



HAL
open science

Modèles in vitro adaptés à l'étude de la relation entre la pollution de l'air intérieur et la santé respiratoire, application aux Composés Organiques Volatils (COV)

Gaëlle Bardet

► To cite this version:

Gaëlle Bardet. Modèles in vitro adaptés à l'étude de la relation entre la pollution de l'air intérieur et la santé respiratoire, application aux Composés Organiques Volatils (COV). Santé publique et épidémiologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2015. Français. NNT : 2015USPCB140 . tel-01578079

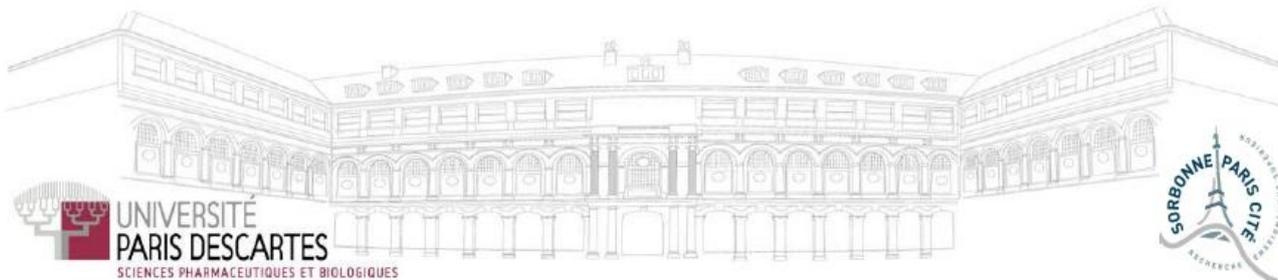
HAL Id: tel-01578079

<https://theses.hal.science/tel-01578079>

Submitted on 28 Aug 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITE PARIS DESCARTES - SORBONNE PARIS CITE

FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

EDSP ECOLE DOCTORALE DE SANTE PUBLIQUE

Année universitaire 2014-2015

N° □□□□□□□□□□□□□□

T H E S E

pour l'obtention du

DOCTORAT

de l'Université Paris Descartes

Spécialité : Epidémiologie

Présentée le 22 octobre 2015 par

Gaëlle BARDET

MODELES *IN VITRO* ADAPTES A L'ETUDE DE LA RELATION ENTRE
LA POLLUTION DE L'AIR INTERIEUR ET LA SANTE RESPIRATOIRE,
APPLICATION AUX COV

Jury :

Rapporteurs	Dominique COURCOT	Université du Littoral de la Côte d'Opale
	Luc FERRARI	Université de Lorraine
Examineurs	Armelle BAEZA-SQUIBAN	Université Paris Diderot
	Françoise BAUDOUIN	Université Paris Descartes
	Ghislaine LACROIX	INERIS
Directrice	Nathalie SETA	Université Paris Descartes
Co-encadrante	Sophie ACHARD	Université Paris Descartes

Valorisations

Publications

1. G Bardet, S Achard, T Loret, V Desauziers, I Momas, N Seta. A model of human nasal epithelial cells adapted for direct and repeated exposure to airborne pollutants. Article publié dans le journal Toxicology Letters. doi: 10.1016/j.toxlet.2014.05.023
2. G Bardet, V Mignon, I Momas, S Achard, N Seta. Human Reconstituted Nasal Epithelium, a promising *in vitro* model to assess impacts of environmental complex mixtures. En révision dans le journal Toxicology *in vitro*.
3. G Bardet, V Desauziers, I Momas, S Achard, N Seta. Assessing cellular effects of experimental exposure to wall painting containing VOC. En préparation.

Communication orale

Nationale

1. G Bardet, S Achard, I Momas, N Seta. Effets de l'exposition « long-terme », unique ou répétée, aux polluants de l'air intérieur, des épithéliums reconstitués humains de l'arbre respiratoire. Journée des doctorants Air de l'ADEME, Paris, France, 27 juin 2014.

Communications affichées

Internationales

1. S Achard, G Bardet, S Grellet, I Momas, N Seta. *In vitro* reconstituted human airway epithelium model to assess the impact of indoor air pollutants on the inflammatory response. GREMI, Paris, France, 12 avril 2013.
2. G Bardet, C Persoz, T Loret, I Momas, S Achard, N Seta. Effects of Formaldehyde exposure on human epithelial cells all along the respiratory tract. 49th Eurotox, Interlaken, Suisse, 1-4 septembre 2013. doi:10.1016/j.toxlet.2013.05.165
3. S Grellet, I Momas, N Seta, G Bardet, S Achard. Reconstituted human airway epithelium 3D-model to assess the impact of indoor air pollutants on the inflammatory response. 49th Eurotox, Interlaken, Suisse, 1-4 septembre 2013. doi:10.1016/j.toxlet.2013.05.184
4. G Bardet, S Achard, T Loret, V Desauziers, I Momas, N Seta. A model of human nasal epithelial cells adapted to repeated exposures to airborne pollutants. GREMI, Paris, France, 23 mai 2014.
5. G Bardet, S Achard, I Momas, N Seta. Reconstituted human airway epithelium 3D-model, a suitable *in vitro* model, to assess airborne pollutants impacts on human respiratory tract. 50th Eurotox, Edinburgh, Royaume-Uni, 6-11 septembre 2014. doi:10.1016/j.toxlet.2014.06.462
6. G Bardet, S Achard, I Momas, N Seta. Reconstituted human airway epithelium 3D-model to assess the impact of indoor air pollutants on the inflammatory response. European Respiratory Society Annual Congress, München, Allemagne, 6-10 septembre 2014.
7. G Bardet, S Achard, V Desauziers, I Momas, N Seta. Generation of a reproducible and stable atmosphere charged of VOC mixture suitable for exposure at air-liquid interface. 51th Eurotox, Porto, Portugal, 13-16 septembre 2015.

8. E Ricquebourg, S Achard, G Bardet, N Seta, I Momas. Airway epithelium co-cultured with immune cells for a better assessment of the low dose effects of environmental pollutants on the inflammatory response. 51th Eurotox, Porto, Portugal, 13-16 septembre 2015.

Nationale

1. G Bardet, S Achard, N Seta. Inflammatory response of nasal cells and reconstituted epithelium after single or repeated exposure to gaseous formaldehyde. 8^{ème} édition du Congrès des Jeunes Chercheurs, Paris, France, 3 octobre 2012.

Financements

Financements personnels

Cette thèse a fait l'objet d'un co-financement par l'Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME), et par l'Institut de Recherche Internationale Servier (IRIS).



Financement du projet dans lequel s'inscrit cette thèse

Le projet ERPAI (Epithélium(s) Respiratoire(s) et Polluants de l'Air Intérieur) dans lequel est inscrit cette thèse, bénéficie du soutien de l'ANSES (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail) depuis janvier 2013 (EST 12-2-087).



Remerciements

Je tiens à remercier particulièrement Nathalie Seta pour son soutien constant, sa patience et ses enseignements au cours de ces trois années de thèse. Je lui suis très reconnaissante de m'avoir permis de découvrir le monde de la recherche. Je remercie également Sophie Achard pour l'autonomie qu'elle m'a accordée et ses relectures attentives.

Je remercie Dominique Courcot et Luc Ferrari d'avoir accepté d'évaluer mon manuscrit de thèse.

Merci à Armelle Baeza-Squiban, Françoise Baudouin et Ghislaine Lacroix d'avoir accepté d'être membres de mon jury de thèse.

Je remercie Isabelle Momas de son accueil au sein du laboratoire de Santé Publique et Environnement, en master puis en thèse.

Ce projet de thèse a été co-financé par l'Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME), et par l'Institut de Recherche Internationale Servier (IRIS), je les en remercie.

Je tiens à remercier Valérie Desauziers pour ses précieux conseils et son expertise métrologique indispensable à la réalisation de ces travaux. Merci à vous et à votre équipe de m'avoir accueillie si chaleureusement au sein du pôle RIME à Pau, j'ai beaucoup appris à vos côtés, je vous en suis très reconnaissante.

Merci à José Dugay pour m'avoir permis de conditionner les fibres SPME dans les locaux de l'ESPCI.

Je tiens également à remercier Bruno Saubaméa pour ses conseils avisés et Virginie Mignon pour toute l'aide qu'elle m'a apportée lors des expérimentations histologiques.

Je remercie Luc Cynober, directeur du laboratoire de Nutrition et Marie-José Butel directrice du laboratoire de Microbiologie de la faculté de pharmacie Paris Descartes, pour m'avoir autorisée à conserver mes échantillons dans leurs laboratoires respectifs.

Merci à Vanessa Ghomari pour toute l'aide logistique qu'elle m'a apportée, pour son écoute et sa bonne humeur quotidienne au cours de ces trois ans. Je lui souhaite le meilleur pour la suite.

Merci à Fanny Rancière, Charles Persoz et Céline Roda que j'ai connus dès mon arrivée au laboratoire, pour leur patience, leur disponibilité et leurs précieux conseils.

Un grand merci à Lynda Colas, bientôt deux fois docteur, pour son soutien et sa bonne humeur sans faille. Je l'entends encore citer Rabelais « le rire est le propre de l'homme ». Alexandre et Gabriel peuvent être fiers de leur maman.

Merci à Stephan Gabet, pour son écoute, sa compréhension et sa bonne humeur communicative.

Merci également à Gabrielle Vernouillet, Emilie Ricquebourg, Nicolas Bougas, Christina Paunescu et Dorota Desaulle pour leur bienveillance et leurs avis constructifs.

Merci à Thomas Loret, pour toute l'aide qu'il m'a apporté lors de son stage de master 2. Je n'oublierai pas nos débats et discussions scientifiques constructives.

Un très grand merci à Mathilde Delaval, qui m'a aidée bien des fois au cours de ces trois ans. Je lui en suis particulièrement reconnaissante. J'en profite pour remercier tous les membres du

conseil d'administration d'ASPERISK. Nous pouvons nous réjouir du travail accompli. Longue vie à ASPERISK !

Merci également à tous les stagiaires qui ont participé de près ou de loin à ces travaux de thèse : Elsa, Sophie, Alice, Céline, Aileen mais également à tous les stagiaires que j'ai eu l'occasion de rencontrer : Mandy, Camille, Anna, Léa, Valérie, Olivier.

Merci à Sarah, Anne, Malika, Marie-Yvonne d'avoir partagé déjeuners et pauses café.

Merci à mes amis de fac d'être toujours présents et de m'avoir soutenue tout au long de ces années : à Marjo, à Marie, à Caro et Christo, à Sylvie, à Claire et à Caroline.

Je ne peux terminer ces remerciements sans remercier les membres de ma famille.

Merci à Jean-Louis, Monique et Emeline pour ces repas dominicaux partagés avec joie et bonne humeur.

Merci à mon grand-père et à Jean-Yves d'avoir si gentiment apporté leur contribution à ces travaux de thèse, malgré les kilomètres qui nous séparent, en dénichant un pot de peinture datant de plus de dix ans.

Enfin, un immense merci à mes parents et à ma sœur, pour m'avoir toujours soutenue et pour avoir toujours su trouver les mots justes pour m'encourager dans cette tâche.

“During my lectures on ‘ indoor air quality ’ with architectural students, I often ask them how much, in their opinion, air weighs. The most common answer I get is that 1 m³ of air must weigh just 1 g or less. They believe that air is very light. However, the weight of 1 m³ of air is 1,2 kg. Our daily breathing rate is 15 ~ 20 m³ of air – approximately 0,3 m³ per 1 kg of body weight. Thus, we inhale and exhale approximately 20 kg of substances every day. The mass of inhaled air is much more than that of drinking water and food.”

Professor Shin - ichi Tanabe

Department of Architecture,
Waseda University, Tokyo, Japan
Forward of Organic Indoor Air Pollutants. 2nd Edition.
Edited by Tunga Salthammer and Erik Uhde

Sommaire

Introduction générale	15
I. ETAT DES CONNAISSANCES	17
<u>I.1 POLLUTION DE L’AIR INTERIEUR ET COMPOSES ORGANIQUES VOLATILS (COV).....</u>	<u>19</u>
I.1.1 La pollution de l’air intérieur.....	21
I.1.1.1 La composition de la pollution de l’air intérieur.....	21
I.1.1.2 Les sources de la pollution de l’air intérieur.....	22
I.1.1.3 Effets sanitaires des polluants de l’air intérieur	23
I.1.1.4 Réduction de l’exposition – réglementations françaises.....	25
I.1.2 Les composés organiques volatils (COV).....	26
I.1.2.1 Classification des COV de l’air intérieur	27
I.1.2.2 Sources de COV dans l’environnement intérieur – Cas de l’habitat.....	29
I.1.2.3 Concentrations en COV dans l’environnement intérieur- Cas de l’habitat	35
I.1.2.4 Mesurages dans les locaux	36
<u>I.2 IMPACTS SANITAIRES DES COV DANS LES ENVIRONNEMENTS INTERIEURS – CAS DE L’HABITAT</u>	<u>39</u>
I.2.1 Etudes épidémiologiques	39
I.2.2 Etudes <i>in vivo</i>	47
I.2.3 Etudes <i>in vitro</i>	51
OBJECTIF	61
II. MATERIEL ET METHODES	63
<u>II.1 MODELES CELLULAIRE ET TISSULAIRE.....</u>	<u>65</u>
II.1.1 Cultures primaires de cellules épithéliales nasales humaines (hAECN).....	65
II.1.2 Epithélium respiratoire humain reconstitué (hRNE)	67
<u>II.2 GENERATION ET CONTROLE D’ATMOSPHERES GAZEUSES</u>	<u>68</u>
II.2.1 Génération statique d'une atmosphère gazeuse mono-polluant - Cas du formaldéhyde.....	68
II.2.2 Génération dynamique d'une atmosphère gazeuse multi-polluants - Cas des COV émis par les peintures	69
II.2.3 Génération de fumée primaire de tabac	70
II.2.4 Contrôles des atmosphères gazeuses mono et multi polluants.....	70
<u>II.3 DISPOSITIFS D’EXPOSITION EN INTERFACE AIR-LIQUIDE</u>	<u>73</u>
II.3.1 Dispositif d'exposition dynamique en interface air liquide	73
II.3.2 Dispositif d'exposition statique en interface air liquide	74
<u>II.4 MARQUEURS D’EFFET</u>	<u>74</u>
II.4.1 Fonctionnalité cellulaire	74

II.4.2	Viabilité cellulaire	75
II.4.3	Résistance Electrique Trans Epithéliale (TEER).....	75
II.4.4	Médiateurs de l'inflammation produits dans le milieu de culture	76
II.4.5	Analyse histologique des épithéliums hRNE.....	76
II.5	PROTOCOLES D'EXPOSITIONS	80
II.5.1	Protocoles d'expositions dynamiques en interface air-liquide.....	81
II.5.2	Protocole d'exposition statique en interface air-liquide des épithéliums hRNE.....	83
II.6	EXPRESSION DES RESULTATS ET ANALYSE STATISTIQUE.....	83
III.	RESULTATS ET DISCUSSION	85
III. 1	<u>EXPOSITIONS DYNAMIQUES REPETEES DE CELLULES EPITHELIALES NASALES HUMAINES A UNE ATMOSPHERE MONO-POLLUANT.....</u>	<u>87</u>
III.1. 1	Expositions répétées dynamiques en interface air-liquide d'une monocouche de cellules épithéliales nasales (hAECN)	87
III.1.1.1	Conditions de culture des cellules hAECN sur membrane	87
III.1.1.2	Réponse des cellules hAECN à un stimulus pro-inflammatoire	89
III.1.1.3	Expositions répétées des cellules hAECN à l'Air en interface air-liquide.....	89
III.1.1.4	Contrôle des atmosphères de formaldéhyde gazeux	90
III.1.1.5	Expositions répétées dynamique des cellules hAECN au formaldéhyde.....	91
III.1. 2	Expositions répétées dynamiques en interface air-liquide d'épithéliums reconstitués humains hRNE	92
III.1.2.1	Choix du modèle d'épithélium hRNE	92
III.1.2.2	Epithélium hRNE provenant d'un seul donneur.....	93
III.1.2.3	Epithélium hRNE provenant d'un pool de 14 donneurs en co-culture ou non avec des fibroblastes	94
III.1.2.4	Comparaison des différentes reconstitutions d'épithélium hRNE.....	95
III.1.2.5	Caractérisation morphologique et histologique de l'épithélium hRNE	96
III.1.2.6	Expositions répétées dynamiques des épithéliums hRNE à l'Air	98
III.1.2.7	Expositions répétées dynamiques des épithéliums hRNR au formaldéhyde gazeux.....	99
III. 2	<u>EXPOSITIONS REPETEES DES EPITHELIUMS RECONSTITUES HUMAINE D'ORIGINE NASALE A DES ATMOSPHERES MULTI-POLLUANTS.</u>	<u>105</u>
III.2.1	Profil qualitatif des atmosphères chargées en COV à l'ouverture des pots de peinture	105
III.2.2	Expositions répétées dynamiques à des atmosphères chargées en COV générées à partir de la peinture récente	107
III.2.3	Expositions répétées dynamiques à des atmosphères chargées en COV générée à partir de la peinture ancienne	108
III. 3	<u>EXPOSITIONS REPETEES STATIQUES DES EPITHELIUMS HRNE A DES ATMOSPHERES COMPLEXES DE POLLUANTS : LA FUMEE PRIMAIRE DE TABAC.....</u>	<u>121</u>
III.3.1	Contrôle de l'exposition à la fumée de tabac	121
III.3.2	Choix du temps d'exposition à la fumée primaire de tabac	121

III.3.3 Expositions répétées statiques des épithéliums hRNE à la fumée de tabac	122
III.3.4 Comparaison des expositions Air vs contrôle.....	123
III.3.5 Expositions répétées à la fumée primaire de tabac	123
IV DISCUSSION GENERALE	129
V CONCLUSION ET PERSPECTIVE	139
BIBLIOGRAPHIE	143
ANNEXES	159

Table des figures

FIGURE 1	Emergence de l'intérêt pour les polluants de l'air intérieur au fil du temps.	20
FIGURE 2	Pourcentage de temps que passe la population de l'étude EXPOLIS	20
FIGURE 3	Moyennes des concentrations en COV mesurées dans l'air intérieur (écoles) et dans l'air extérieur	22
FIGURE 4	Pourcentage de mortalité attribuable à la pollution de l'air intérieur en 2012.	24
FIGURE 5	Différents types d'expositions des cellules à des polluants en phase gazeuse	56
FIGURE 6	Rôle régulateur de l'épithélium respiratoire humain dans le développement de pathologies respiratoires et allergiques.	57
FIGURE 7	Cellules hAECN.	66
FIGURE 8	Culture de cellules sur insert.....	66
FIGURE 9	Schéma représentant un épithélium hRNE en interface air-liquide sur insert	67
FIGURE 10	Epithéliums hRNE	68
FIGURE 11	Dispositif de génération dynamique d'atmosphères chargées en COV, émis par des peintures, inspiré des normes ISO 16000-9 et 16000-11.	69
FIGURE 12	Génération et transfert de la fumée dans une chambre en verre.....	70
FIGURE 13	Méthode de prélèvement SPME.....	71
FIGURE 14	Courbe d'étalonnage du dosage de formaldéhyde en phase gazeuse	72
FIGURE 15	Courbe d'étalonnage du toluène.....	72
FIGURE 16	Module Vitrocell® Systems (trois puits) d'exposition en interface air-liquide	73
FIGURE 17	Dispositif d'exposition statique en interface air-liquide.	74
FIGURE 18	Réduction du XTT en formazan par l'enzyme mitochondriale, la succinate déshydrogénase.....	75
FIGURE 19	Principe du dosage de la lactate déshydrogénase	75
FIGURE 20	Culture primaires cellules hAECN, 24 h après ensemencement à différentes densités, .	88
FIGURE 21	Culture primaire de cellules hAECN,	88
FIGURE 22	Production en médiateurs de l'inflammation (IL-8, IL-6) après 1, 2, ou 3 expositions à 24 h d'intervalle au formaldéhyde (200 µg/m ³) ou à l'Air	91
FIGURE 23	Intégrité cellulaire pour 1, 2 ou 3 expositions au formaldéhyde gazeux (200 µg/m ³) par rapport à l'Air.....	92
FIGURE 24	Médiateurs de l'inflammation (IL-8, IL-6, GM-CSF), dans le milieu de culture produits par les épithéliums reconstitués hRNE de cinq donneurs différents	93
FIGURE 25	Mesures de la résistance membranaire (TEER).....	93
FIGURE 26	Production en médiateurs de l'inflammation (IL-8, IL-6 et GM-CSF) par les épithéliums hRNE reconstitués à partir d'un pool de 14 donneurs différents en co-culture (HF-MD) ou non (MD) avec des fibroblastes humains.	94
FIGURE 27	Comparaison des épithéliums hRNE avec (HF-MD) ou sans fibroblastes humains (MD)	95
FIGURE 28	Sécrétion journalière en médiateurs de l'inflammation (IL-8, IL-6 et GM-CSF).....	95
FIGURE 29	Quantification de l'intensité de fluorescence par cellule des immunomarquages en partie apicale des épithéliums hRNE	96
FIGURE 30	Caractérisation histologique de l'épithélium hRNE.....	97

FIGURE 31	Exposition dynamique (Air) et statique (Contrôle) à l'Air des épithéliums hRNE en interface air-liquide pendant 3 semaines (S1, S2, S3)	98
FIGURE 32	Expositions dynamiques répétées durant trois semaines (S1, S2, S3) des épithéliums hRNE au formaldéhyde gazeux (FA : 200 µg/m ³) ou à l'air (Air)	99
FIGURE 33	Profil des atmosphères chargées en COV à l'ouverture des pots de peintures.	106
FIGURE 34	Principaux COV présents dans l'atmosphère générée à partir de la peinture récente au 3 ^{ème} , 4 ^{ème} et 5 ^{ème} jour de génération.	107
FIGURE 35	Effet de l'exposition aux COV issus de la peinture aqueuse (pendant 1 h (a&c&e) ou 2 h (b&d&f)) sur la production d'IL-8	109
FIGURE 36	Effets de l'exposition (1, 2 ou 3 expositions hebdomadaires) des épithéliums hRNE à une atmosphère chargée en COV à partir de la peinture récente sur l'intégrité tissulaire (TEER) pendant trois semaines (S1, S2, S3)	110
FIGURE 37	Quantification des atmosphères chargées en COV générées à partir de la peinture ancienne.....	111
FIGURE 38	Effets de 3 expositions hebdomadaires d'une heure à 24 h d'intervalle pendant trois semaines des épithéliums hRNE à une atmosphère chargée en COV issue de la peinture ancienne.....	113
FIGURE 39	Effet dose de 3 expositions d'une heure à 24 h d'intervalle pendant une semaine des épithéliums hRNE à 3 atmosphères chargées en COV issues de la peinture ancienne (G1, G2, G3)..	114
FIGURE 40	Effet de l'exposition des épithéliums hRNE à une atmosphère chargée (COV) en COV issue de la peinture ancienne ou non (Air), pendant 2 semaines (S1, S2)	116
FIGURE 41	Effet de l'exposition à la fumée primaire de tabac de 5 ou de 15 min sur l'épithélium hRNE, comparé à un épithélium non exposé..	122
FIGURE 42	Concentration en IL-8 (pg/mL), 24 h après la première exposition pour chaque semaine d'exposition (S1, S2, S3).	124
FIGURE 43	Effet de l'exposition à la fumée de tabac des épithéliums hRNE sur la structure.	125
FIGURE 44	Effet de l'exposition des épithéliums hRNE à la fumée de tabac	125
FIGURE 45	Intensité de fluorescence par cellule de l'immunomarquage de la F-actine en partie apicale	126

Liste des tableaux

TABLEAU I	Les contaminants et leurs sources les plus communes dans un habitat de pays développés industrialisés.....	23
TABLEAU II	Propriétés physico-chimiques des COV les plus évalués dans l'air intérieur.....	29
TABLEAU III	Facteurs d'émissions de COV par une peinture à base de solvants organiques déposée dans une chambre en verre expérimentale.	31
TABLEAU IV	Facteurs d'émissions de COV par quatre peintures à base d'eau, déposées individuellement dans une chambre en verre expérimentale	32
TABLEAU V	Concentrations en COV mesurées dans l'habitat, dans différentes parties du monde	36
TABLEAU VI	Production en médiateurs de l'inflammation (IL-8 et IL-6) dans le milieu de culture, des cellules hAECN sur membrane, en présence ou en absence de TNF α 50 ng/mL.....	89
TABLEAU VII	Production en IL-8 et IL-6 dans le milieu de culture par les cellules hAECN exposées à l'Air avec flux (Air dynamique) ou sans flux (Air contrôle)	90
TABLEAU VIII	Comparaison des concentrations théoriques et mesurées du formaldéhyde gazeux des atmosphères générées dans le dispositif de génération d'atmosphère du laboratoire	91
TABLEAU IX	Détection des COV dans les atmosphères chargées en COV générées à partir de la peinture ancienne.	112
TABLEAU X	Valeurs journalières moyennes de sécrétion en IL-8, IL-6 et GM-CSF pour une, deux expositions à 48 h d'intervalle par semaine à l'Air pendant trois semaines..	123
TABLEAU XI	Mesures TEER (Ω/cm^2) une fois par semaine pendant trois semaines (S1, S2, S3). FT pour fumée primaire de tabac.....	124
TABLEAU XII	Comptabilisation du nombre de cellules total	126

Liste des protocoles

PROTOCOLE 1	Expositions répétées des cellules hAECN en interface air-liquide	81
PROTOCOLE 2	Expositions répétées des épithéliums hRNE à l'Air en interface air-liquide	81
PROTOCOLE 3	Expositions répétées dynamiques à des atmosphères chargées en COV générées à partir d'une peinture récente	82
PROTOCOLE 4	Expositions répétées dynamiques des épithéliums hRNE en interface air-liquide.....	82
PROTOCOLE 5	Expositions répétées dynamiques des épithéliums hRNE en interface air-liquide.....	83
PROTOCOLE 6	Expositions répétées en condition statique de 5 min à la fumée primaire de tabac ...	83

Abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ANSES	Agence nationale de sécurité sanitaire, de l'alimentation de l'environnement et du travail
BAMSE	B : Children, A : Allergy, M. : Environment, S : Stockholm, E : Epidemiology
BPCO	Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive
BSA	Bovine Serum Albumin
BTEX	Benzène, Toluène, Xylènes, Ethylbenzène
CaCl ₂	Chlorure de calcium
CIRC	Centre International de Recherche sur le Cancer
CITEPA	Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmosphérique
CMR	Cancérogène, Mutagène, Reprotoxique
CO	Monoxyde de carbone
CO ₂	Dioxyde de carbone
COV	Composés Organiques Volatils
COVNM	Composés Organiques Volatils Non Méthaniques
CVF	Capacité Vitale Forcée
DEM _{25-75%}	Débit Expiratoire Maximal médian entre 25 et 75 % de la capacité vitale forcée
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DO	Densité optique
DVB	Divinylbenzène
EDEN	Pre and postnatal determinants of the child's development and health
ELISA	Enzyme Link Immunosorbant Assay
ERP	Etablissements Recevant du Public
EXPOLIS	Air Pollution Exposure Distributions of Adult Urban Populations in Europe
FA	Formaldéhyde
FID	Flame Ionization Detector
FT	Fumée primaire de tabac
FTE	Fumée de Tabac Environnementale
GC	Gas chromatography
GEE	Equations d'estimation généralisées
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
hAEC	human Airway Epithelial Cell Nasal
HAP	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
hRNE	human Reconstituted Nasal Epithelium
IFN γ	Interféron γ
Ig E	Immunoglobuline E
IgG	Immunoglobuline G
IL	Interleukine 4
IVRB	Infection des voies respiratoires basses
LARS	The Leipzig Allergy High-Risk Children Study

LDH	Lactate deshydrogénase
LISA	Lifestyle–Immune System–Allergy
LT	Lymphocyte T
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MS	Mass Spectrometry
NaCl	Chlorure de sodium
NEHAP	The Hungarian National Environmental Health Action Program
NF- κ B	Nuclear factor-kappa B
NHANES	The National Health and Nutrition Examination Survey).
NH ₃	Ammoniac
NO	Monoxyde d'azote
NO ₂	Dioxyde d'azote
OQAI	Observatoire de la Qualité de l'Air Intérieur
OMS	Organisation Mondiale de la santé
ORa	Odds Ratio ajusté
O ₃	Ozone
PARIS	Pollution and asthma Risk: an Infant Study
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDMS	Polydimethylsiloxane
PFA	Paraformaldéhyde
PGE2	Prostaglandine E2
PNSE	Plan National Santé Environnement
PVC	Polychlorure de vinyle
SO ₂	Dioxyde de soufre
SPME	Micro-extraction en phase solide
TEER	Trans Epithelial Electrical Resistance
Th	Lymphocyte T
TNF α	Tumor necrosis factor alpha
VAI	Valeur d'Action Immédiate
VEMS ₁	Volume Maximal Expiré pendant la première Seconde d'une expiration forcée
VGAI	Valeurs Guides de l'Air Intérieur
VIR	Valeurs Intermédiaires d'informations et de Recommandations
VLEP	Valeurs Limites d'Environnements Professionnels
VMC	Ventilation Mécanique Contrôlée
VR	Valeurs Repères de qualité d'air
WGA	Wheat Germ Agglutinin

Unités de mesure

cm ²	Centimètre carré
°C	Degré Celsius
g/L	Gramme par litre
g/m ³	Gramme par mètre cube
h	Heure
kDa	Kilo Dalton
kPa	Kilo Pascal
kT	Kilo Tonne
L	Litre
µg/m ³	Microgramme par mètre cube
µg/m ² /h	Microgramme par mètre carré par heure
µm	Micromètre
mg/m ³	Milligramme par mètre cube
mM	Millimolaire
min	Minute
Ω/cm ²	Ohm par centimètre carré
pg/mL	Picogramme par millilitre
pH	Potentiel hydrogène
%	Pourcentage

Introduction générale

Aussi loin que l'on puisse remonter à travers les siècles, la pollution atmosphérique d'origine anthropique ou naturelle a été associée à l'augmentation de la mortalité et l'aggravation des pathologies [1]. Ce n'est qu'au cours du 20^{ème} siècle que les préoccupations de l'homme concernant la pollution atmosphérique se sont réellement accentuées. L'intensification de l'industrialisation, l'utilisation de matières fossiles, le développement d'infrastructures de transport et l'augmentation de la circulation automobile ont contribué, dans des espaces-temps courts, à la survenue d'épisodes de pollution extrême associés à des effets sanitaires marquants : apparition de pathologies sévères (respiratoires, infectieuses, cancers, ...) et augmentation de la mortalité [2, 3].

