs de cette étude, une des premières menée au Liban, étaient d'acquérir une meilleure connaissance des caractéristiques physico-chimiques des particules atmosphériques fines (PF ou $PM_{2,5-0,3}$) et ultrafines (PUF ou $PM_{0,3}$), et d'évaluer *in vitro*, leur potentiel toxique sur des cellules épithéliales bronchiques humaines (BEAS-2B). L'échantillonnage de PF et de PUF a été mené au Liban à la fois sur un site urbain (Sin El-Fil, du 18 mai au 2 sept. 2011) et un site rural (Beije, du 5 sept. au 28 oct. 2011). Les PF et les PUF ont fait l'objet d'une caractérisation physico-chimique par la détermination de leur composition en éléments et ions inorganiques, carbone total et composés organiques. Ensuite, des échantillons composites de PF et de PUF ont été préparés afin d'exposer les cellules BEAS-2B et évaluer les mécanismes toxiques sous-jacents. Nos résultats ont montré une influence des sources de combustion plus notable pour les particules collectées sur le site urbain, et cela par la présence de carbone total, de composés organiques, de métaux et d'ions inorganiques secondaires à des niveaux de concentration supérieurs à ceux rencontrés sur le site rural. D'autre part, une cytotoxicité plus prononcée a été provoquée par les PUF par comparaison aux PF. Les mécanismes de génotoxicité et de modifications épigénétiques que nous avons étudiés, à savoir l'activation métabolique des composés organiques, la modification de l'expression de trois microARNs, l'activation de la télomérase et l'induction de cassures au niveau de l'ADN, ont été induits par les deux échantillons de PF, avec un effet plus prononcé pour les particules d'origine urbaine. L'exposition des cellules BEAS-2B aux PF collectées, notamment celles d'origine urbaine, pourraient donc favoriser la transformation des cellules pulmonaires en cellules immortelles, et par conséquent, l'initiation ou la promotion de la cancérogenèse broncho-pulmonaire.

Mots-clés : pollution atmosphérique ; $PM_{2.5-0.3}$; $PM_{0.3}$; physico-chimie ; sites urbain/rural ; lignée BEAS-2B ; cytotoxicité ; activation métabolique ; génotoxicité ; épigénétique.

Abstract :
The objectives of this study, one of the first conducted in Lebanon, were to acquire a better knowledge on the physico-chemical characteristics of atmospheric fine particles (FP or $PM_{2.5-0.3}$) and ultrafine ones (UFP or $PM_{0.3}$), and to assess their potential toxicity. Particles were collected at two coastal sites between may and sept. 2011 at Sin El-Fil (urban site in Greater Beirut), and between sept. and oct. 2011 at Bejje (rural site). After sampling, FP and UFP were subjected to a physico-chemical characterization by quantifying their inorganic ions and elements, total carbon and organic compounds contents. Then, composite samples of FP and UFP were prepared in order to expose bronchial epithelial cells (BEAS-2B) in culture, and therefore to assess the underlying toxic mechanisms. Our results showed an influence of combustion sources especially for urban particles that are richer in total carbon, organic compounds, metals and secondary inorganic ions than rural ones. On the other hand, a more pronounced cytotoxicity was caused by UFP when compared to FP. In addition, epigenetic modifications and genotoxicity mechanisms, such as metabolic activation of organic compounds, changes in three microRNAs expression, telomerase activation and DNA breaks induction, which are potentially involved in the initiation and promotion of carcinogenesis, were induced by the two samples of FP, with a more pronounced effect of urban particles. Exposure of BEAS-2B cells to collected FP, especially urban ones, may therefore induce the transformation of lung cells to immortal cells, and consequently the initiation or the promotion of broncho-pulmonary carcinogenesis.

Keywords: air pollution; $PM_{2.5-0.3}$; $PM_{0.3}$; physico-chemistry; urbain/rural sites; BEAS-2B cell line; cytotoxicity; metabolic activation; genotoxicity ; epigenetic.