Au cours de la seconde partie du 20^{ème} siècle, l'augmentation de la prévalence des pathologies allergiques et respiratoires à travers le monde [4] ainsi que l'identification de symptômes spécifiques d'environnements clos (syndrome du bâtiment malsain, syndrome des moisissures toxiques, hypersensibilité à des multiples substances chimiques) dans les pays industrialisés, ont contribué à incriminer la pollution de l'air intérieur comme facteur de risque d'apparition de ces pathologies. Compte-tenu du temps que passe la population générale dans des environnements clos (80-90 %), il est primordial de disposer d'un faisceau d'arguments convaincants pour établir une relation de causalité entre l'exposition à un polluant de l'air intérieur et l'apparition de pathologies respiratoires et allergiques.

Afin de préciser cette relation, il est nécessaire de coupler aux observations épidémiologiques, des éléments expérimentaux qui permettent d'appréhender les mécanismes d'action de ces polluants. Les politiques actuelles visent à remplacer les expérimentations animales par des méthodes alternatives, dont les modèles *in vitro*. A l'heure actuelle, les modèles *in vitro* adaptés à l'étude des polluants environnementaux, en particulier les COV, sont encore peu développés. Cette investigation requiert l'utilisation de modèles cellulaires et d'atmosphères chargées en polluants permettant de mimer la physiologie respiratoire et les expositions humaines. Ces travaux de thèse s'inscrivent dans cet objectif, à savoir proposer une approche expérimentale *in vitro* innovante permettant d'étudier la relation entre la pollution de l'air intérieur et la santé respiratoire.

Ce manuscrit débute par un état des connaissances composé de deux parties. **La première** est une approche générale de la pollution de l'air intérieur et des composés organiques volatils (COV) présents dans l'habitat. **La seconde** est un état de la question plus détaillé de l'impact sanitaire des COV de l'habitat sur la santé respiratoire, en particulier l'apparition de pathologies respiratoires et allergiques.

L'objectif de ce travail sera ensuite décliné en deux sous objectifs et la méthodologie employée au cours de ce travail sera énoncée. Les résultats associés à cette méthodologie seront présentés en deux parties : une partie concernant les expositions à des atmosphères mono-polluant et une autre partie concernant les expositions à des atmosphères multi-polluants. Ces deux parties feront l'objet de discussions intermédiaires. Enfin, les travaux réalisés seront discutés dans la discussion générale.

Première partie
Etat des connaissances

I. 1 POLLUTION DE L’AIR INTERIEUR ET COMPOSES ORGANIQUES VOLATILS (COV)	19
I.1.1 La pollution de l’air intérieur.....	21
I.1.1.1 La composition de la pollution de l’air intérieur.....	21
I.1.1.2 Les sources de la pollution de l’air intérieur.....	22
I.1.1.3 Effets sanitaires des polluants de l’air intérieur	23
I.1.1.4 Réduction de l’exposition – réglementations françaises.....	25
I.1.2 Les composés organiques volatils (COV)	26
I.1.2.1 Classification des COV de l’air intérieur	27
I.1.2.2 Sources de COV dans l’environnement intérieur – Cas de l’habitat.....	29
I.1.2.3 Concentrations en COV dans l’environnement intérieur- Cas de l’habitat	35
I.1.2.4 Mesurages dans les locaux	36
I. 2 IMPACTS SANITAIRES DES COV DANS LES ENVIRONNEMENTS INTERIEURS – CAS DE L’HABITAT	39
I.2.1 Etudes épidémiologiques	39
Les hydrocarbures aromatiques	40
Les hydrocarbures aliphatiques	43
Les hydrocarbures substitués	44
Les aldéhydes - Cas du formaldéhyde	44
Impact des émissions de peintures dans les logements sur la santé respiratoire	45
I.2.2 Etudes <i>in vivo</i>.....	47
Chez l’homme	47
Chez l’animal.....	49
I.2.3 Etudes <i>in vitro</i>	51
Modèles cellulaires de l’appareil respiratoire humain	51
Dispositifs d’exposition	54
Effets des expositions aux COV	56

I. 1 POLLUTION DE L'AIR INTERIEUR ET COMPOSES ORGANIQUES VOLATILS (COV)

Les questionnements concernant l'impact de la qualité de l'air intérieur sur la santé humaine sont survenus avec l'émergence du mouvement hygiéniste à travers l'Europe, à la fin du 18^{ème} siècle. Les hygiénistes ont été les premiers à relier l'état de santé des populations aux expositions environnementales. L'air respiré était considéré, dès lors spécifiquement, comme influençant directement la santé du corps humain [1].

Ce n'est qu'au cours du 19^{ème} siècle que les scientifiques se sont intéressés dans l'absolu à la problématique de l'air intérieur. Lors des premières études réalisées dans ce domaine, certains paramètres comme le taux de ventilation, la concentration en dioxyde de carbone (CO₂), la température et l'humidité, ont été rapportés, et mis en relation avec les comportements et les symptômes des occupants. Une médiocre qualité de l'air intérieur a très vite été associée au développement de maladies et à l'apparition de sensations désagréables dans des espaces peu ventilés. A cette époque, les principales sources identifiées comme dégradant la qualité de l'air intérieur étaient la mauvaise ventilation et les émissions de composés organiques provenant du corps humain [5]. Au début du 20^{ème} siècle, les études se sont focalisées sur la recherche des potentiels effets toxiques des composés organiques présents dans l'air intérieur. Ces études ont conduit à la mise en place de recommandations d'amélioration de la qualité de l'air intérieur. Un accent a été placé particulièrement sur le bénéfice de ventiler des espaces clos, afin de favoriser le confort thermique et olfactif des habitants [5].

Dans la deuxième partie du 20^{ème} siècle, au cours des années soixante-dix, la problématique de l'air intérieur a resurgi avec la description d'un ensemble de symptômes multiples et subjectifs, dans des populations de pays industrialisés fréquentant quotidiennement des espaces clos ou semi-clos, les espaces de travail, d'habitat et d'éducation [6]. Ces symptômes étaient généralement mineurs et correspondaient pour la plupart à des manifestations respiratoires (sensation d'oppression, toux, sibilants), cutanées (rash, prurit, dessèchement), des irritations des muqueuses nasales, oculaires et auriculaires, des altérations sensorielles (troubles visuels, perception accrue ou anormale des odeurs) et neurologiques (céphalées, fatigue, baisse de la concentration). Toutes ces manifestations étaient difficilement attribuables à des expositions uniques et pouvaient varier d'un environnement à l'autre [7]. L'OMS (l'Organisation Mondiale de la Santé) a défini ces symptômes en 1983^a, qu'on retrouve dans la littérature sous le terme de *Sick Building Syndrom* : le syndrome du bâtiment malsain [6, 8, 9].

C'est à partir du 20^{ème} siècle et de ses épisodes meurtriers de pollution atmosphérique que la question de la qualité de l'air intérieur s'est posée en termes de polluants spécifiquement. L'intérêt s'est porté d'abord sur les polluants provenant de l'air extérieur, comme le dioxyde de soufre (SO₂), les oxydes d'azote (NO et NO₂), l'ozone (O₃) et les particules ; puis progressivement, vers ceux présents en permanence ou encore ceux exclusifs de l'air intérieur, dont les concentrations pouvaient même être parfois plus fortes que celles rencontrées dans l'air extérieur, tels que le formaldéhyde, les composés organiques volatils (COV), le monoxyde de carbone (CO), la fumée de tabac, le radon et

^a WHO (1983) Indoor Air Pollutants: exposure and health effects. WHO EURO Reports and studies. Copenhagen: World Health Organization. Report No:1983: 78

^b WHO (2014) Burden of disease from household air pollution for 2012 – Summary of results

l'amiante [2, 3, 10, 11]. La figure 1 présente l'évolution temporelle de l'intérêt porté aux différents polluants selon les époques.

Parmi les polluants étudiés, certains sont responsables d'effets sanitaires bien caractérisés chez l'homme. Les pathologies associées peuvent être cancéreuses ou non cancéreuses principalement des pathologies respiratoires mais également cardio-vasculaires et neurologiques [12].

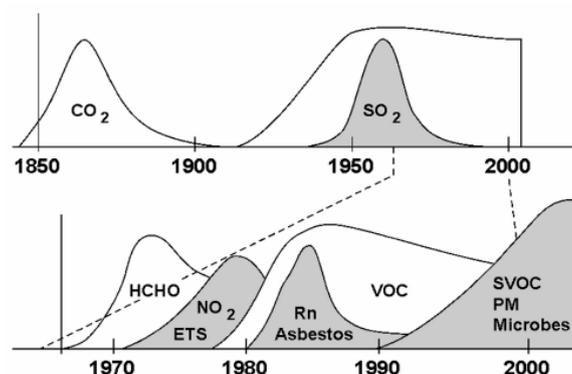


FIGURE 1 – Emergence de l'intérêt pour les polluants de l'air intérieur au fil du temps d'après Salthammer *et al.* [11]. CO₂ : Dioxyde de carbone, SO₂ : Dioxyde de soufre, HCHO : Formaldéhyde, NO₂ : Dioxyde d'azote, ETS : *Environmental Tobacco Smoke* (fumée de tabac environnementale), Rn : Radon, (S) VOC : (*Semi*-)Volatile Organic Compound (composé organique (semi-)volatil), PM : *Particulate Matter* (particule).

Si on regarde la santé des populations, la prévalence mondiale des pathologies respiratoires et allergiques a augmenté depuis la seconde moitié du 20^{ème} siècle [4] et se stabilise dans les pays industrialisés [13]. Le fait même de la rapidité de la progression de ces pathologies a écarté l'hypothèse génétique, au profit de l'implication de facteurs comportementaux et environnementaux, comme l'exposition aux polluants de l'air intérieur [14-16]. L'émergence de ces pathologies a mis en lumière l'implication de l'exposition aux polluants de l'air et la nécessité de travaux de recherche dans ce domaine, compte-tenu du temps que passe la population générale dans les environnements clos (80-90 %) (Fig. 2) [17, 18].

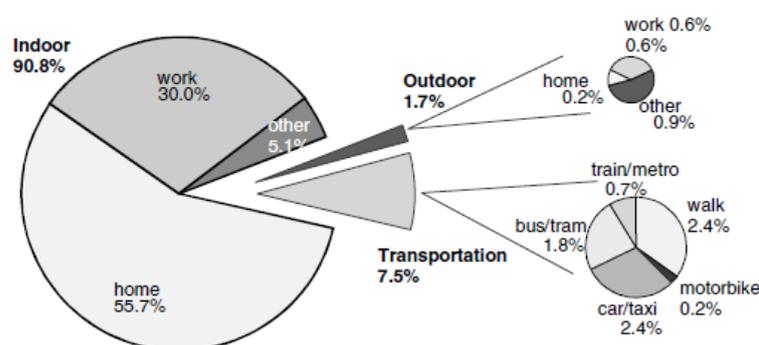


FIGURE 2 – Pourcentage de temps que passe la population de l'étude EXPOLIS (Air Pollution Exposure Distributions of Adult Urban Populations in Europe) (Milan, Italie), dans différents microenvironnements [19], *Indoor* : intérieur, *outdoor* : extérieur, *work* : lieux de travail, *home* : domicile, *other* : autre, *transportation* : transport, *bus/tram* : bus et tram, *walk* : marche à pied, *train/metro* : train et métro, *motorbike* : moto, *car/taxi* : voiture et taxi.

Si par le passé, la pollution de l'air intérieur a été peu considérée, aujourd'hui les preuves de son impact sur la santé humaine sont convaincantes. Dans les pays industrialisés, des mesures ont été prises afin d'améliorer la qualité de l'air intérieur, au point que la composition de l'air intérieur a

changé dans les cinquante dernières années [10]. Ainsi, l'utilisation de certains composés jugés cancérigènes a été interdite et les paramètres de construction des bâtiments ont été repensés.

Cependant, de nouvelles études menées dans les pays en voie de développement, associent directement l'exposition à la pollution de l'air intérieur à la mortalité par infections respiratoires, cancer du poumon, cardiopathies ischémiques et accidents vasculaires cérébraux. Certaines de ces pathologies touchent particulièrement les enfants de moins de cinq ans dont les appareils vitaux sont en cours de développement [16]. Dans son rapport datant de 2014, l'OMS estime que pour l'année 2012, 4,3 millions de morts sont attribuables à la pollution de l'air intérieur. Ce qui représente 7,6 % de la mortalité mondiale, et qui la classe devant la pollution de l'air extérieur (7,1 %) ^b. Ces chiffres mettent en avant l'importance de poursuivre des travaux de recherche dans ce domaine.

Dans la suite de cet état des connaissances, nous aborderons la pollution de l'air intérieur et particulièrement les COV en matière de composition, de sources et d'effets sanitaires.

I.1.1 La pollution de l'air intérieur

Il n'existe pas de définition légale française de la pollution de l'air intérieur. Elle est néanmoins prise en compte dans la définition de la pollution atmosphérique de l'article 2 de la loi n°96-1236 du 30 décembre 1996 relative à l'air et l'utilisation rationnelle de l'énergie (la loi LAURE). Dans cette loi, la pollution atmosphérique est définie comme étant «...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... ». Ainsi, la pollution de l'air intérieur résulte d'interactions entre différentes familles de polluants, provenant de sources variables de l'environnement intérieur ou extérieur.

I.1.1.1 La composition de la pollution de l'air intérieur

L'air intérieur est composé de différentes familles de polluants d'origine biologique, physique ou chimique, introduits entre autre directement ou indirectement par l'homme [20]. Plus de neuf cents composés ont été détectés [21]. On distingue dans les environnements intérieurs :

Les contaminants biologiques ou microbiologiques dans cette catégorie, on identifie les allergènes (les allergènes d'acariens, d'animaux domestiques, de blattes, de rongeurs, de pollens), les bactéries, les virus, les endotoxines et moisissures. Ils sont généralement apportés par les occupants eux-mêmes et se développent sous certaines conditions de température, d'humidité et d'intensité lumineuse [22].

Les contaminants physiques comprennent deux sous-groupes de polluants :

- les polluants particuliers comme les fibres (amiante), particules, nanoparticules (métalliques, inorganiques) qui sont importés dans les espaces intérieurs par les matériaux de construction, d'isolation, de décoration et d'aménagement ou par la proximité de sources extérieures de métaux.
- Les polluants issus des rayonnements radioactifs, comme le radon (produit par la désintégration de l'uranium) provenant majoritairement du sol ou de sources extérieures radioactives (incidents nucléaires) [12].

^b WHO (2014) Burden of disease from household air pollution for 2012 – Summary of results

Les contaminants chimiques ; comme les composés inorganiques (NO, NO₂, SO₂, NH₃) qui sont émis dans l'atmosphère par combustion (activités de chauffage, de cuisson, agriculture...), et par des sources extérieures (trafic routier, production industrielle,..) ; ou encore les composés organiques volatils (COV) et les aldéhydes qui sont émis dans l'environnement intérieur principalement par les activités humaines d'aménagement intérieur (rénovations, reconstructions, décorations) et par les habitudes de vie des occupants [21, 23, 24].

I.1.1.2 Les sources de la pollution de l'air intérieur

Les sources de contaminants de l'air intérieur peuvent être ponctuelles ou diffuses, et varier en fonction de l'heure de la journée, de la saison ou de la situation géographique [25]. Ainsi, on observe une différence notable de composition de l'air intérieur entre les pays en voie de développement et les pays développés. Dans les pays en voie de développement, elle se compose de contaminants issus principalement de la combustion de la biomasse, de matières fossiles (bois, charbon). Dans les pays développés, elle est constituée en grande majorité de mélanges complexes de COV émis dans l'atmosphère par les matériaux de construction, de rénovation et de décoration [26]. Le tableau I présente un résumé non exhaustif des différents contaminants et sources retrouvés dans l'habitat de pays développés industrialisés [20, 27].

Les sources des polluants dans l'air intérieur sont multiples et présentes aussi bien dans l'environnement intérieur qu'à l'extérieur des locaux. Les polluants de l'air extérieur sont principalement issus de l'industrie et des émissions automobiles (SO₂, NO₂, NO, COV,...), et intègrent les locaux par transfert de l'air extérieur vers l'air intérieur, ils seront donc présents en plus faibles concentrations dans les environnements intérieurs [25].

Les polluants provenant de l'air intérieur sont issus des matériaux de construction et de rénovation (COV, particules,...), des installations et fournitures (combustion de biomasses (four, cuisinière, chauffage,...), mobilier, appareils hi-tech), des occupants eux-mêmes (présence d'animaux, activité métabolique), et des activités humaines (fumée de cigarette, activités de loisirs, produits d'entretien, de soin,...) [20]. Les concentrations pour certains de ces polluants issus de l'environnement intérieur, en particulier les COV, sont généralement plus élevées que celles de l'environnement extérieur (Fig. 3).

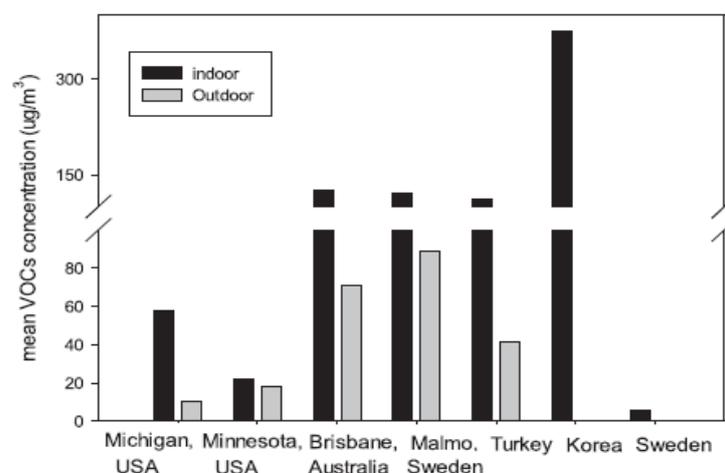


FIGURE 3 – Moyennes des concentrations en COV mesurées dans l'air intérieur (écoles) et dans l'air extérieur, d'après Mishra *et al.* [28] (Michigan, Etats-Unis [29] ; Minnesota, Etats-Unis [30] ; Brisbane, Australie [28] ; Malmö, Suède [31] ; Turquie [32] ; Corée du Sud [33] ; Suède [34]). *Indoor* : à l'intérieur, *outdoor* : à l'extérieur.

TABLEAU I – Les contaminants et leurs sources les plus communes dans un habitat de pays développés industrialisés, adapté de Carazo Fernandez *et al.* [20]. En gras les contaminants chimiques.

Origine	Sources d'émission	Contaminants
Extérieur	<i>Production industrielle</i>	SO₂, NO₂, NO, CO et COV , particules
	<i>Véhicules à moteur</i>	CO, NO₂, NO
	<i>Sol</i>	Radon, pesticides
Intérieur	<i>Matériaux de construction et de rénovation</i>	
	Pierre	Radon
	Bois	Formaldéhyde, COV
	Isolation	Formaldéhyde , fibres de verre
	Protections anti-feu	Amiante, COV
	Peintures/Papiers peints	COV, O₃ , plomb, Spores fongiques, particules
	<i>Installations et fournitures</i>	
	Systèmes de chauffage, four, cuisinière (combustion de biomasse)	CO, CO₂, NO₂, NO, COV , particules O₃, COV , particules ultrafines
	Appareils Hi-tech	Microorganismes
	Systèmes de ventilation	COV
	Mobilier	COV
	<i>Occupants</i>	
	Activité métabolique	CO₂, vapeur d'eau, ammoniac
	Activité biologique	Microorganismes (bactéries, virus)
	Animaux	Allergènes
	<i>Activités humaines</i>	
	Fumée de cigarette	CO, COV , particules, etc...
	Les désodorisants	senteurs, fluorocarbones
	Les produits d'entretien	COV, senteurs
	Les produits de soins personnels	COV
	Loisirs/activités artistiques	COV, senteurs
Textiles	COV , poussières, acariens	

Les concentrations en polluants de l'air intérieur sont variables d'un environnement à un autre, et dépendent des sources présentes dans l'environnement intérieur ; elles peuvent être également influencées par les paramètres de confort de l'air intérieur, tels que la vitesse de l'air (la ventilation), la température et l'humidité.

I.1.1.3 Effets sanitaires des polluants de l'air intérieur

La complexité de la composition de l'air intérieur explique une partie de la difficulté d'étudier cette pollution et d'évaluer l'exposition personnelle afin d'en mesurer les risques sanitaires. Selon l'OMS, pour qu'il y ait exposition : « il faut qu'une substance toxique se trouve à l'instant t en un point donné de l'environnement et qu'une ou plusieurs personnes se trouvent également en ce point au même moment. En outre, la quantité de substance en contact avec le tégument entre également en ligne de

compte »^c. L'exposition personnelle aux polluants de l'air intérieur est largement dépendante de la composition, de la concentration et du temps d'exposition aux polluants ; elle est évaluée par la mesure de la dose interne absorbée par l'occupant ou par la mesure de la dose présente dans l'atmosphère. Les données récoltées participent à l'évaluation de l'impact sanitaire des polluants de l'air intérieur. Pour affirmer l'impact sanitaire d'un polluant, il faut que dans la littérature, suffisamment de preuves existent associant le polluant concerné avec la pathologie observée. Ces preuves proviennent d'études épidémiologiques et sont renforcées par des données d'études cliniques, d'études *in vivo* et *in vitro*. Les instances nationales ou internationales d'experts vont alors déterminer, par quelle voie d'exposition et à quelle concentration, en l'état des connaissances, le polluant peut avoir un impact sur la santé.

Les effets sanitaires des polluants de l'air intérieur restent toutefois difficiles à établir compte-tenu de la complexité de cette pollution, de l'exposition et de la variabilité individuelle. Les catégories dites sensibles de la population peuvent être plus affectées que d'autres : les enfants, les personnes âgées et les femmes enceintes, les immunodéprimés, les diabétiques ainsi que les individus souffrant de pathologies respiratoires et cardio-vasculaires [15].

La première voie d'exposition en contact direct avec la pollution de l'air intérieur est l'appareil respiratoire humain. Les pathologies respiratoires sont donc les plus fréquemment associées à l'exposition aux polluants de l'air intérieur [20, 35, 36]. Cependant, les polluants pénètrent aussi dans l'organisme humain par la voie cutanée et digestive. Quelle que soit la voie d'exposition, les polluants passent dans la circulation générale et peuvent alors atteindre différents tissus. Ils sont donc susceptibles d'engendrer des pathologies au niveau des systèmes cardio-vasculaire, nerveux, urinaire, digestif, et reproducteur, et affecter le développement fœtal durant la grossesse [37, 38]. Dans le rapport de l'OMS publié en 2014, parmi les 4,3 millions de morts toutes causes confondues, attribuables à la pollution de l'air intérieur pendant l'année 2012, 40 % des cas sont attribuables à des pathologies respiratoires, survenant soit chez des enfants de moins de cinq ans (infections des voies respiratoires basses), soit chez des adultes (broncho-pneumopathies chroniques obstructives et cancers respiratoires). Dans 34 % des cas, elle est attribuable à des pathologies vasculaires cérébrales (accidents vasculaires cérébraux) et dans 26 % des cas, à des pathologies cardiaques (cardiopathies ischémiques) (Fig. 4).

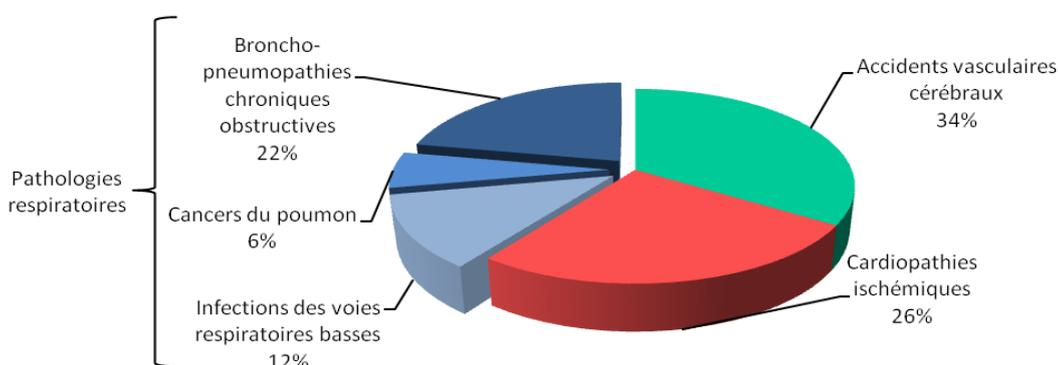


FIGURE 4 – Pourcentage de mortalité attribuable à la pollution de l'air intérieur en 2012 par pathologie. Figure adaptée des résultats du rapport de l'OMS datant de 2014 (*WHO (2014) Burden of disease from household air pollution for 2012 – Summary of results*).

^c OMS : L'évaluation de l'exposition. Résumé extrait des *Environmental health criteria* de l'OMS

Pour certains composés présents dans l'air intérieur, suffisamment de preuves permettent de les relier à l'apparition de cancers. Le CIRC (Centre International de Recherche sur le Cancer), les a classés en différents groupes, suivant leur degré de cancérogénicité pour l'homme. Ainsi, le formaldéhyde, le benzène, la fumée de tabac environnementale (FTE) et le radon sont classés comme cancérogènes certains pour l'homme (classe 1). Le trichloréthylène, le tétrachloréthylène sont classés comme cancérogènes probables (classe 2A). L'acétaldéhyde, le styrène, l'éthylbenzène et le *p*-dichlorobenzène sont classés cancérogènes possibles (classe 2B). Enfin, l'acroléine a été jugée inclassable quant à sa cancérogénicité pour l'homme (classe 3).

Les preuves de l'impact sur la santé humaine des polluants de l'air intérieur ont convaincu les politiques de mettre en place des politiques de surveillance et d'amélioration de la qualité de l'air intérieur dans les environnements clos. Dans la suite de ce chapitre, nous aborderons les réglementations françaises actuelles en vue de réduire les émissions de polluants dans l'air intérieur.

I.1.1.4 Réduction de l'exposition – réglementations françaises

Les données internationales n'étant pas systématiquement transposables en raison de la variabilité des conditions d'exposition, des modes de prélèvement et de mesure, et aussi de l'acceptation sociale du risque, les pouvoirs publics ont mis en place un recueil de données nationales sur la pollution de l'air intérieur, afin d'établir des politiques d'évaluation et de gestion des risques [39]. L'OQAI (l'Observatoire de la Qualité de l'Air Intérieur) a été créé dans cet objectif en 2001. Ainsi, grâce à des travaux d'investigations environnementales dans les environnements intérieurs français (logements, crèches, espaces de travail), 350 molécules présentes dans l'habitat français ont pu être détectées. Celles-ci ont été regroupées en cinq catégories de substances : hautement prioritaires, très prioritaires, prioritaires, non prioritaires et inclassables^d.

L'ANSES (l'Agence nationale de sécurité sanitaire, de l'alimentation de l'environnement et du travail) a été en charge d'élaborer des VGAI (Valeurs Guides de la qualité de l'Air intérieur) définies par le décret 1727 du 2 décembre 2011, comme « un niveau de concentration de polluants dans l'air intérieur fixé, pour un espace clos donné, dans le but d'éviter, de prévenir ou de réduire les effets nocifs sur la santé humaine, à atteindre, dans la mesure du possible, dans un délai donné ». Différents types d'expositions sont prises en compte : à court-terme, de façon intermédiaire ou à long-terme. Onze polluants d'intérêt ont été recensés : le formaldéhyde, le monoxyde de carbone, le benzène, le naphthalène, le trichloréthylène, le tétrachloréthylène, les particules, l'acide cyanhydrique, le dioxyde d'azote, l'acroléine et l'acétaldéhyde.

Les VGAI correspondantes peuvent être confrontées aux résultats des mesures réalisées dans les environnements français et comparées aux valeurs existantes au niveau national et international (les valeurs repères de qualité d'air (VR), les valeurs intermédiaires d'informations et de recommandations (VIR), valeur d'action immédiate (VAI), les Valeurs Limites d'Environnements Professionnels (VLEP), les valeurs de L'OMS,...).

Les PNSE 1 et 2 (Programme National Santé Environnement) ont été l'occasion de mettre en place des réglementations permettant d'améliorer la qualité de l'air intérieur, en visant à :

- interdire l'utilisation de substances classées CMR1 ou CMR2 (Cancérogène, Mutagène, Reprotoxique de classe 1 ou 2) dans la composition des matériaux commercialisés

^d www.oqai.fr

(le trichloréthylène, le benzène, le 2-éthylehexyle phtalate (DEHP), le dibutyle phtalate (DBP) concernés par cette interdiction)^e,

- maîtriser les sources d'émission en obligeant l'étiquetage (A+, A, B ou C) depuis le 1^{er} janvier 2012, des produits de construction et de décoration, en fonction des facteurs d'émission mesurés et des concentrations d'expositions calculées pour dix composés organiques volatils (le formaldéhyde, l'acétaldéhyde, le toluène, le tétrachloréthylène, les xylènes, le 1,2,4 triméthylbenzène, le 1,4-dichlorobenzène, l'éthylbenzène, le 2-butoxyéthanol et le styrène)^f,
- connaître les niveaux des polluants présents dans les ERP (Etablissements Recevant du Public) par l'obligation de mesurer l'activité du radon dans 31 départements classés prioritaires et dans les lieux ouverts au public (dans les établissements d'enseignement, les établissements sanitaires et sociaux qui hébergent des personnes, les établissements thermaux, les établissements pénitentiaires)^g. Puis, en obligeant la mesure des concentrations en formaldéhyde, benzène et en dioxyde de carbone dans certains ERP (les établissements d'accueil collectif d'enfants de moins de six ans, les espaces de loisirs, les établissements d'enseignements ou de formation professionnelle du 1^{er} ou du 2nd degré, les écoles maternelles, les écoles élémentaires, les établissements sanitaires et sociaux, les établissements pénitentiaires pour mineurs et les piscines).

De façon générale, il s'en est suivi une diminution quantitative de la pollution de l'air intérieur et une modification de la composition de l'air intérieur, depuis la fin du 20^{ème} siècle, également attribuable au changement des habitudes de vie des occupants. Les concentrations de certains polluants jugés dangereux ou préjudiciables pour l'homme (le benzène, les xylènes,...) ont diminué. Cependant, de nouvelles familles de substances sont apparues, comme les composés organiques semi-volatils ou les nanoparticules [10]. L'impact de la pollution de l'air intérieur sur la santé, en particulier sur l'appareil respiratoire reste néanmoins préoccupant.

Dans la suite de ce chapitre, nous nous intéresserons particulièrement aux COV et à leurs impacts sur la santé respiratoire.

I.1.2 Les composés organiques volatils (COV)

Les COV sont des molécules possédant au moins un élément carbone relié à une ou plusieurs atomes (hydrogène, oxygène, azote, halogènes (brome, iode, chlore, fluor, soufre, silicium, phosphore etc...)) et ayant pour point commun une grande volatilité, c'est-à-dire que dans des conditions normales de température et de pression atmosphérique, ils passent d'un état liquide à un état gazeux (la vaporisation). Les COV peuvent être d'origine naturelle ou anthropique.

Plusieurs définitions des COV sont utilisées, celles-ci varient en fonction du critère choisi pour déterminer la volatilité d'un composé : soit la pression de vapeur saturante, soit le point d'ébullition [40]. Deux définitions sont les plus souvent évoquées. Celle énoncée dans le paragraphe 17 de l'article 2 de la directive européenne n°1999/13/CE, qui définit un COV comme « tout composé ayant une pression de vapeur de 0,01 kPa ou plus à une température de 293,15 K (20°C) ou ayant une volatilité correspondante dans les conditions d'utilisation particulières ». Et celle du décret

^e Arrêté du 30/04/2009 et arrêté modificatif du 28/05/2009.

^f Arrêté du 19/04/2011 et arrêté modificatif du 20/04/2012.

^g Arrêté du 22 juillet 2004.

n° 2006-623, qui définit les COV comme regroupant tous les composés organiques dont le point d'ébullition, mesuré à la pression standard de 101,3 kPa, est inférieur ou égal à 250 °C.

L'OMS a adopté en 1989, une classification des COV établie selon la température d'ébullition du composé, distinguant trois sous-groupes :

- Les composés organiques très volatils, dont le point d'ébullition est compris entre 0 et 50-100 °C,
- Les composés organiques volatils, entre 50-100 et 240-260 °C,
- Les composés organiques semi-volatils (composés lourds volatils qu'à proximité d'une source chaude), entre 240-260 et 360-400 °C.

Une quatrième classe a été constituée pour les matières organiques particulaires, dont la température d'ébullition est supérieure à 380 °C.

Selon les définitions, certains composés figurent ou non dans la dénomination COV. C'est le cas du formaldéhyde dont le point d'ébullition est -19°C, qui est néanmoins souvent étudié en même temps que les COV en raison de son omniprésence dans les espaces intérieurs, et des fortes concentrations retrouvées en environnement intérieur [40]. Le méthane dont le point d'ébullition est à -161°C, est souvent exclu de la définition des COV, de part sa très forte production naturelle dans l'atmosphère, on retrouve parfois dans la littérature la dénomination COVNM (Composés Organiques Volatils Non Méthaniques) [21].

Une grande diversité des structures et des propriétés des COV existe. Nous choisisons dans la suite de ce travail, pour une meilleure visibilité, de classer les COV selon leurs familles chimiques.

I.1.2.1 Classification des COV de l'air intérieur

Il existe un grand nombre de COV présents dans l'environnement intérieur, ils peuvent être regroupés en 3 familles chimiques différentes d'hydrocarbures :

Les hydrocarbures aromatiques, constitués d'au moins un noyau aromatique comme le benzène, le toluène, les xylènes, l'éthylbenzène, le styrène, ou de plusieurs, comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (naphtalène, pyrène...). Ils sont retrouvés dans la formulation des peintures, des vernis, des encres et des détergents [41].

Les hydrocarbures aliphatiques à chaîne carbonée ouverte, comme les hydrocarbures saturés (les alcanes), les hydrocarbures insaturés (les alcènes et alcynes) et les hydrocarbures alicycliques (hydrocarbures aliphatiques cycliques : les cycloalcanes, les cycloalcènes, les cycloalcadiènes, les terpènes,...). Ils sont utilisés généralement comme solvants de peintures, de vernis, de laques et comme intermédiaires de synthèse ou comme agents dégraissants à chaud ou à froid [42].

Les hydrocarbures substitués, contenant un atome autre que le carbone et l'hydrogène. Dans cette famille on distingue 7 sous-groupes :

- **Les hydrocarbures halogénés** (le chlorobenzène, le dichlorométhane, le tétrachloréthylène, le trichloréthylène,...), à propriété ininflammable et décapante, sont utilisés dans l'environnement intérieur comme solvants, diluants de colles, d'adhésifs, de peintures, de vernis, d'encres, de décapants. Ils sont utilisés également comme intermédiaires de synthèse dans les retardateurs de flamme, les fluides frigorigènes et dans les fluides propulseurs des générateurs d'aérosols [43].
- **Les alcools** (primaires, secondaires ou tertiaires : le méthanol, l'éthanol, propanol, butanol,...), à propriété inflammable et déshydratante, sont utilisés comme solvants, diluants d'encres, de résines, de vernis, de peintures et de colles à moquette [44].

- **Les aldéhydes** (le formaldéhyde, l'acroléine, le propanal, le butanal,...) sont des intermédiaires de synthèse ayant un fort pouvoir de diffusion mais également des agents désinfectants. On les retrouve dans la composition de matières plastiques, de solvants, de résines dans l'industrie du bois, de textiles, de colles, de peintures et dans les matériaux d'isolation [45].
- **Les cétones** (l'acétone, le méthyléthylcétone, le cyclohexane, le méthylisobutylcétone,...) sont des agents inflammables et séchants. Ils sont utilisés comme solvants de peintures, de laques, de vernis, de colles, d'adhésifs, de lingettes et comme intermédiaires de synthèse des matières plastiques [46].
- **Les éthers** comme les éthers de glycol : l'éthylène glycol, le propylène glycol, le méthyl glycol, le diméthylglycol, ou les esters comme l'acétate d'éthylglycol, sont utilisés comme solvants de peintures ou comme dissolvants de matières plastiques, de colles, de polychlorures de vinyle (PVC), de peintures, d'encre et de vernis [47].
- **Les acides**, comme l'acide formique, l'acide acétique, sont utilisés dans l'industrie alimentaire, textile et dans les produits d'entretien et de consommation courante. Ce sont des agents bactériostatiques [48].
- **Les amines** (primaires, secondaires ou tertiaires), les amides et nitriles comme l'acétonitrile, sont des agents de solubilisation pour résines, produits phytosanitaires et des agents stabilisants pour les hydrocarbures ou les cétones [40, 49].

Les COV les plus fréquemment évalués dans l'air intérieur sont le benzène, le toluène, le formaldéhyde, l'acétaldéhyde, l'éthylbenzène, les xylènes, le 1,2,4-triméthylbenzène, le 1,3,5-triméthylbenzène, le styrène, le *n*-nonane, le *n*-decane, le *n*-undecane, le limonène [50, 51]. Le tableau II résume les propriétés physico-chimiques des COV les plus évalués dans l'environnement intérieur.

Il existe une quantité de sources de COV dans l'environnement. Il se dégage néanmoins, deux grandes catégories de sources ; les sources anthropiques et les sources non anthropiques. Les sources anthropiques sont regroupées en secteurs : on distingue les sources de COV provenant de la transformation énergétique, de l'industrie manufacturière, du secteur résidentiel et tertiaire, de l'agriculture et sylviculture, et du transport routier et aérien. En France, l'association CITEPA (Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmosphérique) a recensé pour l'année 2012, que le premier secteur émetteur de COV dans l'environnement était le secteur résidentiel et tertiaire : celui-ci représente près de 41 % des émissions en COV totaux (291 kT), ce qui le place devant l'industrie manufacturière (36 % des émissions en COV, 253 kT). Le rapport d'inventaire des émissions atmosphériques, datant de 2012, publié par l'Agence Européenne pour l'Environnement, confirme ces résultats et indique que les émissions de COV par des solvants et des produits d'utilisation courante sont les plus émetteurs dans l'environnement (44 %) ^h.

Dans le cadre de ces travaux nous nous intéresserons principalement aux sources anthropiques et en particulier aux sources provenant de l'habitat ; celles-ci étant diverses et variées, nous aborderons donc seulement les principales sources selon la littérature.

^h European Union emission inventory report 1990–2012 under the UNECE Convention on Long-range Transboundary Air Pollution (LRTAP).

TABLEAU II – Propriétés physico-chimiques des COV les plus évalués dans l'air intérieur.

Famille Chimique	Nom usuel	N° CAS	Masse molaire (g/mol)	Point d'ébullition (°C)	Pression de vapeur saturante (Pa)
Hydrocarbures aromatiques	Benzène	71-43-2	78,11	80,1	9,97.10 ³ (à 20°C)
	Toluène	108-88-3	92,14	110,6	3.10 ³ (à 20°C)
	<i>o</i> -xylène	95-47-6	106,16	144,4	1,33.10 ³ (à 31,2°C)
	<i>m</i> -xylène	108-38-3	106,16	139,1	1,33.10 ³ (à 28,3°C)
	<i>p</i> -xylène	106-42-3	106,16	138,4	1,33.10 ³ (à 27,3°C)
	Ethylbenzène	100-41-4	106,16	136,2	0,93.10 ³ (à 20°C)
	1'2'4- triméthylbenzène	95-63-6	120,19	169-171	0,24.10 ³ (à 25°C)
	1,3,5-triméthylbenzène	108-67-8	120,19	164,72	0,25.10 ³ (à 20°C)
Hydrocarbures aliphatiques	Styrène	100-42-5	104,15	145-156	0,667.10 ³ (à 20°C)
	Limonène	5989-27-5 (R)	136,2	176	0,4.10 ³ (à 14,4°C)
		5989-54-8 (S)(-)			
		138-86-3 (RS)			
	<i>n</i> -nonane	111-84-2	128,2	151	0,42.10 ³ (à 20°C)
	<i>n</i> -décane	124-18-5	142,28	174	181 (à 25°C)
	<i>n</i> -undécane	1120-21-4	156,3	195,93	55,62 (à 25°C)
Hydrocarbures substitués (Aldéhydes)	Acétaldéhyde	75-07-0	44,05	20,16	279,4.10 ³ (à 50°C)
	Formaldéhyde	50-00-0	30,03	-19,1	517-519.10 ³ (à 25°C)

CAS : Chemical Abstracts Services

I.1.2.2 Sources de COV dans l'environnement intérieur – Cas de l'habitat

En raison de leurs propriétés physico-chimiques, les COV sont très utilisés dans la composition de nombreux matériaux de construction (de rénovation), de décoration et de produits de consommation courante. Ils peuvent être émis dans l'atmosphère de façon spontanée ou *via* des processus de combustion.

Dans la littérature, l'identification des sources est réalisée principalement par le biais des dosages des COV dans des environnements réels ou dans des chambres et cellules d'émission spécifiques. Les dosages réalisés dans les environnements intérieurs réels peuvent être couplés à des mesures extérieures afin d'identifier l'origine de la source, ou d'un questionnaire environnemental permettant de définir les caractéristiques du logement et d'associer les dosages effectués à des sources spécifiques [11].

Le profil d'émission des COV peut varier en fonction des paramètres de confort (température, humidité, ventilation), de l'âge des matériaux et produits de consommation courante, des propriétés physico-chimiques des COV et des interactions existantes entre les composés. Les émissions peuvent être ponctuelles ou périodiques, ou s'étendre sur une longue période de temps (quelques jours, semaines ou mois).

Différents types de sources ont ainsi été caractérisées dans l'habitat : les sources **continues** (provenant des matériaux de construction, de rénovation et d'ameublement) et les sources **discontinues** (provenant de l'utilisation de produits d'entretien, du tabagisme, des réactions de combustion).

- Les sources continues

Les sources continues de l'air intérieur proviennent majoritairement du cadre de vie des occupants comme par exemple les matériaux de construction, de rénovation mais également de décoration. Les matériaux de construction et de décoration émettent dans l'atmosphère, différents types de COV, dont le plus courant, le formaldéhyde ; en voici quelques exemples :

- **Les mousses urée-formol** : elles ont beaucoup été utilisées pour l'isolation des logements dans les années soixante-dix. Actuellement, leur utilisation est réglementée par décret (décret n°88-693 du 6 mai 1988) et la variation maximale de concentration en formaldéhyde dans chaque pièce ne doit pas dépasser 250 µg/m³ après applicationⁱ.
- **Les produits dérivés du bois** : ils contiennent également du formaldéhyde retrouvé principalement dans la composition des résines aminoplastes, phénoplastes, acétals ou polyacétals, du fait de ses propriétés de cohésion et de liaison entre les différents composés des panneaux de contreplaqués, panneaux en fibres de bois. Ces panneaux sont utilisés pour les parquets, cloisons et dans certains meubles. Le bois utilisé dans les constructions émet également du formaldéhyde [52].
- **Les matériaux et produits plastiques** : ils contiennent du formaldéhyde, mais également des agents d'entraînement d'air et des retardateurs de flamme. Les tapis en PVC ou polyuréthane et les revêtements de sol en latex sont les plus émetteurs de formaldéhyde. Ils émettent également d'autres COV, principalement des hydrocarbures aromatiques et aliphatiques [53].
- **Les vernis, cires, colles et adhésifs** contiennent du formaldéhyde, mais aussi des hydrocarbures aromatiques, aliphatiques (des alcanes particulièrement et des terpènes) et des alcools [54, 55].
- **Les peintures à base d'eau et les peintures naturelles** contiennent également du formaldéhyde, celui-ci est utilisé principalement pour ses propriétés biocides. Nous détaillons ci-dessous, le cas des peintures.

Cas des peintures

Les peintures font parties des produits de rénovation et de décoration les plus utilisés dans l'habitat ; au sein de la cohorte de naissance PARIS [56] par exemple, il a été recensé que les peintures étaient le principal revêtement aux murs [57]. Leur utilisation a été associée à l'augmentation des concentrations totales en COV dans l'habitat au sein de plusieurs études épidémiologiques [58-60]. Deux types de peintures se distinguent ; les peintures à base de solvants organiques et les peintures à base d'eau (aqueuses). Certaines peintures dites « naturelles », réalisées avec des produits non issus de l'industrie pétrolière, sont commercialisées depuis une dizaine d'années, mais leurs utilisations restent confidentielles [52].

Les peintures à base de solvants organiques sont composées de liants (résines (vinyliques, acryliques, alkydes, phénoliques, aminées, époxydes, etc...) ou de durcissants (caoutchouc chlorés ou cycles, bitumes, goudron, gomme, etc...), de pigments, de composés de charges, d'additifs et d'adjuvants (solvants organiques : agents d'étalement, de matité, plastifiants, rhéologiques, dispersants et mouillants, des diluants, etc...) [61]. La concentration moyenne en COV totaux dans les

ⁱ Décret n°88-683 du 6 mai 1988 relatif à l'utilisation des mousses urée-formol dans les locaux à usage d'habitation ou destinés à une occupation humaine permanente ou semi-permanente, (NOR : INDB8800099D).

peintures à base de solvants organiques a été estimée à 275 g/L [52]. Différents types de solvants existent:

- Les solvants à faibles liaisons hydrogène comme les hydrocarbures aliphatiques, les hydrocarbures aromatiques (le toluène et les xylènes), les hydrocarbures chlorés,
- Les solvants accepteurs de liaisons hydrogène comme les cétones et les esters (l'éthylacétate, l'isopropylacétate, *n*-butyl-acétate, éthyl méthyl cétone),
- Les solvants accepteurs et donneurs de liaisons hydrogène principalement les alcools comme l'éthanol, 2-propanol, 1-butanol et l'isobutanol [62].

Certains de ces solvants vont s'évaporer plus rapidement que d'autres en fonction de leurs propriétés physico-chimiques et de l'état physique de la peinture (liquide ou solide), le profil de COV émis peut être alors totalement différent en fonction de la date d'application de la peinture [52]. Les travaux de Brown [63] ont permis d'évaluer les facteurs d'émission d'une peinture à base de solvants organiques après 8 h, un jour, trois jours et quatorze jours de dépôt de la peinture dans une chambre expérimentale ventilée et contrôlée en température et en humidité. Les résultats sont présentés dans le tableau III. Les principaux composés émis dans les premières heures (8 h) étaient les hydrocarbures aromatiques et aliphatiques alors que les aldéhydes étaient émis principalement au premier et troisième jour de séchage [52, 63].

TABLEAU III – Facteurs d'émissions de COV par une peinture à base de solvants organiques déposée dans une chambre en verre expérimentale ventilée et contrôlée en température et humidité, au cours du temps. Les facteurs d'émissions sont exprimés en $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{h}$ [52].

COV mesurés	8 heures	1 jour	3 jours	14 jours
Toluène	< 100	16	4	<2
Ethylbenzène	140	<18	<8	<2
<i>o,m,p</i> -xylène	2600	<30	4	<2
3-méthylethylbenzène	4600	<60	<8	<4
1,2,4-triméthylbenzène	13000	46	10	2
<i>n</i> -décane	24000	38	8	<2
N-undécane	110000	460	12	<2
<i>n</i> -dodécane	54000	8400	60	<2
Hexanal	680	11000	1600	120
Heptanal	<600	260	80	14
Octanal	<3000	84	40	32
[COV] totale	840000	76000	13000	1400

Les peintures aqueuses, sont composées de liants (résines ou polymères en latex), de pigments, de composés de charges, d'adjuvants ou d'additifs (des solvants organiques : agents épaississants, coalescents, neutralisants, antifongiques, biocides, etc...), et de diluants (eau ou alcools) [64]. Les peintures à base de polymères en latex sont les plus fréquentes et les plus utilisées à l'heure actuelle. La concentration en COV moyenne dans les peintures à base latex a été estimée à 180 g/L, bien que certaines peintures peuvent contenir moins de 12 g/L de COV [52]. Les COV utilisés sont principalement des solvants organiques qui permettent d'assurer la stabilité de la peinture, la coalescence des particules de latex, ainsi que la formation d'un film de peinture homogène. Ils sont

généralement de natures différentes des solvants présents dans les peintures à base de solvants organiques ; ainsi on retrouve des alcools (1-butanol, 2-butanol,...), des éthers de glycol (éthylène glycol, butyléther, propylène glycol,...) et des esters de glycol (éthylène glycol butyl éther, diéthylène glycol éthyl éther,...) [64]. Les travaux de Brown [63] ont également permis de comparer les facteurs d'émissions de quatre peintures aqueuses différentes. Les résultats sont présentés dans le tableau IV [52]. Ces travaux mettent en avant la variabilité d'émission des COV selon le type de peinture à l'eau évaluée et selon le nombre de jours de séchage. L'auteur montre néanmoins que l'évaporation est plus importante dans les premières heures de l'application comparée au troisième et quatorzième jour de séchage. Cet effet temps de la diminution d'émission en COV a été confirmé dans d'autres études [65-68]. Certains auteurs mettent également en avant le rôle du support employé pour peindre (bois, plastique, verre,...) qui pourrait augmenter ou retarder les émissions de COV dans l'atmosphère [69, 70].

Les différents types de peintures vont émettre dans l'atmosphère une certaine quantité de COV qui va être dépendante du type de peinture utilisé, de la composition, des paramètres intérieurs et du support utilisé pour peindre. Les émissions sont majoritairement décroissantes dans le temps et peuvent durer pendant plusieurs semaines voir plusieurs mois. Norbäck *et al.*[71] ont démontré que les concentrations totales de COV émises par les peintures à base d'eau étaient cent fois moins importantes que celles émises par les peintures à base de solvants organiques. En France, la réglementation exige un étiquetage et une classification des peintures en fonction des concentrations d'émissions de dix COV spécifiques^j. Ce point oblige les industriels à contrôler les émissions de COV par les peintures et à favoriser le remplacement de l'utilisation des peintures à base de solvants organiques par des peintures aqueuses.

TABLEAU IV – Facteurs d'émissions de COV par quatre peintures à base d'eau, déposées individuellement dans une chambre en verre expérimentale ventilée et contrôlée en température et humidité au cours du temps. Les facteurs d'émissions sont exprimés en $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{h}$ [52].

COV mesurés	8 heures	1 jour	3 jours	14 jours
Peinture N°1				
<i>m,p</i> -xylène	42	<12	<2	<1
1,2-propylène glycol éthyl éther	72000	44000	4000	<2
<i>n</i> -butyléther	300	36	<2	<2
Ethylène glycol butyl éther	380	<60	<4	<2
Texanol	38000	13200	3000	220
Peinture N°2				
Acétone	1700	60	2	<2
Isobutanol	780	<24	68	10
1,2-propylène glycol	110000	9000	<12	<8
Texanol	10000	3600	1900	160
Peinture N°3				
Acétone	1900	300	86	24
1,2-propylène glycol	82000	5000	<2	<2
Diéthylène glycol butyl éther	8000	2600	340	8

^j Arrêté du 19/04/2011 et arrêté modificatif du 20/04/2012.

Peinture N°4				
Isobutyraldéhyde	640	-	64	<2
1,2-propylène glycol	62000	3000	140	10
Texanol	16000	10000	2000	40

En parallèle des sources continues, on observe dans l'habitat, des sources dites discontinues. Celles-ci sont principalement liées au mode de vie des occupants.

- Sources discontinues

Plusieurs sources discontinues existent dans l'habitat, parmi les plus courantes on retrouve :

- **Les produits de nettoyage et désodorisants d'intérieur.** Les produits de nettoyage et d'entretien de l'habitat sont nombreux, constitués à la fois de composés inorganiques et organiques [72]. Sack *et al.* [73] en 1992 ont investigué une centaine de produits ménagers, au sein desquels, les COV les plus fréquemment retrouvés étaient : les hydrocarbures aliphatiques, les hydrocarbures aromatiques (le *m*-xylène a été retrouvé dans 33 % des échantillons), hydrocarbures oxygénés et des terpènes. Les COV retrouvés en plus forte concentration étaient l'acétone, le 1,1,1-trichloroéthane, le *n*-octane, le chlorure de méthylène. Ces résultats ont été confirmés par d'autres études plus récentes [74-76]. Les désodorisants d'intérieur sont très utilisés à l'heure actuelle, ils se présentent généralement sous la forme d'aérosols, et sont composés de bactéricides et de solvants [72].
- **Les réactions de combustion** dans l'habitat vont également émettre des COV. Ces réactions sont retrouvées lors de l'utilisation de systèmes de chauffage (au gaz, au bois ou au fioul) et de systèmes de cuisson (cuisinière au gaz), mais également lors de la cuisson des aliments. Alors que les systèmes de chauffage et de cuisson semblent émettre principalement du formaldéhyde, la cuisson des aliments émet des COV en grande quantité comme les aldéhydes et les hydrocarbures aromatiques (acroléine, acétaldéhyde, benzène et autres COV insaturés,...) [72].
- **Le tabagisme** est associé à l'augmentation des concentrations en COV dans l'habitat. Près de 4000 espèces chimiques ont été recensées dans les atmosphères dégagées par la fumée de tabac (la fumée primaire et la fumée secondaire). Les hydrocarbures aromatiques et aldéhydes ont été retrouvés en plus grande quantité, le polluant majoritaire reste cependant l'acétaldéhyde [77]. Dans la littérature, certains des COV présents dans l'habitat sont associés spécifiquement à la présence de tabagisme ; comme l'acétaldéhyde, le naphthalène ou le benzène [58, 78].
- **Les sources secondaires** : la présence d'un grand nombre de polluants dans l'air intérieur facilite les réactions chimiques, avec pour conséquence l'augmentation des niveaux de certains COV, ou leur transformation en d'autres polluants. La présence dans l'atmosphère des habitats d'espèces réactives comme les NO_x et l'O₃, des radicaux hydroxydes (HO*) va induire la production de polluants secondaires comme les aldéhydes par réaction avec d'autres composés présents dans l'atmosphère ou sur des surfaces. Pour exemple, l'O₃ va réagir principalement avec les COV de la famille des terpènes mais aussi avec le styrène présent dans l'atmosphère et avec certains sols (linoléum, les moquettes) [79]. La relation entre l'ozone ambiant et les aldéhydes a été étudiée au laboratoire lors de l'investigation environnementale menée dans 196 logements parisiens au sein de la cohorte PARIS. Les résultats ont montré une augmentation de la concentration en formaldéhyde et en hexanal respectivement de 4 et 11 %, lorsque la concentration en ozone augmente pendant huit heures de 20 µg/m³ [80]. Ces réactions vont

cependant être conditionnées par la composition des atmosphères, les niveaux des polluants, les propriétés physico-chimiques des molécules et les paramètres de l'air intérieur (la ventilation, la température et l'humidité).

D'autres produits et équipements utilisés à l'intérieur vont être des sources discontinues de COV, comme les produits d'hygiène, les cosmétiques, les bougies, les parfums d'intérieur, l'encens, les équipements électroniques (télévision, ordinateurs, imprimantes, etc...). La présence de sources extérieures de COV comme un trafic routier, des industries chimiques (pétrochimie, phytosanitaire, pharmaceutiques, de fabrication de polymères, de peintures, etc...) contribue également à l'augmentation des COV dans l'habitat [72].

- Facteurs d'ambiance influençant la concentration en COV dans l'air intérieur

La composition et le taux d'émission des COV se dégageant des matériaux utilisés dans les espaces intérieurs est influencé par les paramètres d'ambiance comme la vitesse de l'air (la ventilation) qui influence les échanges, la température qui conditionne les concentrations en COV et l'humidité relative qui agit sur la composition en COV.

La vitesse de l'air (la ventilation)

Une ventilation adéquate est essentielle au maintien du confort thermique et olfactif des occupants d'espaces clos. Elle permet les échanges entre l'air extérieur et l'air intérieur et une dilution des polluants présents dans ces espaces. Son effet varie en fonction de la composition des constructions et du type d'installation et de fournitures présentes dans l'environnement intérieur. La ventilation peut être manuelle (ouverture des fenêtres) ou mécanique (installation de ventilation mécanique contrôlée (VMC)). Un taux de ventilation de 25 L par seconde et par personne réduirait efficacement certains symptômes dont ceux du syndrome des bâtiments malsains [81].

La température

La température influence certains phénomènes physiques comme l'adsorption, la désorption et la vaporisation. Plus la température est élevée, moins l'adsorption des matériaux est grande ; et inversement pour la désorption [82]. La température est également un facteur essentiel impliqué dans le phénomène de vaporisation dans l'atmosphère des COV en phase liquide [83]. En effet, l'élévation de la température s'accompagne d'une augmentation de la concentration en COV dans l'atmosphère [84]. Différentes études confirment cette observation en montrant que les concentrations en COV mesurées dans l'atmosphère sont variables d'une saison à l'autre (hiver/été), et d'un espace géographique à un autre [85, 86].

Néanmoins, l'influence de la température sur ces phénomènes dépend des propriétés physico-chimiques des molécules, de la composition des atmosphères d'air intérieur, de la vitesse de l'air et de l'humidité relative. Certaines études démontrent une absence de corrélation positive entre l'augmentation de la température et l'émission dans l'atmosphère des COV ayant un bas point d'ébullition, inférieur à la température au début de l'étude [87].

L'humidité relative

Le taux maximal d'humidité relative dans l'air d'un logement se situe entre 40-70 % pour une température entre 18-22°C^k. Selon Fanger *et al.* [88], l'humidité relative élevée (> 70 %) associée à une température élevée (> 25°C) est préjudiciable à la qualité de l'air intérieur. L'humidité relative influence le relargage des COV dans le cas d'interaction avec des composés aqueux déposés sur les surfaces, tels que les peintures ou les vernis [89]. De plus, les surfaces humides favorisent le développement des contaminants microbiologiques et entraînent, selon l'espèce en présence, l'émission de polluants dans l'atmosphère (des contaminants biologiques tels que les spores ou chimiques comme les COV microbiens) [22].

En conclusion, les paramètres de confort de l'air intérieur peuvent influencer les émissions de polluants, dont les COV, dans l'air intérieur. Cependant les données de la littérature restent relativement contradictoires car les processus d'émission des polluants sont mal connus et sont conditionnés par les activités des occupants [23].

I.1.2.3 Concentrations en COV dans l'environnement intérieur- Cas de l'habitat

Les concentrations en COV dans l'air intérieur peuvent être très variables. Elles dépendent essentiellement de la situation géographique, du lieu de détection (lieux de travail, habitat, transports, etc...), de la période de détection (hiver et été), de la méthodologie de prélèvement et de dosage utilisée et de l'ancienneté des constructions et des habitudes de vie des occupants (tabagisme, utilisation de désodorisants, de produits d'entretien, de soins, système de chauffage, de cuisson, etc...) [86, 90, 91]. Le tableau V présente les concentrations de quelques COV mesurées dans l'habitat, dans différentes parties du monde.

Toutes ces études ont été réalisées à l'aide de capteurs passifs déposés dans les logements pendant 7 jours [57, 92-94] ou pendant 24 h [95]. Les périodes de prélèvements sont très variables (été ou hiver) et ont été réalisées pour certaines dans une même étude à des années différentes [57, 92-95]. Les nombres de COV détectés sont équivalents pour quatre études (entre 16 et 19 COV), une seule étude a détecté un ensemble de 56 COV [92]. Une seule étude a été réalisée dans les logements d'enfants ayant des symptômes d'asthme [92]. Les effectifs sont variables, le maximum est observé pour l'étude de l'OQAI (Observatoire de la Qualité de l'Air intérieur) (567), et l'effectif minimum (100) est observé pour l'étude asiatique de Guo *et al.* [95].

Les niveaux de formaldéhyde observés restent très proches pour les deux études françaises (19,6 vs 19,8 µg/m³ respectivement pour l'OQAI et la cohorte PARIS), alors que dans l'étude asiatique la concentration en formaldéhyde mesurée est plus de cinq fois supérieure [95]. Cette variation s'explique principalement par la différence de composition des matériaux de construction, du cadre et mode de vie des occupants (différences dans la taille des espaces et dans le nombre d'occupants) [95]. Dans ces trois études, le formaldéhyde est l'un des composés les plus abondants et généralement le composé le plus souvent détecté (90 à 99 %) [57, 93, 95].

Les hydrocarbures aromatiques, en particulier les BTEX (le benzène, le toluène, les xylènes, l'éthylbenzène) sont détectés de façon fréquente dans l'ensemble des cinq études [57, 92-95]. Les concentrations en toluène, *m/p*-xylènes sont variables d'une étude à l'autre, alors que les concentrations en benzène et en éthylbenzène restent dans les mêmes ordres de grandeur.

^k www.oqai.fr

Les concentrations en styrène semblent être relativement similaires dans les études françaises, européenne et américaine, alors qu'un facteur dix est observable au sein de l'étude asiatique. Dans cette étude, les auteurs ont comparé les concentrations en styrène mesurées au sein d'autres études asiatiques, et ont observé que les concentrations fortes en styrène étaient une spécificité des habitats à Hong-Kong [95]. Au sein de ces études asiatiques, les concentrations en COV totaux (correspondant à la somme des COV mesurés) restent néanmoins relativement proches (minimum 97 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ vs maximum 162 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) [93, 95].

TABLEAU V – Concentrations en COV mesurées dans l'habitat, dans différentes parties du monde

	France (OQA N=5671) [93]	Paris (cohorte PARIS N=196) [57]	Helsinki (EXPOLIS N=201) [94]	USA (N=126) [92]	Hong-Kong (N=100) [95]
Benzène	2,1 [1,9-2,2]	2 [1,1-7,7]	1,57 ± 1,94	2,27 [0,33-27,93]	–
Toluène	12,2 [11,4-13,7]	19 [7-195,4]	14,62 ± 24,86	11,62 [1,08-179,84]	15,3 ± 45,4
<i>m/p</i> -xylènes	5,6 [5,1-6]	10,4 [4,4-57,7]	6,13 ± 7,10	6,34 [1,39-98,48]	3 ± 2,3
<i>o</i> -xylène	2,3 [2,1-2,5]	–	0,55 ± 2,60	2,02 [0,34-30,46]	–
Ethylbenzène	2,3 [2,1-2,5]	2,7 [1,1-7,7]	2,17 ± 2,78	1,72 [0,43-22,47]	4,1 ± 2,9
Styrène	1 [0,9-1]	1,6 [0,7-7]	0,84 ± 1,56	0,70 [0,02-2,72]	10,9 ± 19,4
Formaldéhyde	19,6 [18,4-21]	19,8 [6,6-66]	–	–	112,3 ± 90,3
Acétaldéhyde	11,6 [10,8-12,3]	9,2 [3,9-49,8]	–	–	–
Σ COV*	97	152	143	150	162

* Σ COV : Somme des COV mesurés au sein des différentes études. Expression en $\mu\text{g}/\text{m}^3$.

[93] : Moyenne arithmétique [Min-Max] ; [94] : Moyenne géométrique ± Ecart-type ; [57] : Moyenne géométrique [Min-Max] ; [92] : Moyenne arithmétique [Min-Max] ; [95] : Moyenne arithmétique ± Ecart-type.

Dans la littérature, les concentrations en COV ont été mesurées également dans divers espaces clos comme les garages, les habitations, les écoles, les lieux de travail, les véhicules, les stations essence, les musées, les magasins de photocopies, les restaurants, les bars, les théâtres, etc... Dans ces études, les concentrations en COV sont supérieures aux concentrations de l'air extérieur et elles varient principalement en fonction des activités qui ont lieu dans ces espaces [91]. Les concentrations en COV sont souvent exprimées en COV totaux car cette valeur permet d'avoir une indication du niveau de pollution. Cet indicateur, compris entre 2000 et 3000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ est souvent associé à l'apparition des symptômes spécifiques des environnements intérieurs [96-98].

I.1.2.4 Mesurages dans les locaux

Les outils de mesure de COV dans l'environnement intérieur sont choisis en fonction de l'objectif que l'on veut atteindre. Ces objectifs peuvent être à portée:

- méthodologique afin de valider des protocoles d'étalonnage ou d'analyse,
- informationnelle dans l'intention d'identifier la présence d'un ou de plusieurs COV et de relier une concentration en COV avec un effet sanitaire,
- technique pour évaluer la force spécifique d'une source, d'un système de ventilation et enfin,
- réglementaire en vue d'évaluer les niveaux de conformité avec la législation en vigueur, de mesurer des COV pour fixer des limites d'exposition ou d'identifier un espace fortement contaminé [50].

Une revue de la littérature résume les différents dispositifs existants de mesure de COV à des niveaux environnementaux dans l'air intérieur. Ayoko *et al.* [50] distinguent les méthodes directes de dosage, des dosages après échantillonnage :

Les méthodes directes de dosage sont réalisées à l'aide d'appareils portables de mesure comme des chromatographes en phase gazeuse reliés à des systèmes de détection ou bien des nez électroniques [99]. Ces appareils permettent d'obtenir des données en temps réel et d'évaluer rapidement si une atmosphère est contaminée ou non. Les données de concentration totale en COV obtenues sont quantitatives et exprimées dans la majeure partie des cas en équivalent toluène. Ces méthodologies restent peu utilisées car très coûteuses et peu informatives sur la composition des atmosphères.

Les dosages après échantillonnage, les plus courants dans les environnements intérieurs, comprennent une première phase de prélèvement d'échantillons d'atmosphère de façon active ou passive, puis une phase d'analyse par méthode séparative soit en chromatographie en phase gazeuse (couplée à un détecteur à ionisation de flamme (FID) ou à un spectromètre de masse (MS)), soit en chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). Ce type de dosage permet l'identification et la quantification des différents COV. L'échantillonnage actif est le plus répandu ; il consiste à déplacer, à un flux d'air contrôlé, un volume d'air prédéterminé dans un récipient ou un adsorbant. Plusieurs types d'échantillonnages actifs par récipient existent : les sacs en polymères (Tedlar, Teflon, Mylar), les contenants (SUMMA, récipient siloxane). L'échantillonnage est rapide et permet d'analyser la présence d'une grande variété de COV polaires et non polaires. Néanmoins, il a été observé des pertes importantes de COV après échantillonnage, car les COV réagissent entre eux et avec les parois du récipient ou peuvent être dissouts dans le condensé d'eau formé à l'intérieur du récipient. Pour palier ces pertes, les parois des récipients utilisés sont le plus souvent électrolytiques ou recouvertes avec du siloxane et protégées de la lumière [50].

L'échantillonnage actif sur adsorbant reste la technique la plus utilisée à l'heure actuelle. Trois catégories d'adsorbants existent : les adsorbants poreux à base de polymères (TENAX, Chromosorb), les adsorbants à base de carbone (à base de charbon de bois, de graphite noir, carbitraps, anasorb, carboxens) et les adsorbants à base de gel de silice. Les adsorbants poreux à base de polymères et à base de carbone sont les plus utilisés dans la littérature [50, 100]. Le choix de l'adsorbant va dépendre de l'efficacité d'adsorption et de désorption pour les COV présents dans l'environnement intérieur. D'autres paramètres peuvent également rentrer en jeu : l'hydrophobicité, la thermo-stabilité et la capacité de charge de l'adsorbant. Certains COV ne réagissent pas directement avec l'adsorbant, il faut alors recouvrir celui-ci d'un composé qui va réagir avec le COV pour le capturer. C'est le cas du formaldéhyde, qui va réagir par exemple avec le 2,4-dinitrophenylhydrazine pour former des hydrazones stables qui vont pouvoir ensuite être analysées [101]. Cette méthodologie ne permet néanmoins pas d'obtenir tous les COV présents dans l'air échantillonné car certains ne seront pas capturés par l'adsorbant ou seront trop réactifs pour rester sur l'adsorbant. Elle ne permet également pas d'évaluer les variations de concentrations des COV dans le temps.

D'autres adsorbants existent et vont permettre des échantillonnages passifs, les COV sont adsorbés sur le support par diffusion sans l'intermédiaire d'un flux d'air dynamique. Le temps de capture est donc plus long allant de plusieurs heures (3MTMOVM—Organic Vapor Monitor, ORSA de Dräger, etc...) à plusieurs jours (Radiello®, Ogawa, etc...) [50].

Enfin, Il existe également des échantillonnages passifs par micro-extraction en phase solide (SPME). La SPME est constituée d'une fibre de silice recouverte de polymères (PDMS, PDMS/divinylbenzène, PDMS/carboxen) logée à l'intérieur d'une aiguille. La fibre est alors exposée dans l'atmosphère puis rétractée dans l'aiguille jusqu'à l'analyse. Cette procédure est affectée par certains facteurs environnementaux comme la température, car la conservation de l'échantillon nécessite une réfrigération. Les fibres peuvent être recouvertes également d'un agent dérivatif pour évaluer certains COV comme le formaldéhyde. Cette technique permet de réaliser des essais sur sites, de réaliser des pré-concentrations par échantillon dans des récipients, mais aussi de réaliser des dosages en espace de tête pour des solvants extraits de tubes adsorbants [102].

Compte-tenu de la diversité des COV et des concentrations présentes dans l'air intérieur, il reste difficile d'attribuer un impact sanitaire spécifique à l'exposition aux COV. Selon la famille chimique à laquelle appartient le COV, la dose et la durée d'exposition, les propriétés pharmacocinétiques de pénétration, d'accumulation dans l'organisme, de métabolisation et d'élimination vont être différentes. L'effet des COV sur la santé est donc très variable [103]. Molhave [36] suggère que l'exposition aux COV peut être néanmoins associée à cinq catégories d'effets :

- Les effets sur la réponse immunitaire et l'hypersensibilisation (l'asthme, les allergies, l'hypersensibilité non spécifique par exemple),
- Les effets respiratoires autres qu'immunologiques,
- Les effets cellulaires (apparition de cancers, autres effets cellulaires incluant les effets sur la reproduction),
- Les effets sensoriels et neurologiques (odeur, irritation, symptômes neurotoxiques),
- Les effets cardiovasculaires.

Il semble à l'heure actuelle que les effets des expositions aux COV ciblent majoritairement l'appareil respiratoire humain. Nous détaillerons les effets d'expositions aux COV sur la santé respiratoire humaine en nous intéressant particulièrement à l'apparition de pathologies respiratoires et allergiques.

I. 2 IMPACTS SANITAIRES DES COV DANS LES ENVIRONNEMENTS INTERIEURS – CAS DE L'HABITAT

Plusieurs outils existent dans la littérature pour évaluer les effets sanitaires des COV présents dans les environnements intérieurs : les études épidémiologiques, les études *in vivo* (chez l'homme et chez l'animal) et les études *in vitro*. Ces dernières doivent être élaborées selon des paramètres définis et standardisés. Le choix du temps et du mode d'exposition doivent être suffisamment pertinents pour répondre à la question posée. Dans la suite de cet état des connaissances, nous nous focaliserons principalement sur l'impact des COV de l'habitat sur la santé respiratoire.

I.2.1 Etudes épidémiologiques

Actuellement, une trentaine d'études épidémiologiques évaluent la relation entre l'exposition domestique aux différents COV et le développement ou l'exacerbation de pathologies respiratoires et allergiques. La pathologie respiratoire la plus étudiée est l'asthme ou les symptômes qui lui sont associés tels que les sifflements respiratoires, la toux (nocturne), le rhume des foins et les écoulements nasaux [58, 78, 104-118]. D'autres pathologies reliées à l'allergie sont également étudiées en parallèle comme la rhinite allergique, les infections respiratoires basses, la rhino-conjonctivite, la dermatite atopique et les allergies alimentaires [108, 119, 120]. Les études en question sont menées principalement dans des populations de nouveau-nés, de jeunes enfants de 0 à 3 ans ou d'adolescents [58, 59, 78, 104, 106, 107, 109-119, 121-124]. Quelques études suivent des populations de femmes enceintes ou d'adultes de plus de 15 ans [78, 108, 120, 125-127]. Les populations étudiées sont essentiellement européennes, mais on relève cependant des études en population australienne [106, 111, 112, 123], américaine [117, 126], coréenne [105], chinoise [116], japonaise [125], ou encore bangladaise [114]. Les effectifs sont très variables, allant d'une à plusieurs centaines de sujets.

Les données sanitaires sont récoltées par le biais de questionnaires standardisés (le questionnaire ISAAC par exemple) ou de questionnaires spécifiquement élaborés pour l'étude. Elles sont parfois couplées à des mesures spirométriques ($VEMS_1^l$, $VEMS_1/CVF^m$, $DEM_{25-75\%}^n, \dots$), des tests de réactivité bronchique ou des tests cutanés. Les biomarqueurs de l'allergie (IgE, cytokines, lymphocytes) sont quelquefois dosés dans le sang prélevé chez l'enfant, ou dans le cordon ombilical à la naissance dans le cadre du suivi de femmes enceintes [78, 109, 120].

Au cours de ces études, l'évaluation de l'exposition est réalisée au moyen d'investigations environnementales par des mesures directes de COV dans les logements des populations étudiées. Les prélèvements pour les mesurages ont lieu principalement dans les chambres et le salon des logements [58, 78, 107, 108, 110, 112, 121], ou simultanément dans plusieurs endroits (la cuisine, la salle de classe des enfants) [112, 124, 127]. Les mesures sont parfois répétées et peuvent être réalisées à des saisons différentes. Il n'existe pas de protocole standardisé pour évaluer l'exposition aux COV dans l'air intérieur, et il s'en suit une grande diversité de procédures : en fonction de la nature du capteur et de son action (passive ou active), du temps de prélèvement (de quelques heures à plusieurs jours), du nombre de répétitions et de la méthode utilisée pour l'analyse (HPLC, GC/MS,

^l $VEMS_1$: Volume Maximal Expiré pendant la première Seconde d'une expiration forcée

^m $VEMS_1/CVF$: Volume Maximal Expiré pendant la première Seconde d'une expiration forcée sur la Capacité Vitale Forcée

ⁿ $DEM_{25-75\%}$: Débit Expiratoire Maximal médian entre 25 et 75 % de la capacité vitale forcée

FID,...). Les COV principalement étudiés sont les hydrocarbures aromatiques (BTEX ; le benzène, le toluène, l'éthylbenzène et les xylènes), aliphatiques (les alcanes) et les aldéhydes, en particulier le formaldéhyde pour ses propriétés irritantes et sensibilisantes. Une seule étude a évalué l'impact des COV de la famille des COV d'origine microbienne (principalement des hydrocarbures substitués de la famille des alcools) [125]. Les sources de COV (les travaux de rénovation et de décoration, la combustion, la fumée de tabac,...) sont parfois identifiées, à l'aide de questionnaires environnementaux [58, 78, 106, 111, 114, 118, 119, 122, 127].

Nous traiterons les résultats de ces études par famille chimique de COV, les hydrocarbures aromatiques, aliphatiques et substitués. Nous reviendrons également sur l'impact des expositions à la peinture dans l'habitat.

- Les hydrocarbures aromatiques

Les COV aromatiques retrouvés dans les logements sont associés au diagnostic de l'asthme, aux infections respiratoires et aux détériorations de la fonction pulmonaire, ainsi qu'aux modifications des biomarqueurs de l'allergie.

Rôle des COV aromatiques dans l'apparition et le développement de l'asthme ou de symptômes associés à l'asthme

Au sein de la littérature, nous avons recensé quatre études démontrant des associations entre les COV aromatiques et l'apparition de l'asthme ou de symptômes associés à l'asthme [104, 106, 108, 126].

Chez l'enfant, deux études cas-témoins se distinguent, l'une, l'étude australienne de Rumchev *et al.* [106] datant de 2004 et portant sur des enfants (192) âgés entre 6 mois et 3 ans, recrutés aux urgences et présentant, ou non, un diagnostic d'asthme, l'autre, l'étude française de Hulin *et al.* [104] en 2010 réalisée dans une population d'enfants (114) asthmatiques ou non, âgés entre 9 et 15 ans, vivants en milieu urbain ou rural.

Dans l'étude de Rumchev *et al.* [106], 2004, les concentrations d'exposition au **benzène** et au **toluène** ont été mesurées à deux reprises, pendant l'hiver et pendant l'été de la même année, afin d'évaluer la variabilité des expositions, à l'aide de capteurs actifs. Lorsque celles-ci augmentent de 10 unités ($\mu\text{g}/\text{m}^3$), le risque de développer de l'asthme est deux et trois fois plus élevé, ($\text{ORa} = 2,92$; 95 % IC [2,250-3,795]) pour le benzène et ($\text{ORa} = 1,84$; 95 % IC [1,40-2,41]) pour le toluène, après ajustements, respectivement. Ce risque était multiplié par huit lorsque les concentrations d'exposition au **benzène** dépassaient $20 \mu\text{g}/\text{m}^3$ et multiplié par quatre, lorsque les concentrations en COV totaux étaient supérieures à $60 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Il est à préciser qu'au sein de la population d'étude, les cas étaient exposés à des niveaux significativement supérieurs en COV (le benzène, le toluène, les xylènes, l'éthylbenzène, le styrène, le chlorobenzène, 1,2-dichlorobenzène, 1,3-dichlorobenzène, 1,4-dichlorobenzène) par rapport aux témoins ($p < 0,01$) ($78,5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ vs $36,2 \mu\text{g}/\text{m}^3$).

L'étude de Hulin *et al.* [104], datant de 2010, confirme l'impact de l'exposition au **toluène**, en rapportant également un risque trois fois plus élevé de développer de l'asthme pour les plus fortes concentrations d'exposition ($20,2 [2,1-522,5] \mu\text{g}/\text{m}^3$) ($\text{ORa} = 2,73$; 95 % IC [1,28-5,83]). L'évaluation de l'exposition avait néanmoins été réalisée à l'aide d'une méthodologie différente de celle de Rumchev *et al.* [106] en utilisant des capteurs passifs, déposés pendant une semaine dans le salon des logements d'enfants.

Par ailleurs, deux études transversales ont été réalisées dans des populations adultes : l'étude de Billionnet *et al.* [108], en 2011, dans 567 logements comprenant 1612 individus d'âge supérieur à 15 ans, et l'étude de Arif *et al.* [126], datant de 2007 comprenant 160 adultes (20-59 ans) appartenant à l'étude américaine NHANES (the National Health and Nutrition Examination Survey).

Pour l'étude de Billionnet *et al.* [108], l'exposition au **1, 2, 4 triméthylbenzène** ($4 \mu\text{g}/\text{m}^3$ [0-111,7]) est associée significativement au risque d'apparition d'asthme (ORa=2,10 ; 95% IC [1,21-3,65]). Les expositions à l'éthylbenzène, au trichloroéthylène et aux *m-p-o*-xylène sont associées à l'apparition de rhinite allergique (odds ratio respectifs : ORa=1,48 ; 95 % IC [1,09-2,02], ORa=1,16 ; 95 % IC [1,07-2], ORa=1,43 ; 95 % IC [1,03-1,99]). L'intérêt de cette étude est aussi son approche multi-pollution (GEE) permettant d'associer directement des classes de COV à l'apparition de pathologies respiratoires et allergiques. Ainsi, les auteurs ont pu démontrer que l'exposition à l'ensemble des **COV aromatiques** (le benzène, le toluène, les xylènes, le 1,2,4 triméthylbenzène, l'éthylbenzène, le styrène) mesurés au moyen de capteurs passifs déposés pendant une semaine dans la chambre, est associée à l'apparition d'asthme (ORa=1,12 ; 95 % [1,01-1,24]).

L'étude d'Arif *et al.* [126] confirme cette observation, en rapportant des associations entre l'exposition aux **COV aromatiques** mesurés à l'aide de capteurs passifs portatifs pendant 56,5 heures (le benzène, l'éthylbenzène, le tétrachloroéthylène (TCE), le toluène, le trichloroéthylène, les xylènes, le 1,4 dichlorobenzène et le méthyltertiarybutylether (MTBE)) et le diagnostic d'asthme (ORa= 1,63 ; 95% IC [1,17-2,27]), ainsi que l'apparition de sifflements (ORa = 1,68 ; 95 % IC [1,08-2,61]).

Au regard de ces études, le toluène semble être incriminé dans l'apparition d'asthme chez l'enfant présentant des symptômes d'asthme ou de l'asthme, bien que les niveaux d'exposition restent différents dans les études recensées. Les études réalisées chez l'adulte ne permettent pas de confirmer cette tendance. Cependant, les approches multi-pollution mettent en évidence l'implication de l'ensemble des COV aromatiques dans l'apparition d'asthme. Ces études sont les seules à évaluer les COV comme un ensemble complexe de polluants ; elles suggèrent donc que l'apparition de pathologies respiratoires et allergiques dans ces populations est due, non pas à un COV spécifiquement, mais à un ensemble de COV.

Rôle des COV aromatiques dans l'apparition d'infections pulmonaires et modification de la fonction respiratoire

Peu d'études, concernant l'exposition aux COV aromatiques et l'apparition de modification de la fonction respiratoire ou d'infections pulmonaires, ont été recensées dans la littérature.

L'étude de cohorte prospective allemande LARS (The Leipzig Allergy High-Risk Children Study) réalisée en 2000, dans une population de 475 nouveau-nés montrant des facteurs de risque d'allergie entre six semaines et un an, démontre que des concentrations fortes d'exposition au **styrène** ($>2 \mu\text{g}/\text{m}^3$) et au **benzène** ($>5,6 \mu\text{g}/\text{m}^3$), mesurées à l'aide de capteurs passifs placés dans les logements des enfants, augmentent le risque de développer des infections pulmonaires chez les nouveau-nés âgés de six semaines (Odds ratio respectifs pour le styrène et le benzène : ORa=2,4 ; 95 % IC[1,28-4,48] et ORa=2,4 ; 95 % IC [1,28-4,48]) [58].

Dans l'étude de Martins *et al.* [124] datant de 2012, réalisée dans une population de 51 enfants atteints de sifflements, une détérioration de la fonction respiratoire a été associée à l'exposition au **benzène**, au **toluène** et à **l'éthylbenzène** mesurée à l'aide de capteurs passifs au cours de quatre visites à l'école et dans les logements des enfants. Pour le benzène, une baisse de la VEMS₁

(OR=-4,33 ; 95% IC [-7,13– -1,53], de la VEMS₁/CVF (OR=-1,71 ; 95% IC [-3,24– -0,18]), et de la DEM_{25-75%} (OR=-5,89 ; 95% IC [-10,16– -1,62]. Pour le toluène, une baisse de la VEMS₁ (OR=-1,10 ; 95% IC [-1,97– -0,23]. Pour l'éthylbenzène une baisse de la VEMS₁ (OR=-1,79 ; 95% IC [-3,32– -0,25] et de la DEM_{25-75%} (OR=-2,48 ; 95% IC [-4,81– -0,16]. Le benzène et l'éthylbenzène ont été également associés à l'acidité du pH mesurée dans le condensat de souffle exhalé (EBC) (Odds ratio respectifs de OR= -0,24, 95% IC [-0,42– -0,06] pour le benzène et OR=-0,14, 95% IC [-0,23– -0,04] pour l'éthylbenzène).

Il ressort de ces deux études que l'exposition au benzène semble avoir un rôle prédominant dans l'apparition d'infections pulmonaires et modification de la fonction respiratoire au sein de populations d'enfants présentant des symptômes d'allergie. Néanmoins, le manque de données ne permet pas de confirmer cette tendance.

Rôle des COV aromatiques au cours de la grossesse et pendant l'enfance

Les COV inhalés sont absorbés et se retrouvent dans l'organisme des individus. Ils seront alors éliminés plus ou moins rapidement (de quelques heures à plusieurs mois ou années) en fonction de leurs propriétés (lipophile ou hydrophile). Dans la littérature, des études se sont intéressées à la relation entre l'exposition aux COV au cours de la grossesse et le statut immunologique des nouveau-nés.

Ainsi, en 2002, au sein de la cohorte de femmes enceintes LISA (Lifestyle–Immune System–Allergy), une association a été démontrée entre les cytokines produites dans le sang de cordon ombilical à la naissance de l'enfant et l'exposition au **naphtalène** (0,7 µg/m³) et au **tétrachloroéthylène** (3,4 µg/m³), mesurées à l'aide de capteurs passifs dans les logements, quatre semaines après la naissance. Les auteurs ont également observé une réduction significative de la production en interféron (IFN γ) associée à l'exposition au tétrachloroéthylène (OR=2,9) et une augmentation significative d'IL-4 associée à l'exposition au naphtalène (OR=2,9) [78].

En 2011, l'étude de cohorte mères-enfants prospective EDEN (Pre and postnatal determinants of the child's development and health) confirme ces observations, l'évaluation environnementale a été réalisée pendant le second trimestre des femmes enceintes, à l'aide de capteurs passifs déposés dans les logements. Quatre COV aromatiques ont été mesurés : le benzène, le toluène, l'éthylbenzène et les xylènes. Les auteurs ont observé une modification des biomarqueurs de l'immunité, par l'observation d'une association entre la diminution du pourcentage de Lymphocytes T régulateurs CD4+ et CD25+ détectés dans le sang du cordon ombilical à la naissance et l'exposition maternelle au **benzène** (3,3 ± 2 µg/m³) (p<0,05) pendant la grossesse. Les auteurs concluent que le benzène pourrait altérer le statut immunitaire de l'enfant en diminuant ses capacités de production des cellules Th1, en particulier l'INFγ influençant ainsi le développement potentiel d'allergies [120].

Une seule étude a évalué dans une population d'enfants plus âgés (3 ans) (200) présentant un risque d'atopie, l'impact des expositions aux COV aromatiques (mesurés à l'aide de capteurs passifs) sur la modification des marqueurs sériques d'allergie (Immunoglobulines - IgE anti-lait de vache et blanc d'oeuf) et d'atopie (INFγ, IL-4). Les auteurs ont démontré que l'élévation sérique des IgE anti-lait était associée à l'exposition à des fortes concentrations de COV aromatiques tels que le **toluène** (ORa= 11,2 ; 95 % IC [2,1-60,2]), le **m,p xylène** (ORa = 8 ; 95 % IC [1,9-34,2]), le **o-xylène** (ORa=6 ; 95 % IC [1,5-24,2]), le **4-éthyltoluène** (ORa=9,3 ; 95 % IC [1,8-47,3]), le **3-éthyltoluène** (ORa=6,4 ; 95 % IC [1,4-28,7]), le **2-éthyltoluène** (ORa=5,9 ; 95 % IC [1,4-25]) et le

chlorobenzène (ORa=5,9 ; 95 % IC [1,4-24,7]). Les expositions au **toluène** (13,30 µg/m³) (ORa=3,3 ; 95 % IC [1,1-9,8]) et au **4-éthyltoluène** (0,95 µg/m³) (ORa=3,0 ; 95 % IC [1,0-8,8]) étaient associées à l'élévation sérique des IgE totales mesurées. Concernant les marqueurs sériques d'atopie, les expositions au **naphtalène** (0,73 µg/m³) (p=0,02) et au **chlorobenzène** (0,24 µg/m³) (p=0,04) étaient associées à une diminution de la production d'IL-4 par les lymphocytes T CD8+. Les expositions au **benzène** (1,71 µg/m³) (p=0,02), à l'**éthylbenzène** (1,77 µg/m³) (p=0,04), au **chlorobenzène** (0,24 µg/m³) (p<0,01) étaient associées à une augmentation de la production d'IL-4 par les lymphocytes T CD3+. Les auteurs suggèrent alors que l'exposition aux COV lors d'une sensibilisation allergique, pourrait modifier la production des biomarqueurs par les cellules de type Th 2 impliquées dans les mécanismes des pathologies respiratoire et allergique [110].

L'exposition maternelle aux COV aromatiques semble être incriminée dans la modification du statut immunitaire des enfants à la naissance, comme l'indiquent ces deux études portant sur des populations de nouveau-nés dont les mères ont été exposées aux COV aromatiques pendant la grossesse, et de jeunes enfants présentant des risques d'atopie.

- Les hydrocarbures aliphatiques

Trois études recensées dans la littérature ont évalué l'impact des expositions aux hydrocarbures aliphatiques sur la santé respiratoire.

Dans l'étude de Billionnet *et al.* [108], en 2011, portant sur une population d'adultes, une association entre l'exposition au **N-undécane** (6 µg/m³ [0-471,6]) et le risque d'apparition d'asthme (ORa=2,02 95% IC [1,18-3,46]) a été observée. L'approche multipollution dans cette étude a démontré que l'exposition à l'ensemble des COV aliphatiques était associée également au risque d'apparition d'asthme (ORa=1,41 ; 95 % [1,03-1,93]).

D'autres études renforcent l'hypothèse de l'influence des COV aliphatiques, en particulier des alcanes, sur la santé respiratoire. L'étude de Lehmann *et al.* [110], réalisée en 2001 montre une association entre l'élévation sérique des IgE anti-lait et l'exposition à l'**hexane** (ORa=9,6 ; 95 % IC [1,8-51,7]), au **nonane** (ORa=5,7 ; 95 % IC [1,3-24,4]), au **décane** (ORa=8,1 ; 95 % IC [1,9-35]). Cependant, seule l'exposition à l'**hexane** a été associée à celle des IgE anti-blanc d'œuf (ORa=6,4 ; 95 % IC [1,7-23,4]). On observe aussi une association significative entre une baisse de la production d'IFNγ par les lymphocytes T CD8+ et l'exposition au **nonane** (ORa=13,6 ; 95 % [1,1-162,5]), au **décane** (ORa=22,8 ; 95 % [1,3-407]), au **dodécane** (ORa = 20,3 ; 95 % [1,0-416,4]). Dans une étude de cette même équipe, datant de 2002, réalisée au sein de la cohorte mère-enfant LISA, les résultats précédents sont confirmés par démonstration d'une élévation de la production d'IL-4 par les lymphocytes T (ORa=3,3 ; 95 % [1,1-9,6]) associée à l'exposition au méthylcyclopentane (0,6 µg/m³) [78].

Ces études permettent de supposer l'implication des COV aliphatiques dans la sensibilisation des nouveau-nés et jeunes enfants présentant des risques d'atopie, mais également dans l'apparition d'asthme chez l'adulte.

- Hydrocarbures substitués

Les hydrocarbures substitués, hormis les aldéhydes, sont peu évalués dans les études d'exposition aux COV dans l'habitat, seulement trois études ont été recensées, portant principalement sur des populations adultes.

L'étude de Billionnet *et al.* [108], datant de 2011 conclut à une association entre l'exposition aux **hydrocarbures halogénés** et le risque d'apparition de rhinites allergiques chez l'adulte (ORa=1,28 ; 95 % [1,07-1,54]). Dans une approche similaire, Arif *et al.* [126], en 2007 démontrent une association entre l'exposition aux **hydrocarbures chlorés** et l'apparition de sifflements chez l'adulte (ORa=1,50 ; 95 % IC [1,01-2,23]).

Une seule étude transversale réalisée dans une population adulte japonaise (609), vivant dans 182 logements, s'est intéressée à l'impact des COV d'origine microbienne sur la santé respiratoire. Les auteurs ont observé une association entre l'exposition au **1-octen-3ol** et l'apparition de rhinite allergique (ORa=4,10 ; 95 % [1,71-9,80]) et de conjonctivite (ORa=3,54 ; 95 % IC [1,17-9,80]) [125]. Une revue récente de la littérature renforce cette observation en concluant également que l'exposition à ce type de COV serait principalement associée à l'apparition d'irritations des yeux et de la partie haute des voies respiratoires[128].

- Les aldéhydes – Cas du formaldéhyde

Le chef de file des aldéhydes est le formaldéhyde et la majorité des études à propos de cette famille chimique se focalisent sur ce dernier. Au sein de la littérature, plusieurs études se sont intéressées à l'impact spécifique du formaldéhyde sur la santé respiratoire [104, 109, 111-113, 116, 118, 119, 123, 129]. Les études recensées révèlent des associations principalement entre l'exposition au formaldéhyde et l'apparition et le développement de l'asthme ou de symptômes liés à l'asthme majoritairement chez l'enfant.

Rôle du formaldéhyde dans l'apparition et le développement de l'asthme

Une étude cas-témoins d'enfants asthmatiques ou non, vivant en milieu urbain et rural en France, réalisée en 2010, rapporte un risque trois fois plus important de développer de l'asthme lors les concentrations les plus fortes d'exposition à l'acétaldéhyde (13,6 [5,9-158,7] $\mu\text{g}/\text{m}^3$) (ORa=2,15 ; 95 % IC [1,01-4,58]). De plus, ce risque augmente d'un facteur deux dans la population rurale, à chaque augmentation de la concentration d'exposition au formaldéhyde de 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ((19,2 [3,7-75,1] $\mu\text{g}/\text{m}^3$) (ORa = 10,7 ; 95 % IC [1,69-7,61]) [104].

Une seconde étude cas-témoins, datant de 2002, de jeunes enfants (192) âgés de 6 mois à 3 ans recrutés aux urgences et présentant un diagnostic d'asthme primaire, confirme ce résultat en rapportant une augmentation du risque de développer un asthme de 39 % pour des concentrations d'exposition au formaldéhyde > 60 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. Ce risque de développer un asthme augmente de 3 % à chaque augmentation de la concentration en formaldéhyde de 10 unités ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) (ORa = 1,003 ; 95 % IC [1,002-1,004]) [111].

Dans une troisième étude cas-témoins, datant de 1999, portant sur des enfants de 7 à 14 ans asthmatiques ou non, les auteurs rapportent une association avec les symptômes d'atopie lorsque le niveau d'exposition au formaldéhyde mesuré augmente de 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (ORa = 1,42 ; 95 % IC [0,99-2,04]), association renforcée quand il s'agit des niveaux de formaldéhyde mesurés dans la chambre des enfants [112].

Enfin, dans une méta-analyse de sept études, datant de 2010, les auteurs concluent à une association positive entre l'augmentation des concentrations de formaldéhyde de $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ et l'apparition d'asthme chez l'enfant ($\text{ORa} = 1,17$; 95 % IC [1,01-1,37]) [129].

Rôle du formaldéhyde dans l'apparition et le développement de symptômes associés à l'asthme

Dans l'étude transversale NEHAP (the Hungarian National Environmental Health Action Program), portant sur des enfants âgés de 3 à 11 ans, l'exposition au formaldéhyde a été associée à l'augmentation des IgG sériques dirigées contre des bactéries (*haemophilus influenza*) ainsi qu'à l'augmentation du nombre de monocytes ($p=0,017$) [109].

Une autre étude transversale, datant de 2000, de 224 enfants sains âgés de 6 à 13 ans, rapporte une association entre l'augmentation de la concentration du NO exhalé par l'enfant et le niveau d'exposition au formaldéhyde mesuré, pour des valeurs supérieures à 50 ppb ($60 \mu\text{g}/\text{m}^3$) ($p=0,02$). Les auteurs suggèrent que l'exposition au formaldéhyde induit une réponse inflammatoire sub-clinique dans les voies respiratoires d'enfants sains [123].

L'équipe de Zhao *et al.* [116], en 2008, a démontré dans une population chinoise de 2 209 enfants sains âgés de 14 à 15 ans, une association entre l'exposition au formaldéhyde et l'apparition de sifflements ($\text{OR}=1,24$; 95 % [1,03-1,48]) ou des essoufflements nocturnes ($\text{OR}=1,40$; 95 % [1,02-1,92]).

L'étude de Venn *et al.* [121], en 2003, confirme cette observation en démontrant dans une étude cas-témoins de 416 enfants âgés de 9 à 11 ans atteints de sifflement, une association significative entre l'exposition au formaldéhyde et l'apparition de symptômes nocturnes ($\text{ORa}=1,45$; 95 % IC [1,06-1,98]), association amplifiée chez les enfants présentant des symptômes d'atopie.

Les travaux de l'investigation environnementale de la cohorte de naissance PARIS (Pollution and asthma Risk: an Infant Study), réalisée dans les logements d'un échantillon aléatoire de 196 logements et modélisée chez 2940 enfants, rapportent une relation entre le risque d'infections des voies respiratoires basses (IVRB) accompagnées ou non de sifflements (IVRBs), et la concentration en formaldéhyde ($\text{OR}= 1,32$; 95 % IC [1,11-1,55] pour les IVRB et $\text{OR}=1,41$; 95 % IC [1,14-1,74] pour les IVRBs) [119]. A l'aide de la même approche, en 2013, les résultats de la cohorte PARIS ont montré une association entre l'exposition au formaldéhyde et l'augmentation des toux sèches nocturnes seulement chez les enfants n'ayant pas d'antécédents parentaux d'allergies ($\text{ORa}=1,45$; 95 % [1,08-1,96]) [118].

- Impact des émissions de peintures dans les logements sur la santé respiratoire

Les travaux de rénovation et de décoration comme la peinture ou les recouvrements de sols (moquette, sols PVC, parquet stratifié) sont émetteurs de COV [58-60]. Dans la littérature, certaines études se sont intéressées particulièrement à l'impact des émissions de COV par des peintures sur la santé respiratoire.

Ces études sont principalement menées chez l'enfant, afin de déterminer si une période d'exposition aux peintures (correspondant à un temps de rénovation ou de décoration) pourrait expliquer l'apparition des pathologies respiratoires et allergiques. On constate dans ces études, que l'arrivée d'un enfant s'accompagne de travaux de rénovation et de décoration au sein des foyers [58-60]. Ainsi, dans la cohorte PARIS, des travaux ont été réalisés dans 19,1 % des logements durant la première année de vie de l'enfant et la moitié d'entre eux ont concerné la chambre de l'enfant spécifiquement. Le principal revêtement aux murs dans les différentes pièces (pièce principale,

cuisine et chambre) était la peinture. Deux tiers des chambres avaient des murs recouverts de peinture. La pose de la peinture était récente (datant de moins d'un an) dans 36,4 % des cas [57].

Dans la littérature, les associations retrouvées portent sur l'apparition de symptômes de sifflements. Une seule étude de cohorte de naissance d'enfants (la cohorte BAMSE) datant de 2004, montre une association significative (ORa = 1,7 ; 95 % IC [1,3-2,6]) [115]. Une autre étude datant de 2004, montre que l'exposition à la peinture dans les 12 derniers mois est plus fréquente chez les enfants asthmatiques que chez les enfants non asthmatiques (22 % vs 14 % ; $p < 0,05$) [106]. Parallèlement, quatre études démontrent une association entre l'exposition à des travaux de rénovation (dont la peinture) et l'apparition de sifflements dans les douze derniers mois :

- l'étude transversale de Dong *et al.* [130], datant de 2008 étudiant une population d'enfants âgés entre 6 et 13 ans (ORa = 1,6 ; 95 % IC [1,3-2,0]),
- l'étude de cohorte de naissance d'enfants suivis jusqu'à 8 ans, de Henderson *et al.* [131], en 2008 (ORa = 1,5 ; 95 % IC [1,0-2,1]),
- l'étude de cohorte de naissance LARS de Diez *et al.* [122], en 2003 (ORa=2,4 ; 95 % IC [0,7-8,6]) et,
- l'équipe de Diez *et al.* [58], en 2000 (ORa = 1,9 ; 95 % IC [1,1-3,5]).

Enfin l'étude de Frank *et al.* [60], 2014 dont l'objectif était d'étudier l'impact de l'exposition prénatale aux travaux de rénovation sur l'apparition de sifflements précoces durant la première année de vie de l'enfant, montre que les travaux de peinture sont associés à l'augmentation du risque d'obstruction bronchique (ORa=5,46 ; 95 % IC [1,09-27,20]).

Autant on dénombre plusieurs études portant sur la période de l'enfance, autant celles réalisées dans des populations adultes ne sont qu'au nombre de deux. L'étude de Wieslander *et al.* [59], en 1997, dont 33 % des participants ont repeint leurs logements dans l'année précédant l'étude, rapporte une association avec l'augmentation des sifflements nocturnes (ORa= 1,6 ; 95 % IC [1,1-2,4]) et de l'asthme (ORa=1,6 ; 95 % IC [1,0-2,5]). L'étude de Takaoka *et al.* [132], datant de 2011 dans une population de jeunes femmes adultes, rapporte une association significative, mais cette fois avec les allergies aux animaux de compagnie (ORa=6,6 ; 95 % IC [1,1-38,7]).

Si les symptômes liés à l'exposition aux émissions de COV issus des peintures sont principalement des sifflements, il reste difficile de conclure de l'impact sur les autres symptômes ou pathologies respiratoires de ces émissions, au regard du peu de preuves et de données disponibles à l'heure actuelle. Une revue récente de la littérature conclut également que les émissions de peintures sont souvent confondues avec les autres activités de rénovation [133]. En effet, les travaux de peinture sont souvent un élément parmi un ensemble de travaux majeurs de rénovation dans les logements. Dans cette même revue, les auteurs mettent en avant les effets plus marqués de ces expositions dans les environnements professionnels. Ils relatent l'observation d'asthme professionnel, d'hyperréactivité bronchique, de toux, de sifflements, d'irritation des voies respiratoires principalement dans des populations de peintres en bâtiments, exposées à des concentrations plus fortes que dans les environnements intérieurs [133].

En marge de l'ensemble de ces études, on relève trois études ne démontrant pas d'association entre l'exposition aux COV dans l'habitat et l'apparition et le développement de pathologies respiratoires et allergiques dans des populations d'enfants et d'adolescents asthmatiques [105, 107, 113].

En conclusion, à l'heure actuelle, l'ensemble de ces résultats ne permettent pas de conclure quant à l'impact avéré des COV sur la santé respiratoire humaine. Les études, peu nombreuses, présentent une trop forte hétérogénéité entre les protocoles de prélèvements des COV, les populations étudiées (nouveau-nés, enfants, adolescents, adultes), les pathologies ou les symptômes investigués et les facteurs d'ajustements pris en compte dans le calcul des associations. On ne peut donc pas conclure de façon formelle à des effets sur la santé respiratoire. Une revue récente de la littérature datant de 2014, corrobore cette observation en concluant qu'il existe trop de biais pour pouvoir comparer les études publiées. Les auteurs n'écartent néanmoins pas l'hypothèse que l'exposition aux COV puisse avoir un rôle non négligeable [134]. Certains auteurs évoquent également le rôle de co-facteur des COV dans l'apparition des pathologies respiratoires et allergiques [135, 136].

Ces résultats suggèrent néanmoins l'implication de l'exposition aux COV dans la modification de la réponse inflammatoire et dans l'apparition ou l'exacerbation du risque d'asthme ou de symptômes reliés à l'asthme, particulièrement pour l'exposition aux COV aromatiques et au formaldéhyde. Il semble également que les sujets présentant déjà des symptômes d'atopie, en particulier les enfants, sont beaucoup plus sensibles aux expositions aux COV.

Pour comprendre l'implication des COV dans l'apparition et/ou le développement des pathologies allergiques et respiratoires, d'autres études existent à l'heure actuelle dans la littérature, les études *in vivo* (chez l'homme et chez l'animal) et les études *in vitro*. Elles permettent d'aider à mieux comprendre les mécanismes d'action de ces polluants directement à l'échelle de l'organisme ou de la cellule.

I.2.2 Etudes *in vivo*

- Chez l'homme

Les études chez l'homme visant à étudier les effets des COV sur l'apparition de symptômes respiratoires et allergiques sont rares et peu récentes, les principales études relevées datent de plus de 10 ans [59, 137-144]. Si ces études permettent d'apporter des informations pertinentes car elles reflètent la réponse physiologique, elles sont néanmoins limitées car elles comprennent souvent peu de sujets et rendent difficile les quelconques conclusions quant aux effets du polluant étudié. Les concentrations d'exposition sont souvent supérieures à celles mesurées dans les environnements intérieurs, pour des expositions courtes et rarement répétées, ce qui ne permet pas de transposer les résultats aux expositions environnementales chroniques. La complexité du mélange de COV exposé est souvent en deçà de la réalité. Enfin, l'évaluation de certaines substances jugées trop néfastes (le benzène par exemple) pour la santé humaine sont peu ou pas étudiées, pour des raisons éthiques évidentes.

Dans ces études, des volontaires sains ou atteints de pathologies respiratoires et allergiques (des asthmatiques par exemple), sont exposés dans des chambres expérimentales à des atmosphères contrôlées d'un ou de plusieurs COV. Le temps d'exposition (de quelques minutes à plusieurs heures) ainsi que la répétition de l'exposition varient d'une étude à l'autre [59, 137-144]. Certains paramètres physiologiques de la fonction respiratoire sont évalués ($VEMS_1$, $VEMS_1/CVF$, $DEM_{25-75\%}$), ils peuvent être couplés à l'évaluation de biomarqueurs de l'inflammation, prélevés par lavage nasal [137-139].

Expositions à un mélange de COV

On relève dans la littérature, trois études d'exposition chez l'homme à un mélange de COV. Deux de ces études conduisent à l'observation d'une diminution des paramètres de la fonction respiratoire.

Dans l'étude de l'équipe de Harving *et al.* [137], datant de 1991, 11 volontaires ayant soit un diagnostic d'hyperréactivité bronchique par stimulation à l'histamine, soit un asthme bronchique, ont été exposés à un mélange composé de 22 COV (6 alcanes, 3 alcènes, 4 aromatiques, 2 aldéhydes, 2 alcools, 3 cétones, 2 hydrocarbures substitués), à différentes concentrations (2,5 et 25 mg/m³) mesurées en équivalent toluène. Il s'en est suivi une diminution significative de la VEMS₁, de 90,7 % par rapport au niveau de base, mesurée entre 15 et 30 minutes après les expositions aux concentrations de COV totaux de 25 mg/m³. Les auteurs soulignent que cette diminution restait plus prononcée pour les volontaires ayant une sensibilisation bronchique très importante.

Dans une étude datant de 2000, des volontaires sains adultes, atopiques ou non, ont été exposés lors d'un essai randomisé pendant 4 h, à 25 mg/m³ ou à 50 mg/m³ d'un mélange de COV retrouvés dans les environnements intérieurs. Les résultats montrent que les volontaires atopiques ont des valeurs de DEM₂₅₋₇₅ %, plus faibles lorsqu'ils sont exposés à la concentration la plus forte (50 mg/m³). Les auteurs concluent donc que les personnes ayant un terrain allergique sont plus sensibles à l'exposition aux fortes concentrations de COV. Ils ont pu également mettre en évidence l'effet non irritant du mélange de COV testé à une concentration d'exposition de 25 mg/m³ [138].

Enfin, l'équipe de Koren *et al.* [139], a exposé en 1992, pendant 4 heures des volontaires sains (femmes entre 18 et 35 ans) à une concentration de 25 mg/m³ d'un mélange de 22 COV (4 hydrocarbures aromatiques, 3 cétones, 2 alcènes, 7 alcanes, 2 aldéhydes, 2 hydrocarbures substitués, 2 alcools). Les auteurs ont pu observer une augmentation des PMN (leucocytes polymorphonucléaires neutrophiles) dans le lavage nasal, 18 h après l'exposition aux COV.

Expositions au formaldéhyde gazeux

Les études récentes évaluant l'impact du formaldéhyde sur la santé respiratoire se sont attachées à mettre en évidence principalement l'effet potentialisateur du formaldéhyde gazeux.

Ainsi, Casset *et al.* [140], en 2006 ont exposé des volontaires asthmatiques (19), en double aveugle à du formaldéhyde gazeux (92,2 µg/m³) pendant 30 minutes, avant de les sensibiliser à un test de provocation bronchique. Les auteurs ont observé que pour mettre en évidence une diminution de 20 % du volume d'expiration forcé, il fallait exposer les volontaires (exposés au formaldéhyde) à une quantité de *Der f 1* (34,3 ng) moins forte que pour les contrôles (45,4 ng de *Derf 1* : exposés à une concentration en formaldéhyde de 32 µg/m³). Cependant, l'année suivante l'équipe d'Ezratty *et al.* [141], a exposé 12 volontaires (entre 18 et 44 ans) ayant de l'asthme par intermittence et étant allergique au pollen, à une concentration de 500 µg/m³ de formaldéhyde gazeux pendant 60 minutes. L'exposition a été suivie par une inhalation d'allergènes de pollen. La mesure des paramètres de la fonction respiratoire (VEMS₁, PEF) lors d'un test de provocation bronchique à la métacholine et des biomarqueurs de l'inflammation dans l'expectoration (IL-4, IL-1, IL-5, IL-8, IL-10, GM-CSF, MCP-1, TNFα, IFNγ, eotaxin et les éosinophiles), n'a pas permis de confirmer cet effet potentialisateur du formaldéhyde. Les auteurs évoquent même une tendance à un effet protecteur du formaldéhyde après exposition aux allergènes de pollen.

Les effets du formaldéhyde gazeux semblent donc dépendre essentiellement du statut immuno-allergique des volontaires exposés.

Expositions à un mélange de COV émis par des peintures

Peu d'études *in vivo* ont été réalisées dans l'objectif d'évaluer l'impact d'atmosphères émises par les peintures sur la santé respiratoire.

Dans l'étude en double aveugle de Raven *et al.* [143], datant de 1997, 17 adultes volontaires (18-65 ans) originaires du Royaume-Uni et ayant un diagnostic d'asthme (tous les volontaires sont traités avec des bronchodilatateurs dont 82 % avec des stéroïdes par inhalation), ont été exposés à des vapeurs de peintures dans une chambre expérimentale. Plusieurs expositions ont été réalisées pendant plusieurs jours. Chaque volontaire a peint un panneau pendant 60 minutes à l'aide d'une peinture d'intérieur conventionnelle aqueuse ou d'une peinture n'émettant pas de COV. Les auteurs ont constaté une augmentation significative des sifflements ($p < 0,01$) et des essoufflements ($p < 0,05$) au cours de l'utilisation de la peinture aqueuse.

En marge de cette étude, deux études rapportent des expositions à des COV présents dans l'atmosphère générée par les peintures. Une étude suédoise, comprenant 27 volontaires adultes non asthmatiques (en majorité des pilotes de l'air dont 5 fumeurs), ont été exposés pendant une minute à du **propylène glycol** (309 mg/m^3 en moyenne). Les résultats ont montré que 16 % des participants avaient développé une toux, des picotements au niveau des yeux et un assèchement de la gorge [145]. Dans une seconde étude suédoise, incluant 30 volontaires (10 ayant des symptômes d'atopie, 10 non atopiques, 10 peintres professionnels), ont été exposés à un **mélange de COV** (propylène glycol, texanol, diéthylène glycol, monoéthyléther, diéthylène glycolmonobutyl ether, dipropylène glycolmonoéthyl éther) à une concentration de 35 mg/m^3 , ou à cette mixture supplémentée de 15 mg/m^3 d'ammoniaque. Les volontaires ont manifesté des irritations des yeux, du nez, de la gorge et des dyspnées après exposition au mélange de COV et au mélange de COV supplémenté ou non par de l'ammoniaque [144].

Ces résultats semblent être associés aux observations des études épidémiologiques concernant les effets des expositions aux atmosphères émises par les peintures dans l'apparition de sifflements. Néanmoins, le peu d'étude disponible dans la littérature ne permet pas de conclure aux effets des atmosphères chargées en COV émis par les peintures sur la santé respiratoire, même à des niveaux beaucoup plus important (mg/m^3) que ceux retrouvés dans les environnements intérieurs ($\mu\text{g/m}^3$).

- Chez l'animal

Les études menées chez l'animal dans le cadre de l'impact d'atmosphères chargées en COV sur la santé respiratoire, ont pour objectif principal d'évaluer la toxicité inhalée des substances en déterminant une concentration létale 50 (CL 50), concentration d'exposition pour laquelle 50 % des animaux sont décédés. L'objectif *in fine* est d'exposer les animaux à des doses plus faibles afin d'étudier les mécanismes d'action des polluants sur les paramètres physiologiques et fonctionnels de l'animal [146]. Ces expérimentations sont réalisées au moyen de chambre d'inhalation (l'animal est exposé entièrement au polluant) ou à l'aide de dispositifs privilégiant la voie respiratoire seulement. Les expositions sont souvent répétées et réalisées plusieurs fois par semaine durant quelques semaines ou plusieurs mois. Si l'utilisation de modèles *in vivo* permet d'avoir une idée de l'impact des polluants sur l'ensemble d'un organisme vivant, ces modèles sont néanmoins limités. Il faut

comprendre que selon la concentration d'exposition, la durée de l'exposition et l'animal choisi pour l'étude (selon ses caractéristiques pulmonaires), les propriétés de dépôt et d'absorption du polluant peuvent être complètement différentes et rendre difficile la mesure de la dose d'exposition réelle à laquelle l'animal est exposé. De plus, la génération et la caractérisation des atmosphères sont souvent très coûteuses, difficiles à mettre en œuvre et les conditions d'expositions sont parfois peu reproductibles d'un laboratoire à un autre [146]. L'extrapolation à l'homme de ces données, reste toutefois difficile à établir.

Expositions aux COV

Plusieurs études ont démontré que l'exposition à certains COV, en particulier les hydrocarbures aromatiques, entraînait chez la souris une augmentation des marqueurs de l'inflammation ainsi que des irritations des voies respiratoires.

Une étude menée en 2004, exposant des souris mâles à différentes concentrations de **styrène** (0, 172 et 688 $\mu\text{g}/\text{m}^3$), six heures par jour pendant 1, 5 ou 20 jours sur une durée de 4 semaines, a démontré une baisse de la sécrétion de la protéine CC16 par les cellules de Clara dans le liquide de lavage pulmonaire et une destruction des cellules de Clara (pour une exposition pendant 1 ou 5 jours) quelle que soit la concentration d'exposition. Les lésions dégénératives des cellules de Clara ainsi qu'une hyperplasie cellulaire généralisée à l'ensemble du tissu ont été observées en microscopie électronique. Après 20 jours d'exposition, une déplétion en glutathion a été observée. Cette étude met en avant l'effet potentialisateur des COV, sur la réponse inflammatoire et immuno-allergique associée à l'apparition et l'aggravation de pathologies respiratoires [147].

En 2006, une étude a démontré que l'exposition au **chloroforme** (20 ppm : 97 mg/m^3), ou au **1,1 dichloroéthylène** (10 ppm : 40 mg/m^3), ou au **styrène** (100 ppm : 425 mg/m^3) par inhalation, de souris présensibilisées (injection intratrachéale d'ovalbumine), 6 heures par jour pendant 4 jours, induit une augmentation de la production en IL-4, IL-5 et IL-13 et aggrave la réaction allergique [148]. Enfin dans une autre étude, l'exposition à une concentration de 9 ppm (34 mg/m^3) de **toluène** de souris mâles allergiques présensibilisés à l'ovalbumine uniquement au niveau nasal, augmente significativement la production du NGF (Nerve Growth Factor) dans les poumons [149].

Une étude récente, datant de 2012, a évalué l'impact d'un mélange réaliste de COV, généré à l'aide de sols en PVC, sur la réponse inflammatoire des souris (Balb/c) pré-sensibilisées (injection intratrachéale d'ovalbumine). Les composés détectés du mélange de COV émis par le sol en PVC étaient le **N-méthyl-2pyrrolidone** (NMP) et le **2, 2, 4-triméthyl-1,3-pentane diol diisobutyrate** (TXIB). Les souris ont été exposées en permanence pendant 71 jours à un sol en PVC. Les résultats ont montré une augmentation des éosinophiles ainsi que des IgE spécifiques anti-ovalbumine. L'effet inflammatoire a également été révélé par l'élévation des cytokines de type Th 2. En parallèle, les souris ont été exposées dans des chambres d'exposition 5 h par jour pendant 71 jours aux composés du mélange, pris individuellement. L'exposition au NMP ou TXIB augmentait la réponse inflammatoire pour les souris pré-sensibilisées. De plus, il a été observé aux plus fortes concentrations d'exposition une réduction de la production en IL-12 par les cellules dendritiques matures et une augmentation du stress oxydant dans les poumons [150].

L'exposition aux COV augmenterait donc la réponse allergique en interférant sur la fonction des cellules dendritiques, et en induisant un stress oxydatif. Ces deux paramètres sont connus pour jouer un rôle important dans le développement de pathologies allergiques et respiratoires.

Expositions au formaldéhyde gazeux

Les principales études menées sur les animaux se sont attachées à mettre en évidence l'effet broncho-constricteur de l'exposition au formaldéhyde gazeux.

Dans une étude datant de 1993, des chercheurs américains ont exposé des cochons d'inde dans des chambres d'inhalation pendant 8 h à une concentration de formaldéhyde de 375 µg/m³. Dans ces conditions, il a été observé une hyperréactivité bronchique ainsi qu'une augmentation de la bronchoconstriction des animaux [151]. En 2003, une autre équipe a renouvelé ce type d'expérience sur les mêmes animaux, en modulant l'exposition par une épreuve de bronchoconstriction à la métacholine, ou en pré-sensibilisant les animaux à l'ovalbumine : ils ont constaté là encore que le formaldéhyde avait un effet broncho-constricteur sur les poumons des cochons d'inde [152]. La même année, des chercheurs japonais, dont l'objectif était d'évaluer la production en cytokines de macrophages après exposition au formaldéhyde, ont exposé des souris dans des chambres d'inhalation, 16 h par jour pendant 28 jours à une concentration de 12 280 µg/m³. Aucun effet particulier n'a été observé sur ces macrophages, malgré la concentration élevée d'exposition [153].

Il est difficile de conclure quant aux effets *in vivo* chez l'animal du formaldéhyde gazeux, car peu d'études ont été rapportées dans la littérature. De plus, les concentrations d'expositions étaient souvent supérieures aux niveaux environnementaux et l'espèce animal choisie, pas toujours adapté à la physiologie respiratoire humaine.

Depuis ces dernières années, le nombre d'études sur les animaux de laboratoire tend à diminuer. Cette diminution est due notamment à la mise en place de politiques expérimentales (la réglementation REACH par exemple), qui visent à développer des méthodes alternatives, dont les méthodes *in vitro*, entrant dans le principe des 3R (Reduce, Replace, Refine) de Russell and Burch, 1959, pour des raisons éthiques mais également économiques [154].

I.2.3 Etudes *in vitro*

L'étude de l'impact des polluants atmosphériques sur la santé respiratoire, peut être aussi réalisée au moyen d'études *in vitro* en exposant des cellules de l'appareil respiratoire humain à des polluants atmosphériques. S'il est entendu que l'impact des polluants entraîne une cascade de réactions au niveau de l'organisme, l'étude d'un modèle cellulaire simplifié est néanmoins nécessaire. L'étude de l'impact des polluants environnementaux, en particulier des polluants gazeux sur les cellules de l'appareil respiratoire humain, nécessite de choisir un modèle cellulaire et un dispositif d'exposition adaptés.

- Modèles cellulaires de l'appareil respiratoire humain

Des modèles cellulaires humains sont disponibles pour pratiquement toutes les zones de l'appareil respiratoire incluant la région nasale, la région proximale (la trachée et les bronches) et la région distale (les alvéoles). Les cellules peuvent être de différents types ; macrophages, cellules dendritiques, monocytes, cellules épithéliales. Dans le cadre de l'étude des polluants environnementaux, l'étude des cellules épithéliales reste néanmoins favorisée. On distingue parmi ces

modèles de cellules épithéliales, deux catégories ; les lignées cellulaires (nasales, trachéales, bronchiques et alvéolaires) et les cultures primaires de cellules (nasales, trachéales ou bronchiques).

Les lignées cellulaires sont les plus couramment utilisées pour étudier l'impact des polluants environnementaux. Elles sont généralement dérivées de cellules épithéliales cancéreuses ou transformées par virus et présentent l'avantage d'être disponibles dans des banques de cellules. Les résultats semblent reproductibles d'un laboratoire à l'autre [155]. On distingue parmi les lignées cellulaires les plus couramment utilisées :

- **les lignées bronchiques**, les plus employées sont les BEAS-2B, 16 HBE-14o- et Calu-3.
Les **BEAS-2B**, est une lignée cellulaire issue de la transformation virale de cellules épithéliales bronchiques humaines. Elles forment des jonctions serrées mais à une faible vitesse par rapport à d'autres lignées. Les **16 HBE-14o-** est une lignée cellulaire issue de la même transformation que les BEAS-2B mais de cellules issues d'un patient âgé d'un an. Ces cellules en culture forment une couche polarisée, et ont la capacité de se différencier (formation de cils) et de former des jonctions serrées. Les **Calu-3** est une lignée cellulaire dérivée d'un adénocarcinome bronchique d'un homme caucasien âgé de 25 ans. Les cellules en culture forment également une monocouche polarisée avec des jonctions serrées intracellulaires. L'avantage de cette dernière lignée est qu'elle possède la capacité d'exprimer et de sécréter des composés provenant des cellules séreuses des glandes trachéo-bronchiques. Elles sécrètent notamment des protéines du mucus (MUC et MUC5AC) [155, 156].
- **Les lignées cellulaires alvéolaires** : la plus utilisée est la lignée **A549** dérivée d'un carcinome pulmonaire d'un homme âgé de 58 ans. Cette lignée possède plusieurs caractéristiques des cellules alvéolaires de type II et est utilisée dans la littérature pour évaluer la réactivité alvéolaire. La pertinence de son utilisation fait encore débat à l'heure actuelle, car la surface alvéolaire *in vivo* est composée de 90-95 % de cellules alvéolaires de type I, et non de type II comme les A549. La pertinence fonctionnelle des cellules est également remise en cause, car les jonctions serrées formées en culture semblent déficientes et le phénotype cellulaire pourrait dépendre des conditions de culture. Ainsi Carterson et al. [157], en 2005 ont mis en évidence par caractérisation immuno-histochimique que des cellules A549 cultivées en 3D (formation d'agrégats) présentaient une augmentation de l'expression des marqueurs spécifiques de cancer comparés à des mêmes cellules cultivées en monocouche [156, 158].

Dans la littérature, parmi les autres modèles de lignées cellulaires épithéliales respiratoires humaines, on peut citer la lignée nasale RPMI 2650, utilisée principalement pour étudier les métabolismes lors de l'absorption de médicaments [159], ou les lignées bronchiques NCI-H292, NCI-H441 et 9HTE qui sont relativement moins employées.

Les cultures primaires de cellules épithéliales humaines peuvent être issues de différentes parties de l'appareil respiratoire humain, la partie nasale, trachéale et bronchique. Les cellules épithéliales nasales humaines, sont obtenues par brossage des cornets nasaux inférieurs ou par traitement protéolytique de polypes nasaux prélevés par biopsie. Les cellules épithéliales bronchiques et trachéales, sont obtenues par lavages broncho-alvéolaire, par biopsie ou par dissection [155, 160]. Les cellules peuvent provenir d'un donneur sain ou porteur de pathologies (respiratoire par exemple). Ces cultures primaires présentent l'avantage de provenir directement du tissu, ce qui leur confère des

réponses cellulaires et métaboliques plus proches de la réalité *in vivo* [161]. Comme c'est le cas pour les lignées cellulaires, les cellules peuvent être cultivées en monocouche dans les flacons de culture ou sur inserts recouverts ou non en partie apicale par du milieu de culture. La culture de ces cellules présente néanmoins certaines limites : le vieillissement cellulaire (souvent défini par le nombre de passages), la variabilité inter-donneur qui peut être très forte et la matière première souvent peu disponible, en particulier pour les cellules trachéales et bronchiques humaines.

Pour éviter les contraintes liées à la culture de cellules primaires et pour mimer la morphologie de l'appareil respiratoire humain, une méthode de culture de cellules sur insert en interface air-liquide a été mise en place (culture ALI). Les premières études décrivant cette méthode remontent à la fin des années quatre-vingts. Les cellules utilisées étaient des cultures primaires de cellules épithéliales trachéales de Hamster [162, 163]. Ce n'est qu'au cours des années quatre-vingt dix, que cette méthodologie a évolué et a été adaptée aux autres cellules épithéliales de l'arbre respiratoire humain [164, 165]. Les cellules prélevées chez l'homme, sont trypsinisées puis cultivées dans des flacons de culture et sur des membranes poreuses sur inserts. Elles sont ensuite nourries en partie apicale et basale jusqu'à atteindre une confluence proche de 100 %. A ce stade, les cellules sont peu différenciées. Le milieu de culture en partie apicale est alors retiré, permettant une culture en interface air-liquide. Au bout d'un mois de culture, les cellules forment une multicouche de cellules différenciées, composée de trois types cellulaires ; cellules basales, ciliées et muqueuses amenant à la reconstitution de l'épithélium [166, 167]. Il est noté que les lignées cellulaires peuvent également être cultivées en interface air-liquide sur insert, mais les études sont relativement rares.

Ces cultures sont considérées à l'heure actuelle comme la représentation la plus proche *in vitro* de l'épithélium respiratoire humain. Elles possèdent une structure multi-stratifiée, différents types cellulaires, une fonction mucociliaire et des cellules polarisées ce qui leurs confèrent des jonctions serrées et un transport ionique actif. Elles ont également l'avantage d'être maintenues en culture pendant une longue période de temps (de plusieurs semaines à plusieurs mois) [155, 160, 166, 168, 169].

L'équipe de Dvorak *et al.* [170], en 2011 a comparé le transcriptome de cellules primaires épithéliales bronchiques humaines cultivées en interface air-liquide avec des cellules primaires épithéliales bronchiques de biopsie non cultivées. Les auteurs ont observé une augmentation de l'expression du cycle cellulaire et de la prolifération au sein des cultures de cellules en interface air-liquide. Parallèlement, il a été observé dans les cellules de biopsie une augmentation de l'expression génique de l'organisation du cytosquelette et la réponse immune humorale. Les auteurs concluent néanmoins que la culture en interface air-liquide, est une bonne représentation de l'épithélium respiratoire *in vivo* mais que pour certaines réponses biologiques la différence entre *in vivo* et *in vitro* doit être considérée.

Baxter *et al.* [171], en 2015 a étudié les propriétés de la fonction mucociliaire présente au sein de ces cultures en interface air-liquide. Une similarité de composition protéique du mucus de 46 % a été observée avec les expectorations de 10 volontaires non-fumeurs. Les protéines du mucus relevées sur ces cultures en interface air-liquide font parties majoritairement des familles d'hydrolases, de protéases, de phosphatases, d'oxydo-réductases et de mucines.

Dans la littérature, ces modèles d'épithéliums reconstitués sont étudiés majoritairement pour évaluer la toxicité de certains composés, le transport transmembranaire, l'impact de molécules ou d'agents biologiques, la réparation et l'homéostasie tissulaire [172-179]. Peu d'études décrivent

l'impact sur ces épithéliums d'expositions répétées en interface air-liquide d'un mélange de polluants générés à des niveaux environnementaux [180-182].

Ces épithéliums peuvent être reconstitués en laboratoire, ou fournis « prêt à l'emploi » par des industriels (Epithelix®, matTek®) au bout d'un mois de culture sur insert. Les modèles peuvent être reconstitués à partir d'un ou de plusieurs donneurs sains ou porteurs de pathologie et co-cultivés ou non avec des fibroblastes humains. Ces épithéliums reconstitués constituent une avancée majeure, mais il ne reflète néanmoins pas totalement la complexité et la coopération cellulaire physiologique des épithéliums respiratoires.

L'apparition de la culture de cellules sur insert a permis le développement de co-culture de cellules de différents types ; les macrophages, cellules dendritiques, cellules endothéliales, cellules épithéliales [183, 184]. Elles permettent de mimer en culture la complexité de l'épithélium respiratoire humain ainsi que les mécanismes de coopération cellulaire existants entre les cellules lors d'exposition à des agents extérieurs. Ces méthodes sont néanmoins peu développées car le maintien en culture de tous les types cellulaires reste difficile et peut compliquer l'interprétation des résultats [183]. La culture d'explants de l'arbre respiratoire humain (ou animal) est très peu utilisée à l'heure actuelle [155, 185, 186].

- Dispositifs d'exposition

Depuis une vingtaine d'années, plusieurs dispositifs d'exposition ont été conçus afin d'évaluer l'impact des polluants atmosphériques sur les cellules de l'arbre respiratoire humain. Une revue récente de la littérature, les a classés en deux catégories ; les dispositifs d'exposition indirectes et directes [146].

Les méthodologies d'exposition indirectes des cellules sont réalisées par solubilisation ou suspension préalable du polluant dans un solvant organique (DMSO ou des alcools) ou dans du milieu de culture (par bullage du gaz par exemple). Le mélange est ensuite exposé de façon submergée aux cellules. Ces méthodes sont principalement appliquées lors d'exposition des cellules à des particules ou à des extraits de condensat de fumée de cigarette. Elles nécessitent des étapes préliminaires de préparation (extraction, filtration, dilution, bullage des composés dans le cas de la fumée de cigarette) qui se trouvent être limitantes dans l'interprétation des résultats car elles vont engendrer des modifications des propriétés physico-chimiques des polluants ou créer des interactions toxicologiques entre le ou les polluants et les solvants [146]. De plus, lors de ce type d'exposition, les concentrations ne sont pas extrapolables aux concentrations retrouvées dans l'environnement ; et l'exposition en elle-même (submergée) ne reflète pas la réalité physiologique d'exposition des polluants à l'appareil respiratoire humain.

Des méthodologies plus développées ont donc été mises en place afin de pouvoir exposer les cellules de façon directe au polluant en phase gazeuse.

Dans une étude datant de 2000, Wallaert *et al.* [187], reprennent les critères énoncés par Rasmussen *et al.* [188], en 1984 pour mettre en place un dispositif valide d'exposition de cellules *in vitro* à des atmosphères de polluants.

Ces critères sont les suivants ;

- Générer et contrôler l'atmosphère de polluants de façon précise,
- L'atmosphère testée doit être au plus proche des cellules lors de l'exposition, sinon l'atmosphère peut réagir avec le milieu de culture et masquer ainsi l'effet toxique probable,
- La méthodologie employée doit comprendre un temps d'exposition suffisamment significatif pour permettre des conclusions pertinentes, tout en maintenant des conditions d'humidification afin d'éviter un assèchement des cellules pendant l'exposition,
- Les expérimentations doivent être réalisées en conditions stériles.

Afin de satisfaire ces critères, différentes **méthodes d'exposition directe** des cellules ont été mises en place. Initialement, des systèmes d'exposition des cellules au polluant par intermittence via des plateformes à bascule ou des flacons de culture cylindriques avaient été développés. Le désavantage majeur de ces dispositifs est que le polluant rentre en contact avec le milieu de culture créant des biais d'interprétation similaires aux expositions submergées [146].

L'apparition des premières cultures de cellules sur membrane poreuse [189-191] a facilité le développement de dispositifs d'exposition bi-phasiques des polluants en contact direct avec les cellules pendant une période de temps relativement longue (quelques minutes à plusieurs heures). Des macrophages alvéolaires de cochon d'inde ont été déposés sur une membrane poreuse de polysulfane placée sur un cercle en plastique dans un puits de plaque de culture. Différentes concentrations de NO₂ gazeux (0,1 à 0,5 ppm) ont ensuite été appliquées en partie apicale des cellules, à différents temps, les cellules étant alimentées en milieu de culture par la partie basale [162]. Suite à cette première description, d'autres études ont été réalisées pour améliorer les conditions d'exposition [188, 192]. Une avancée majeure a été réalisée par Tarkington *et al.* [186], en exposant des cellules épithéliales bronchiques et des explants de trachée à différentes concentrations d'ozone en interface air-liquide. L'ingéniosité résidait dans l'exposition en elle-même, le polluant était guidé directement sur la partie apicale des cellules afin d'optimiser le contact entre le polluant et les cellules. Ainsi, ils ont pu générer et contrôler le niveau du polluant exposé, réaliser des expositions stables et reproductibles pour chaque puits exposé et répéter les expositions en générant de la même façon les polluants et les cellules. Sun *et al.* [193], en 1995 ont ensuite été les premiers à appliquer cette méthode pour évaluer l'impact de la fumée de tabac sur des lignées cellulaires bronchiques (BEAS-2B). L'idée a ensuite été reprise par Aufderheide *et al.* [194], pour commercialiser un système d'exposition plus petit, permettant une exposition à un flux dynamique des cellules en interface air-liquide [195-201].

Ces dispositifs commercialisés à l'heure actuelle par les sociétés Cultex® et Vitrocell systems® ont été appliqués ensuite à l'étude des polluants environnementaux comme les particules diesels, les gaz d'échappement, la fumée de tabac, les particules fins et les polluants en phase gazeuse ; NO₂, O₃ et à certains COV comme le benzène, le toluène et le formaldéhyde [199, 202]. En parallèle des dispositifs d'exposition en interface air-liquide statiques ont également été mis au point. La figure 5 résume les différents types d'expositions existants. A l'heure actuelle, les expositions en interface air-liquide semblent les plus pertinentes pour analyser les effets biologiques des polluants atmosphériques.

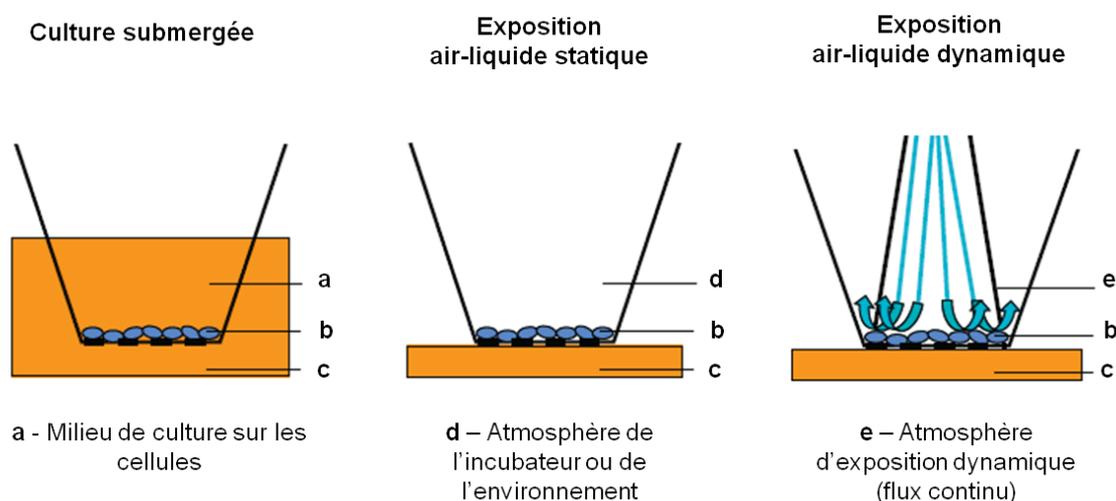


FIGURE 5 – Différents types d'expositions des cellules à des polluants en phase gazeuse : conditions de culture submergée et d'exposition en interface air-liquide statique et dynamique (**b** – Cellules en culture sur membrane microporeuse, **c** – Milieu de culture sous la membrane). Figure adaptée des travaux d'Aufderheide *et al.*[196].

Lors des études réalisées, on observe une réactivité des cellules en matière de réponse inflammatoire, de stress oxydant et de viabilité cellulaire. L'importance d'un choix judicieux de marqueurs d'effet pour l'étude de polluants sur les cellules de l'arbre respiratoire est primordiale pour appréhender les mécanismes d'action de ces polluants environnementaux.

- Effets des expositions aux COV

Différents marqueurs d'effet liés à l'apparition de pathologies respiratoires et allergiques peuvent être employés pour évaluer l'impact de polluants atmosphériques *in vitro* sur les cellules de l'arbre respiratoire. Ces marqueurs peuvent être des médiateurs lipidiques (PLA 2, PGE 2, 5-LO par exemple), des médiateurs du stress oxydant (les espèces réactives de l'oxygène ; eNOS, iNOS,...), des facteurs de croissance et molécules adhérentes (intégrines, iCAM, CD44,..) ou des cytokines. Ils interviennent à différents niveaux ; anti-inflammatoire afin de maintenir une homéostasie tissulaire, ou pro-inflammatoire permettant l'activation, puis l'infiltration des cellules immunitaires (macrophages, neutrophiles, éosinophiles, cellules dendritiques,...) au site de l'inflammation pour conduire *in fine* à des remodelages ou/et reconstructions de l'épithélium respiratoire souvent observables au sein des phénotypes de pathologies respiratoires et allergiques (Fig. 6) [156, 203].

Les principaux marqueurs d'effet étudiés dans la littérature à l'heure actuelle dans le cadre d'expositions à des COV, sont la production des cytokines pro-inflammatoires. Ces marqueurs, considérés comme de bons indicateurs de la sensibilité cellulaire épithéliale aux polluants atmosphériques, permettent d'observer les effets cellulaires précoces non reliés à des mécanismes incluant des immunoglobulines [180, 182, 204-211]. Dans la littérature, les niveaux de production de cytokines vont être majoritairement dépendants du type cellulaire employé (lignée cellulaire ou culture primaire), d'une pré-sensibilisation des cellules (TNF α par exemple) mais également de la présence d'autres types cellulaires (cellules dendritiques, macrophages, fibroblastes, etc...), et du type de culture réalisée (en interface air-liquide,...). Les marqueurs d'effet les plus souvent employés dans le cadre de l'étude de l'impact d'atmosphères chargées en COV sont l'IL-6, l'IL-8, RANTES et GM-CSF. On relève également l'évaluation de la prostaglandine E2 [212], IFN γ , MCP-1 [173] ; IL-1 α/β ; TNF α , IL-4 [180, 204, 205, 210, 213, 214].

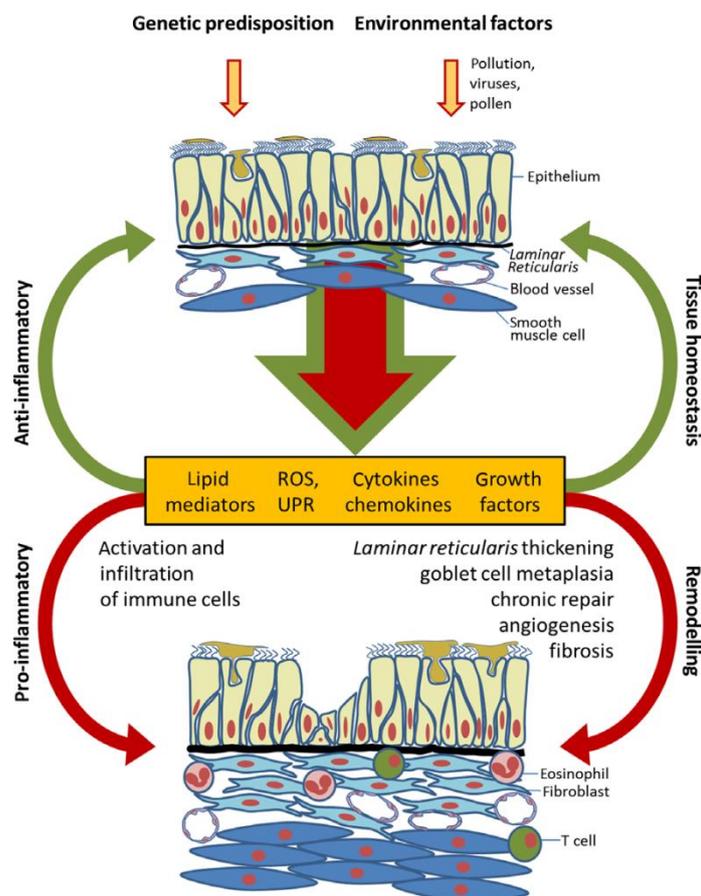


FIGURE 6 – Rôle régulateur de l'épithélium respiratoire humain dans le développement de pathologies respiratoires et allergiques. Cas de l'asthme [203]. *Anti-inflammatory* : anti-inflammatoire, *pro-inflammatory* : pro-inflammatoire, *activation and infiltration of immune cells* : activation et infiltration des cellules immunitaires, *Lipids mediators* : médiateurs lipidiques, *ROS (Reactive Oxygen Species)* : Espèces réactives de l'oxygène, *UPR (Unfolded Protein Response)* : Réponse physiologique de la cellule à l'accumulation de protéines mal repliées, *growth factors* : facteurs de croissance, *tissue homeostasis* : homéostasie tissulaire, *remodelling* : remodelage, *laminar reticularis* : lame basale, *Blood vessel* : vaisseau sanguin, *smooth muscle cell* : cellule du muscle lisse, *thickening* : épaississant, *goblet cell metaplasia* : métaplasie des cellules caliciformes, *chronic repair* : réparation chronique, *angiogenesis* : angiogenèse, *fibrosis* : fibrose, *eosinophil* : éosinophiles, *fibroblast* : fibroblaste, *T cell* : Lymphocyte T.

Les études *in vitro* évaluant l'impact des COV sur les cellules de l'arbre respiratoire sont peu nombreuses. Au sein de ces études, l'exposition est généralement unique et réalisée majoritairement en interface air-liquide. Les atmosphères étudiées sont chargées principalement d'un seul ou de plusieurs COV. Les concentrations d'exposition sont variables et peu représentatives des niveaux environnementaux, de l'ordre de plusieurs centaines de $\mu\text{g}/\text{m}^3$ à une centaine de g/m^3 [173, 180, 202, 204, 205, 207, 208, 210, 212, 215-219].

Dans la littérature, **les hydrocarbures aromatiques** sont les plus étudiés, en particulier la famille des BTEX (le benzène, le toluène, les xylènes et l'éthylbenzène) [202, 207, 208, 212].

L'équipe de Pariselli *et al.* [202] a exposé des lignées cellulaires A549 à différentes concentrations de **toluène** (380, 760, 2260 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) ou de **benzène** (320, 640, 1920 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) en interface air-liquide de façon dynamique pendant 1 h à 2 mL/min. Les auteurs ont observé une perte de viabilité cellulaire pour toutes les concentrations d'exposition, ainsi qu'une augmentation de la production en IL-8 et IL-6 des cellules à partir d'une exposition de 760 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de toluène et 640 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de benzène.

Gosepath *et al.* [212], en 2003, ont également étudié l'impact du **benzène** (5000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) sur des cultures primaires nasales humaines, en interface air-liquide, mais en condition statique pendant 8 h.

Ils ont observé une augmentation de la concentration en PGE2, ainsi qu'un endommagement de l'ADN des cellules.

En 2008, Fischäder *et al.* [208] ont utilisé le même principe d'exposition, pour évaluer l'impact pendant 20 h de différentes concentrations de **styrène**, de chlorobenzène et de **m-xylène** (de 1 mg/m³ à 100 g/m³) sur des lignées cellulaires A549 (pré-stimulées avec du TNF α). Les auteurs ont observé une inhibition de la production en IL-6 et MCP-1 aux plus fortes concentrations d'exposition, et une augmentation de la production en IL-8 et MCP-1 aux plus faibles concentrations d'exposition. Cette même équipe a ensuite exposé les lignées cellulaires A549, à des concentrations plus faibles de **styrène** (1 à 10⁶ µg/m³). Ils ont pu confirmer les premiers résultats obtenus en observant, en fonction de la concentration d'exposition, une augmentation de l'expression en MCP-1 [220].

L'effet des COV aromatiques en mélange, sur les cellules de l'arbre respiratoire humain, a été investigué, en interface air-liquide en conditions dynamique et statique, au sein de deux études :

- Dans l'étude de Pariselli *et al.* [207], des lignées alvéolaires A549 ont été exposées à un mélange de **benzène** (900 µg/m³) et de **toluène** (940 µg/m³), pendant 1 h à un débit de 2 mL/min. Les auteurs ont observé une perte de viabilité cellulaire corrélée à un endommagement de l'ADN des cellules.
- Au sein de l'étude de Fischäder *et al.* [208], des lignées A549 (pré-sensibilisées au TNF α) ont été exposées pendant 20 h à un mélange statique de **styrène**, de **m-xylène** et de chlorobenzène. Ils ont observé une inhibition de la production en MCP-1 et en IL-6 à partir d'une concentration d'exposition de 10 000 mg/m³.

L'exposition des cellules de l'arbre respiratoire à des hydrocarbures aromatiques à des fortes concentrations d'exposition, semble donc induire une augmentation de la réponse inflammatoire associée à une perte de viabilité cellulaire.

Les études évaluant l'impact **des hydrocarbures aliphatiques** sur les cellules de l'arbre respiratoire humain sont principalement des expositions de mélange de COV réalisées en interface air-liquide [180, 208, 216].

L'équipe de Fischäder *et al.* [208], en 2008 a exposé des lignées alvéolaires A549 pendant 20 h en condition statique à **un mélange d'alcane** (*n*-nonane, *n*-decane, *n*-undecane, *n*-dodecane, *n*-tridecane, méthylcyclopentane) à des concentrations comprises entre 10⁻³ et 10⁸ µg/m³. Les auteurs n'ont pas relevé d'effet sur la réponse inflammatoire et le stress oxydant des cellules.

L'effet des COV de la famille **des terpènes** sur les cellules de l'arbre respiratoire a également été investigué. Ainsi, Anderson *et al.* [180], en 2013 ont exposé des lignées cellulaires A549 pendant 1 h ou 4 h (5 mL/min) à un mélange d'ozone et de **limonène** (20 ppm ; 4 ppm). Ils ont observé une augmentation de la concentration en IL-8 et MCP-1, ainsi qu'une baisse des capacités métaboliques des cellules, après 4 h d'exposition, comparé à l'air. Dans cette même étude, le modèle d'épithélium reconstitué MucilAirTM (épithélium bronchique) a été exposé pendant 1 h, cinq fois par semaine pendant un mois, au limonène ou à un mélange de limonène (500 ppb) et ozone (100 ppb). Les auteurs ont observé une augmentation de production de l'IL-6, après exposition au limonène pendant quatre semaines. Ils ont pu également observer une diminution en MCP-1 la première et deuxième semaine, et une augmentation en IL-6, IL-8 et GM-CSF au cours de la troisième semaine d'exposition au mélange (ozone, limonène).

Gminski *et al.* [216], ont évalué l'effet des terpènes, en mélange avec des aldéhydes. Dans cette étude, les atmosphères chargées en COV ont été générées à partir de panneaux de particules en bois, pendant 28 jours. Celles-ci étaient composées principalement de **cinq terpènes** (α -Pinene, β -Pinene, Δ^3 -Carene, Camphene, Limonene) et de quatre aldéhydes (Pentanal, Hexanal, 2-Heptanal, 2-Octenal). Des lignées alvéolaires (A549) ont ensuite été exposées à ces atmosphères pendant 1 h à 5 mL/min à des concentrations comprises entre 7,25 et 81,8 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. Les auteurs ont observé une absence de cytotoxicité et d'endommagement de l'ADN des cellules après exposition.

En conclusion, en raison du peu d'études existantes à l'heure actuelle, il semble difficile de conclure quant aux effets des hydrocarbures aliphatiques sur les cellules de l'appareil respiratoire humain.

Parmi **les hydrocarbures substitués**, on retrouve dans la littérature l'étude du chlorobenzène et du formaldéhyde.

Concernant **le chlorobenzène** : Lehmann *et al.* [210] ont exposé, en condition statique pendant 20 h, des lignées cellulaires (A549) à différentes concentrations de **chlorobenzène** (10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$; 1 g/m^3 ; 100 g/m^3). Une augmentation en IL-8 et en MCP-1 a été observée après exposition. La même équipe a également étudié, dans les mêmes conditions, l'exposition au **chlorobenzène** mais à des concentrations plus faibles de l'ordre de 10^2 à 10^4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, ils ont pu observer après exposition, une augmentation des marqueurs cellulaires du stress oxydant [209].

Pour **le formaldéhyde**, les études sont plus nombreuses, les effets sur les cellules de l'arbre respiratoire ont été évalués à l'aide de formaldéhyde liquide ou gazeuse.

L'effet du formaldéhyde liquide exposé aux cellules de façon submergée a été évalué au sein de deux études :

- Dans l'étude de Kastner *et al.* [214], les auteurs ont observé une perte de viabilité cellulaire corrélée à une augmentation de la production en espèces réactives de l'oxygène et une diminution de la production en IL-8 et IL-6 des lignées cellulaires Calu-3 et 16-HBE après exposition pendant 24 h à des concentrations de 70-7000 μM .
- Dans l'étude de Balharry *et al.* [173]. Les auteurs ont exposé pendant 24 h le modèle d'épithélium bronchique EpiAirwayTM à différentes concentrations de formaldéhyde liquide (1 ; 5 ; 7,5 ; 10 ; 15 mM). Les auteurs ont observé une perte de viabilité cellulaire, une augmentation de la sécrétion en cytokines aux plus fortes concentrations d'exposition et une hyperplasie des cellules muqueuses corrélée à une diminution des jonctions serrées.

L'effet du formaldéhyde en phase gazeux sur des cellules de l'arbre respiratoire humain, en interface air-liquide, a été observé dans plusieurs études.

Ainsi, Rager *et al.* [219] en 2011, ont exposé pendant 4 h des lignées alvéolaires (A549) à du formaldéhyde (**1250 $\mu\text{g}/\text{m}^3$**) de façon statique. Les auteurs ont observé une augmentation de la sécrétion en IL-8 après exposition. Kastner *et al.* [204] ont confirmé ces résultats en observant une augmentation significative d'IL-8 toutefois corrélée à une baisse significative du métabolisme des lignées bronchiques (Calu-3) exposées pendant 1 h, jusqu'à quatre fois à 24 h d'intervalle à un mélange de formaldéhyde (**200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$**) et de dioxyde d'azote (800 $\mu\text{g}/\text{m}^3$).

Très peu d'études ont exposé des cellules de l'arbre respiratoire à des niveaux environnementaux de formaldéhyde gazeux. Les seules études, retrouvées dans la littérature, sont celles réalisées au sein de notre laboratoire par Persoz *et al.* [205, 217, 218]. Des lignées cellulaires (A549 et BEAS-2B) ont été exposées en interface air-liquide de façon dynamique pendant 30 minutes à du formaldéhyde

gazeux (**50 µg/m³**). Les résultats ont montré une absence de perte de viabilité cellulaire et de réponse inflammatoire des cellules après exposition. Les cellules ont ensuite été exposées de façon séquentielle au formaldéhyde gazeux, puis à des contaminants biologiques des *aspergillus fumigatus* (7.10^8 spores/m³), une faible tendance à une augmentation de la production en IL-8, sans perte de viabilité cellulaire a été observée. Dans un dernier temps, les cellules ont été sensibilisées à du TNFα ou à du milieu conditionné de macrophages puis exposées au formaldéhyde gazeux. Les résultats ont montré une augmentation significative de la production en IL-8 et MCP-1 en absence de perte de viabilité cellulaire.

En conclusion, les expositions des cellules de l'arbre respiratoire aux COV à de très fortes concentrations, en phase gazeuse semblent induire une augmentation de la réponse inflammatoire le plus souvent corrélée à une perte de viabilité cellulaire. En revanche, il est difficile de conclure sur les effets des COV à des concentrations plus faibles. De plus, les quelques études publiées sur le sujet sont peu comparables entre elles car plusieurs paramètres diffèrent : le type cellulaire employé, les dispositifs, les temps et les concentrations d'exposition.

A l'heure actuelle, il existe un réel manque de connaissances de l'impact d'atmosphères chargées en COV, seuls ou en mélange, sur les cellules de l'arbre respiratoire humain. Ceci s'explique par la difficulté actuelle de générer, à la fois des atmosphères réalistes proches de l'environnement et de trouver des modèles cellulaires suffisamment robustes pour parvenir à recréer des conditions d'exposition proche de la réalité.

Objectif

Au terme de l'état actuel des connaissances relatif à l'évaluation de l'impact des polluants de l'air intérieur, en particulier des COV, sur la santé respiratoire, de nouvelles approches expérimentales sont à considérer et à étudier.

C'est dans ce contexte que s'inscrivent ces travaux de thèse, dont l'objectif est de proposer une démarche expérimentale *in vitro* adaptée à l'étude de la relation entre la pollution de l'air intérieur et la santé respiratoire humaine.

Pour parvenir à cet objectif, deux sous-objectifs se sont déclinés :

1. Associer dans cette démarche les modèles *in vitro* mimant l'exposition par inhalation, et leur réponse.
2. Exposer ces modèles à des atmosphères mono ou multi-polluants de l'air intérieur en particulier les COV.

Deuxième partie
Matériel & Méthodes

II.1	MODELES CELLULAIRE ET TISSULAIRE	65
II.1.1	Cultures primaires de cellules épithéliales nasales humaines (hAECN)	65
II.1.2	Epithélium respiratoire humain reconstitué (hRNE)	67
II.2	GENERATION ET CONTROLE D'ATMOSPHERES GAZEUSES	68
II.2.1	Génération statique d'une atmosphère gazeuse mono-polluant - Cas du formaldéhyde	68
II.2.2	Génération dynamique d'une atmosphère gazeuse multi-polluants - Cas des COV émis par les peintures	69
II.2.3	Génération de fumée primaire de tabac	70
II.2.4	Contrôles des atmosphères gazeuses mono et multi polluants.....	70
II.3	DISPOSITIFS D'EXPOSITION EN INTERFACE AIR-LIQUIDE	73
II.3.1	Dispositif d'exposition dynamique en interface air liquide	73
II.3.2	Dispositif d'exposition statique en interface air liquide	74
II.4	MARQUEURS D'EFFET	74
II.4.1	Fonctionnalité cellulaire	74
II.4.2	Viabilité cellulaire	75
II.4.3	Résistance Electrique Trans Epithéliale (TEER).....	75
II.4.4	Médiateurs de l'inflammation produits dans le milieu de culture	76
II.4.5	Analyse histologique des épithéliums hRNE.....	76
II.5	PROTOCOLES D'EXPOSITIONS	80
II.5.1	Protocoles d'expositions dynamiques en interface air-liquide.....	81
II.5.2	Protocole d'exposition statique en interface air-liquide des épithéliums hRNE.....	83
II.6	EXPRESSION DES RESULTATS ET ANALYSE STATISTIQUE.....	83

Les résultats obtenus au fur et à mesure de ces travaux nous ont contraints à faire évoluer les méthodologies et protocoles expérimentaux employés afin de répondre au mieux aux objectifs envisagés.

Après la présentation des modèles cellulaires utilisés, une partie « métrologie » sera consacrée à la génération et au contrôle des atmosphères testées. Puis nous décrirons les différents dispositifs permettant d'effectuer des expositions en interface air-liquide de façon dynamique ou statique, et les paramètres biologiques considérés pour évaluer l'impact des expositions répétées. Enfin, nous terminerons par une partie « expérimentale » avec la présentation des protocoles utilisés pour l'application des atmosphères mono- ou multi-polluants sur les modèles cellulaires. Il est à préciser que les méthodologies présentées ont été mises en place dans le cadre de ce projet de thèse.

II.1 MODELES CELLULAIRE ET TISSULAIRE

II.1.1 Cultures primaires de cellules épithéliales nasales humaines (hAECN)

- Origine

Les cellules utilisées sont des cellules épithéliales nasales humaines obtenues à partir d'un polype nasal, prélevé chez un donneur sain âgé de 18 ans. Ces cellules hAECN (human Airway Epithelial Cell Nasal) sont commercialisées par la société de biotechnologies Epithelix^o. Le certificat d'analyse, garantissant que ces cellules sont exemptes de mycoplasmes et de virus (HIV-1, HIV-2, Hépatite B, Hépatite C), est consultable dans l'annexe A.

- Conditions de culture cellulaire

Les cellules hAECN sont envoyées congelées dans des cryotubes. Dès réception, les cellules hAECN sont décongelées au bain-marie à 37°C durant 2 min, puis transférées dans un tube conique contenant 30 mL du milieu de culture spécifique hAEC (hAEC Culture Medium, Epithelix, Suisse) supplémenté par 1 % de 10 UI/mL de Pénicilline et 10 µg/mL de Streptomycine (Pen Strep#15140-148, Invitrogen, France).

Après centrifugation (IEC CL3OR Centrifuge, Thermo Scientific), 5 min à 1100 tours/min, le culot cellulaire est suspendu dans 1 mL de milieu hAEC. Un comptage sur cellule de numération (Quick Read Precision Cell, Dutscher, France) est réalisé permettant d'ensemencer les cellules à une densité de $2 \cdot 10^4$ cellules/mL dans des flacons de culture (5 mL pour 25 cm² et 20 mL pour 75 cm², Nunc#055401-055403, Dutscher, France). Les cellules en culture primaire sont maintenues dans un incubateur (Poste de Sécurité Microbiologique de classe II, MCO-18AIC, Sanyo, Thermo Scientific) à 37°C, 5 % CO₂ et hygrométrie constante. Le milieu de culture est changé après deux jours, puis tous les trois jours. Les cellules vont se multiplier et former un tapis cellulaire homogène (Fig. 7).

Lorsque la confluence atteint 70-80 %, les cellules hAECN sont détachées du support des flacons de culture, sous l'action d'une enzyme protéolytique, la trypsine (TrypLE™ Express#12604013, Invitrogen, France), puis récupérées dans le milieu hAEC et centrifugées (5 min à 1100 tours/min). Le culot est alors remis en suspension dans le milieu hAEC, les cellules sont comptées et réensemencées dans des flacons de culture. Chaque étape de trypsination conduit à un « passage » supplémentaire définissant l'âge des cellules.

^o www.epithelix.com

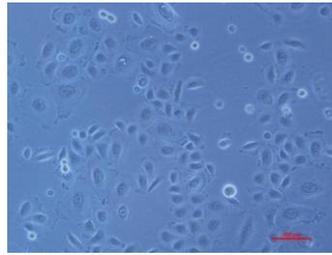


FIGURE 7 – Cellules hAECN. Photo prise au microscope optique (x100) (Echelle : 100 μ m)

Après deux amplifications, les cellules arrivent à passage 3 et sont stockées à une densité de 1.10^6 cellules/mL dans des cryotubes contenant un milieu de congélation composé de 90 % de sérum de veau foetal (Fetal Bovine Serum#S0115, Biochrom AG, France) et 10 % de diméthylsulfoxyde utilisé comme cryopréservateur (DMSO#D4540, Sigma-Aldrich, France). Cette étape permet de constituer une banque de cellules maintenues à -196°C dans de l'azote liquide, ou ensemencées dans des flacons de culture en vue des expérimentations. Les cellules sont réceptionnées à passage 1 et sont utilisées à passage 4.

- Ensemencement des cellules hAECN

Afin d'assurer une exposition en interface air-liquide, les cellules sont déposées dans une petite chambre de culture, appelée insert, constituée d'une membrane en polyéthylène téréphtalate dont la surface totale est de $1,12\text{ cm}^2$ avec une porosité de 4.10^6 pores/ cm^2 de $0,4\text{ }\mu\text{m}$ de diamètre (Costar® Snapwell, Polyéthylène Téréphtalate (PET#3460, Corning®)) (Fig. 8).

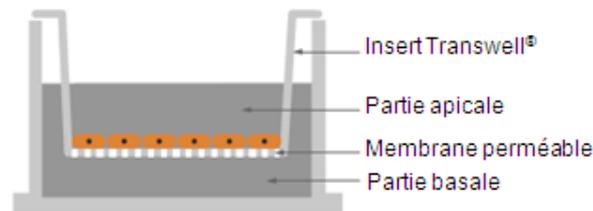


FIGURE 8 – Culture de cellules sur insert (Transwell® Permeable supports, CORNING®) (représentation schématique).

Ce dispositif permet, grâce à la présence de pores au niveau de la membrane, un échange gazeux et nutritif entre la partie basale et la partie apicale lorsque cette dernière se trouve sans milieu de culture (interface air-liquide) au moment des expositions.

Préalablement à l'ensemencement, les membranes des inserts sont coatées, ou non, par du collagène de type IV (Collagen type IV human placenta#C5533, Sigma-Aldrich, France).

Le collagène est dilué dans une solution d'acide acétique (acide acétique#1000631000, Merck, France) à 0,25 % à une concentration de 1 mg/mL pendant toute une nuit, puis dilué dans de l'eau stérile 2,5 fois et dans de l'alcool stérile à 60° (Ethanol absolu AnalaR NORMAPUR®, VWR, France), 0,5 fois pour obtenir une concentration finale de 0,2 mg/mL. 50 μ L de collagène dilué sont déposés sur la membrane de l'insert en partie apicale, et sont ensuite séchés pendant une heure trente minimum dans des conditions stériles. Chaque membrane est ensuite lavée avec 200 μ L d'HBSS (Hanks Balanced Salt Solution#14025, Invitrogen) puis humidifiée, une heure à l'incubateur avant l'ensemencement, avec 100 μ L de milieu hAEC en partie apicale et 1 mL de milieu hAEC en partie basale.

Au terme de cette étape d'humidification, les cellules sont ensemencées sur les membranes à différentes densités : $5 \cdot 10^4$, $2 \cdot 10^5$ ou $5 \cdot 10^5$ cellules/mL. Les inserts sont alors déposés dans des plaques 12 puits (Costar#3460, Sigma-Aldrich, France). Dans chaque puits les cultures se trouvent dans des conditions submergées, c'est à dire avec 500 μ L de milieu hAEC en partie apicale et 1 mL en partie basale. Les cellules hAECN sont maintenues à l'incubateur pendant 96 h, avec un changement de milieu 24 h après ensemencement pour soustraire les cellules mortes de la culture primaire. Le contrôle de l'état des cellules hAECN après 96 h se fait à l'aide d'un microscope optique (Nikon Eclipse Ts100) équipé d'une caméra (Nikon Digital Sight Camera Support).

II.1.2 Epithélium respiratoire humain reconstitué d'origine nasale (hRNE)

- Origine

Le modèle d'épithélium respiratoire humain reconstitué utilisé dans ce travail (hRNE pour human Reconstituted Nasal Epithelium), est fourni par la société de biotechnologies Epithelix (Genève, Suisse) sous le nom commercial de MucilAir™. Il est obtenu à partir de cultures primaires de cellules épithéliales humaines d'origine nasale (hAECN) précédemment citées (*conf* II.1.1) pouvant provenir d'un seul donneur ou d'un mélange de 14 donneurs.

Les cellules épithéliales sont cultivées et différenciées sur insert (Corning® Costar® Snapwell, Polyéthylène Téréphtalate (PET), diamètre 0,33 cm², porosité 0,4 μ m) dans un milieu spécifique (MucilAir™ culture medium, Epithelix, Suisse) contenant 1 % de Penicilline/Streptomycine (10 UI/mL de Pénicilline – 10 μ g/mL de Streptomycine) et co-cultivées, ou non, avec des fibroblastes humains (HF) (Fig. 9).

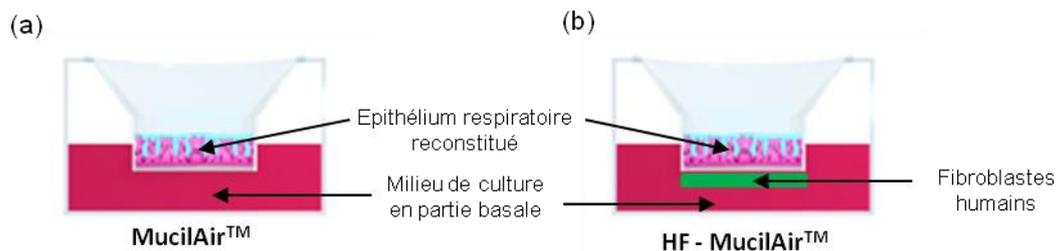


FIGURE 9 – Schéma représentant un épithélium hRNE en interface air-liquide sur insert, co-cultivé (b) ou non (a) avec des fibroblastes humains. Images adaptées de Huang *et al.* [176].

Une fois reconstitués, ces épithéliums hRNE contiennent jusqu'à $4 \cdot 10^5$ cellules de trois types différents : des cellules basales, des cellules ciliées, des cellules muqueuses, de nombreuses jonctions serrées assurant des transports ioniques actifs, et une activité métabolique qui se traduit par la production de mucus et la sécrétion de nombreux médiateurs biologiques comme des cytokines, chemokines et métalloprotéases. Ces tissus sont en homéostasie tissulaire impliquant une faible croissance et donc un renouvellement tissulaire très lent, ce qui leur octroie une durée de vie longue (12 mois selon le fabricant) sans modification biochimique et morphologique. Les certificats d'analyse, garantissant que les différents modèles utilisés sont exempts de mycoplasmes et de virus (HIV-1, HIV-2, Hépatite B, Hépatite C), sont consultables dans l'annexe B.

- Conditions de maintien en culture des épithéliums hRNE

Les épithéliums hRNE, inclus dans un gel nutritif, sont livrés dans des plaques de culture stériles de 24 puits. Dès réception, chaque épithélium est dégagé de son support gélosé et est déposé dans

un puits d'une plaque de culture 24 puits, contenant 700 μL de milieu de culture MucilAir™ en position basale (MucilAir™ culture medium, Epithelix, Suisse) contenant 1 % de Penicilline/Streptomycine. Les épithéliums sont ensuite maintenus en interface air-liquide à l'incubateur dans une atmosphère contrôlée (37°C, 5 % de CO_2 , humidité relative constante).

Pour assurer une bonne homéostasie tissulaire, le milieu de culture est changé tous les deux à trois jours et la partie apicale est lavée une fois par semaine avec 600 μL d'une solution stérile [NaCl 0,9 % (NaCl#5700, Minisol, France), CaCl_2 1,25 mM (CaCl_2 #21115, Sigma-Aldrich, France), Hépès 10mM (HEPES#15630-056, Invitrogen, France)] afin d'éliminer les cellules mortes et le mucus produit.

Le contrôle de l'état général du tissu se fait en visualisant la fréquence des battements ciliaires et la production de mucus à l'aide d'un microscope optique équipé d'une caméra, mais également en mesurant la résistance électrique trans-épithéliale (TEER : Trans Epithelial Electrical Resistance). Une photo de la partie apicale est présentée ci-dessous (Fig. 10).

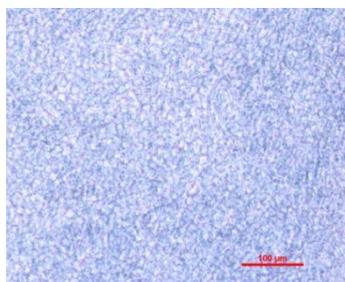


FIGURE 10 – Epithéliums hRNE. Photo prise au microscope optique (x100) (Echelle : 100 μm)

II.2 GENERATION ET CONTROLE D'ATMOSPHERES GAZEUSES

Trois types de génération ont été utilisés dans cette thèse : la génération dite statique correspond à la production d'une atmosphère chargée d'un polluant se vaporisant à température ambiante, sans renouvellement d'air ; par opposition la génération dynamique se fait dans les mêmes conditions mais avec un renouvellement d'air. Enfin, la génération de fumée de tabac se fait par combustion.

II.2.1 Génération statique d'une atmosphère gazeuse mono-polluant : cas du formaldéhyde

La génération de l'atmosphère chargée en formaldéhyde gazeux est effectuée selon une technique adaptée de Saltzman [221] mise en place au laboratoire par Persoz *et al.* [205], et décrite par Bardet *et al.* [222].

Le formaldéhyde est un composé hygroscopique et volatil à température ambiante, l'utilisation de matériaux en verre et de tuyaux en téflon a été favorisée afin de limiter le phénomène d'adsorption du formaldéhyde sur les parois. Une quantité définie de formaldéhyde liquide (F-1635, Sigma-Aldrich, France) est introduite en fonction de la concentration finale souhaitée, dans une chambre de génération en verre de 11 L, préalablement mise sous vide. Le vide de la chambre de génération est cassé avec de l'air contrôlé en température ($22,3 \pm 1,7$ °C) et en humidité ($30 \pm 9,7$ %). Cette étape permet au formaldéhyde de passer de l'état liquide à l'état gazeux. L'atmosphère est ensuite stabilisée entre 30 et 60 min avant les premières expositions. La préparation des solutions de formaldéhyde pour obtenir les concentrations théoriques de 90 à 360 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ suit le protocole suivant.

Partant d'une solution de formaldéhyde à 13,3 M et sachant que la masse molaire du formaldéhyde est de 30 g/mol, la concentration massique de la solution mère (*SM*) sera de $13,3 \times 30,0 = 399$ g/L. Ainsi, pour obtenir une concentration théorique de $363 \mu\text{g}/\text{m}^3$, la *SM* est diluée $9,1 \cdot 10^3$ fois (environ 10^4 fois) dans de l'eau distillée. On obtient alors une solution fille 1 (*SF1*) de concentration $39,9 \mu\text{g}/\text{mL}$. $100 \mu\text{L}$ de *SF1* ($3,993 \mu\text{g}$ de formaldéhyde) sont introduits dans la chambre de génération en verre (11 L), ce qui conduit à une concentration théorique d'environ $350 \mu\text{g}/\text{m}^3$ [$(3,993/11) \times 1000 = 363 \mu\text{g}/\text{m}^3$]. Pour obtenir les concentrations théoriques d'environ $180 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ($181,5 \mu\text{g}/\text{m}^3$) et $90 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ($90,75 \mu\text{g}/\text{m}^3$) des solutions filles *SF2* ($SF2 = SF1/2$) et *SF3* ($SF3 = SF2/2$) ont été préparées et utilisées.

II.2.2 Génération dynamique d'une atmosphère gazeuse multi-polluants : cas des composés organiques volatils (COV) émis par des peintures

La génération des atmosphères gazeuses chargées en composés organiques volatils (COV) a été inspirée des normes ISO 16000-9 et 16000-11 relatives au dosage de l'émission de COV de produits de construction et d'objets d'équipement.

Le protocole suivant a été mis en place. Une quantité déterminée de peinture a été étalée sur une plaque de verre de surface définie et adaptée selon les paramètres des normes ISO 16000-9 et 16000-11. Le détail du calcul des différents paramètres utilisés (surface à peindre et quantité de peinture), figure dans l'annexe C. La plaque de verre est ensuite déposée dans une chambre en verre de 11 L et laissée durant 5 jours sous un flux d'air constant avec une température et une humidité contrôlées, respectivement de 20-25 °C et $79 \pm 8,1$ %. Le flux d'air est généré à l'aide d'un compresseur (JUN AIR#1514315, 2000-25 M). Le taux de renouvellement d'air par heure a été fixé à 0,5 selon les indications de la norme ISO 16000-9, c'est-à-dire à 5,5 L par heure pour notre système ($11 \text{ L} \cdot 0,5$). Ainsi, en sortie du compresseur, un contrôleur de flux (Mass flow meter, Vitrocell®, Allemagne) relié à un humidificateur permet de fixer le débit de renouvellement d'air à 90 mL/min ($5,5 \text{ L} / 60\text{min}$) (Fig. 11).

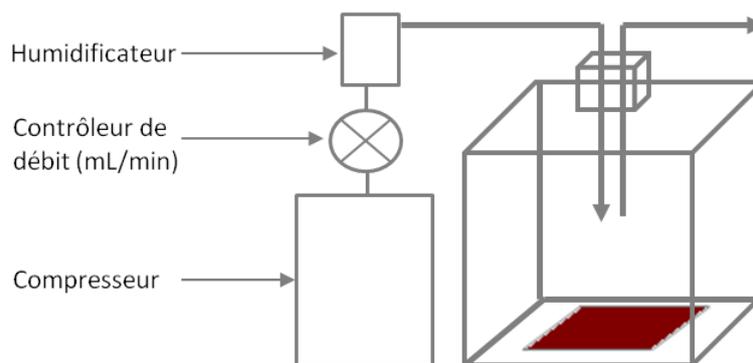


FIGURE 11 – Dispositif de génération dynamique d'atmosphères chargées en COV, émis par des peintures, inspiré des normes ISO 16000-9 et 16000-11.

Deux peintures ont été sélectionnées pour générer les atmosphères chargées en COV, l'une est une peinture aqueuse (récente) fabriquée après la réglementation relative à l'étiquetage des produits de construction et de décoration (arrêté du 19/04/2011 et arrêté modificatif du 20/04/2012), l'autre est une peinture à base de solvants organiques (ancienne, car produite avant la réglementation).

- Une peinture aqueuse "récente", de la marque Brillant intérieur acrylique et de référence : Auchan, label écologique de l'UE, valeur limite UE pour ce produit cat. A/b : 150 g/L 2007 et max 100 g/L en 2010 max de COV 20 g/L.
- Une peinture à base de solvants organiques "ancienne", de marque Orion Brillant et de référence : ral 3007 (lot N° 4546414676), de classification AFNOR famille 1 classe 4a (peinture à base de résine alkyde, séchant à l'air).

II.2.3 Génération de fumée primaire de tabac

La fumée primaire de tabac est générée par combustion d'une cigarette de marque Gauloises (Blondes) de référence : 3258170322331 composé de 87 % de tabac, 6,5 % de papier à cigarette, 6,5 % d'agents de saveur, texture (7 mg de goudrons, 0,6 mg de nicotine et 9 mg de monoxyde de carbone) et aspiration de la fumée primaire, dix fois à l'aide d'une seringue de 25 mL. Au fur et à mesure des aspirations, la fumée (au total 250 mL) est injectée dans une chambre en verre de 3 L fermée hermétiquement contenant les hRNE (Fig. 12).

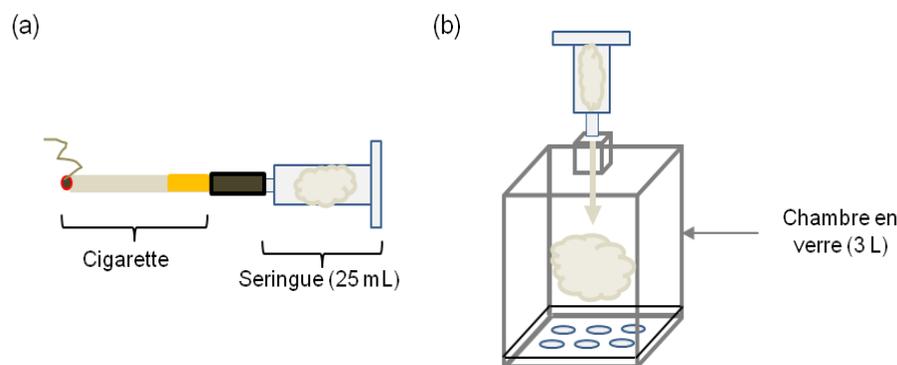


FIGURE 12 – Génération (a) et transfert (b) de la fumée dans une chambre en verre.

La même approche méthodologique est mise en œuvre pour le formaldéhyde gazeux et les COV, que ce soit pour le prélèvement ou l'analyse qualitative ou quantitative. Concernant la fumée de tabac, seule la quantité de particules déposées a été contrôlée.

II.2.4 Contrôles des atmosphères gazeuses mono- et multi-polluants

- Prélèvement des atmosphères

Les contrôles des atmosphères générées ont été réalisés en collaboration avec l'école des mines d'Alès au sein du pôle RIME (Recherche sur les Interactions Matériaux et Environnement) à Pau, dirigé par le Professeur Valérie Desauziers.

La méthode SPME (MicroExtraction sur Phase Solide) adoptée repose sur l'utilisation d'un support constitué d'une fibre de silice fondue sur laquelle est greffée une phase stationnaire permettant d'extraire spécifiquement le ou les composés à doser (Fig. 13a). Le pôle RIME a adapté cette méthodologie au dosage de COV prélevés dans les environnements intérieurs : la conception d'un flacon en verre de volume défini (250 mL) (Flacon#39-75250, Quad Service), fermé à l'aide d'un opercule (FSL cap assembly (ASVEV) # 39-7625, Quad Service) surmonté d'un adaptateur (SPME adapter# QS-SPME01) permettant l'insertion de la fibre SPME (Fig. 13b). La fibre est positionnée à l'intérieur d'une aiguille amovible, permettant à la fois la protection du support greffé et le positionnement de la fibre dans les flacons de prélèvement et dans le chromatographe pour l'analyse.

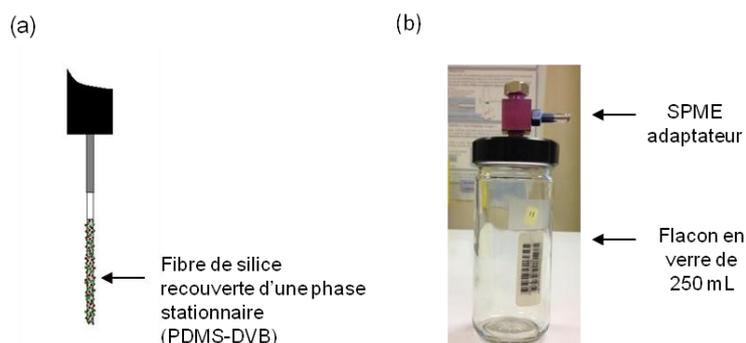


FIGURE 13 – Méthode de prélèvement SPME. (a) Fibre de silice, (b) flacon de prélèvement avec adaptateur.

Les fibres sont conditionnées à haute température pendant 15 minutes (250°C, ratio split : 20) avant extraction. Les fibres SPME utilisées sont faites de Polydiméthylsiloxane (PDMS), recouvertes avec du divinylbenzène (DVB) (SPME fiber assembly Polydiméthylsiloxane/Divinylbenzène# 57345-U, Sigma-Aldrich). Pour le dosage du formaldéhyde, les fibres ont été préalablement recouvertes avec de l'o-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamine hydrochloride (PFBHA# 76735, Sigma-Aldrich), dilué dans l'eau à 17 % [223].

Une détection qualitative préalable des COV à l'ouverture des pots des deux peintures a été réalisée en déposant une quantité de peinture (1,55 et 1,16 g respectivement, pour la peinture aqueuse et la peinture à base de solvants) dans un flacon en verre de 10 mL. L'atmosphère générée a ensuite été extraite via la fibre SPME pendant une minute dans l'espace de tête du flacon.

Une fois les atmosphères générées, les flacons de 250 mL préalablement mis sous vide sont reliés à la chambre de génération de 11 L pour prélever l'atmosphère à contrôler. La fibre SPME est ensuite introduite dans le flacon pour procéder à l'extraction des composés à analyser. Le temps d'extraction varie en fonction de la concentration totale des composés recherchés dans l'atmosphère étudiée : 15 min pour le formaldéhyde entre 5 et 15 min pour les COV.

- Analyses des composés extraits des atmosphères générées

Les fibres SPME ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse (GC#Varian 3800 gas chromatography) couplée à un spectromètre de masse (MS#1200Q quadrupole mass spectrometer, Varian), principalement pour la quantification du formaldéhyde gazeux et la détection qualitative des COV à l'ouverture de la peinture. L'unité de masse atomique était de 30-250 (amu) et le taux d'acquisition d'un demi-balayage par seconde. Le programme d'extraction d'ions de balayage complet (EIC) a été utilisé. Afin de quantifier les COV émis à partir du 3^{ème} jour de séchage de la peinture, les fibres ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (FID# Agilent).

- Courbes d'étalonnage des atmosphères chargées en COV

Formaldéhyde gazeux

La courbe d'étalonnage de formaldéhyde gazeux a été réalisée à l'aide d'un dispositif à perméation (Saint Chamas, France) relié à une chambre en verre de 50 litres (Température : $20 \pm 0,05^\circ\text{C}$, Humidité : $52,6 \pm 2,2\%$). Trois concentrations ont été générées : 180, 90 et $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Le coefficient de variation pour le dosage d'une même concentration répétée trois fois est inférieur à 15 % (Fig. 14).

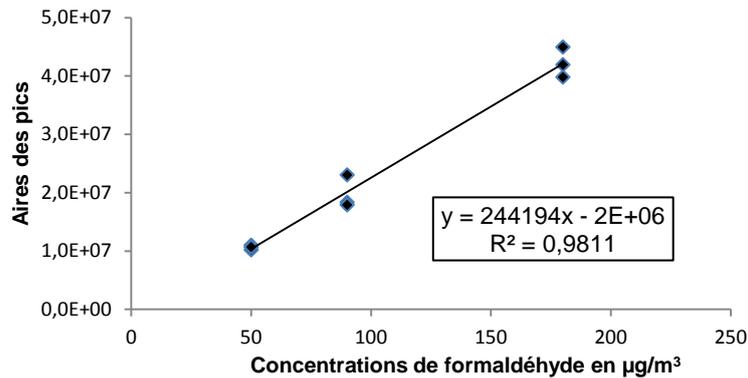


FIGURE 14 – Courbe d'étalonnage du dosage de formaldéhyde en phase gazeuse

Les concentrations de formaldéhyde générées par le système statique ont été vérifiées grâce à la droite d'étalonnage ($y = 244194x - 2E+06$) du formaldéhyde présentée Fig. 14. Chaque atmosphère a été générée trois fois, afin d'évaluer la reproductibilité de la génération. Le coefficient de variation pour le dosage d'une même concentration de formaldéhyde générée trois fois indépendamment avec le dispositif, est inférieur à 10 %.

Atmosphères chargées en COV générées par les peintures au 3^{ème}, 4^{ème} et 5^{ème} jour

Les quantifications des composés générées au 3^{ème}, 4^{ème} et 5^{ème} jour, ont été réalisées à l'aide d'un étalonnage au toluène. Celui-ci a été réalisé en générant des atmosphères de toluène à l'aide des flacons en verre (250 mL) préalablement mis sous vide et injection d'une quantité liquide de toluène. Les concentrations des COV présents dans les atmosphères au 3^{ème}, 4^{ème} et 5^{ème} jour, ont été déterminées d'après la droite d'étalonnage du toluène présentée en Fig. 15.

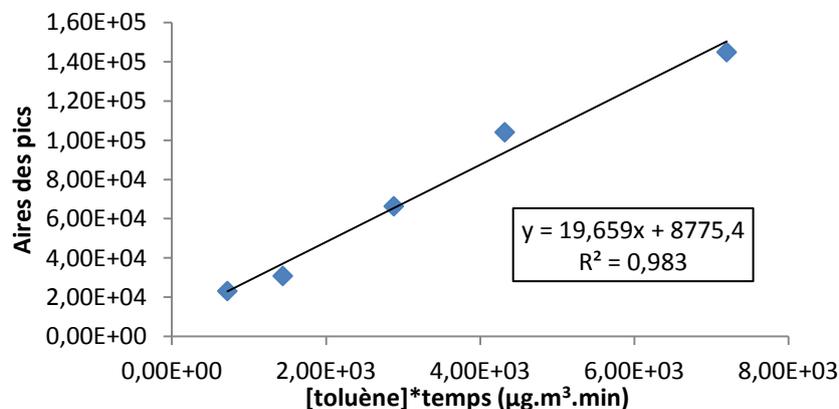


FIGURE 15 – Courbe d'étalonnage du toluène (l'unité temps correspond au temps d'extraction de la fibre SPME dans le flacon de 250 mL).

Les résultats des concentrations générées au 3^{ème}, 4^{ème} et 5^{ème} jour seront présentés en moyennes des concentrations des composés sur les trois jours d'exposition, puis en somme des moyennes des composés générés, afin d'estimer la concentration moyenne d'exposition en COV totale pour les trois jours d'exposition.

- Quantification des particules produites par combustion de tabac

Une quantification pondérale des particules de fumée primaire de tabac déposées sur les épithéliums hRNE lors de l'exposition a été réalisée. La quantité de particules déposée sur des filtres mimant les épithéliums hRNE dans chaque puits d'une plaque 24 puits, dans le dispositif d'exposition de 3 L, a été pesée, avant et après combustion d'une cigarette. Cette quantification a été répétée 3 fois, permettant le calcul d'un poids moyen de particules déposées et d'un coefficient de variation de la déposition.

II.3 DISPOSITIFS D'EXPOSITION EN INTERFACE AIR-LIQUIDE

Deux dispositifs, permettant des expositions en interface air-liquide, mettant en contact le polluant et la partie apicale des cellules, ont été utilisés : un dispositif d'exposition dynamique sous un flux à débit constant ainsi qu'un dispositif d'exposition statique par déposition.

II.3.1 Dispositif d'exposition dynamique en interface air-liquide

Les expositions dynamiques en interface air-liquide ont été mises en place pour les atmosphères gazeuses (formaldéhyde et COV) et ont été réalisées dans des chambres d'exposition disposées dans un module Vitrocell® Systems (Vitrocell®, Allemagne). Deux modules ont été utilisés lors des expérimentations :

- un module trois puits pour exposer les cellules hAECN déposées sur des membranes de diamètre 1,12 cm² et,
- un module six puits pour exposer les épithéliums hRNE se trouvant sur des membranes de diamètre 0,33 cm².

Dans les deux cas, les modules sont constitués d'une partie haute (Fig. 16A) équipée de trois ou six « trompettes » (1 trompette par puits) permettant de délivrer l'atmosphère à tester directement au niveau de la partie apicale des cellules et d'une partie basse, contenant trois ou six puits (accueillant les inserts et le milieu de culture) (Fig. 16B), reliée à un système de circulation d'eau afin de maintenir le modèle *in vitro* à 37°C.

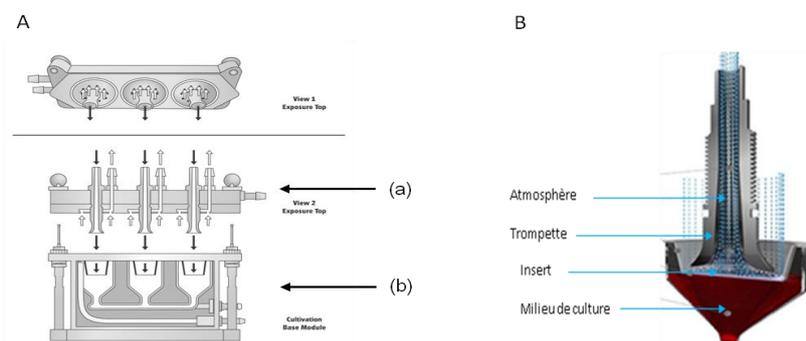


FIGURE 16 – (A) Module Vitrocell® Systems (trois puits) d'exposition en interface air-liquide (a) Partie haute du module comprenant trois trompettes (b) Partie basse du module comprenant les puits et le système de circulation d'eau. (B) Aperçu d'un puit lors de l'exposition des cellules dans le module Vitrocell® system.

Le flux d'air à l'entrée des trompettes, paramètre correspondant à la vitesse de l'atmosphère (chargée ou non en polluants) entrant en contact avec la partie apicale des cellules, est fixé grâce à un contrôleur de flux (Mass Flow Meter, GMF173, Vitrocell®), à 2 mL/min. La hauteur entre la partie

basse des trompettes et la membrane de l'insert portant les cellules, a été fixée à 2 mm pour les cellules hAECN et 3 mm pour les épithéliums hRNE.

II.3.2 Dispositif d'exposition statique en interface air-liquide

Le dispositif d'exposition statique en interface air-liquide a été inspiré du dispositif Vitrocell® Cloud System conçu pour exposer des cellules à des aérosols liquides. Les inserts contenant les épithéliums hRNE sont placés dans une plaque 24 puits contenant 700 μ L de milieu de culture en partie basale, puis déposés dans une chambre en verre de 3 L fermée hermétiquement. La fumée primaire de tabac (250 mL) est injectée dans la chambre en verre contenant les inserts. Celle-ci est ensuite placée dans une étuve à 37°C pendant la période d'exposition (Fig. 17).

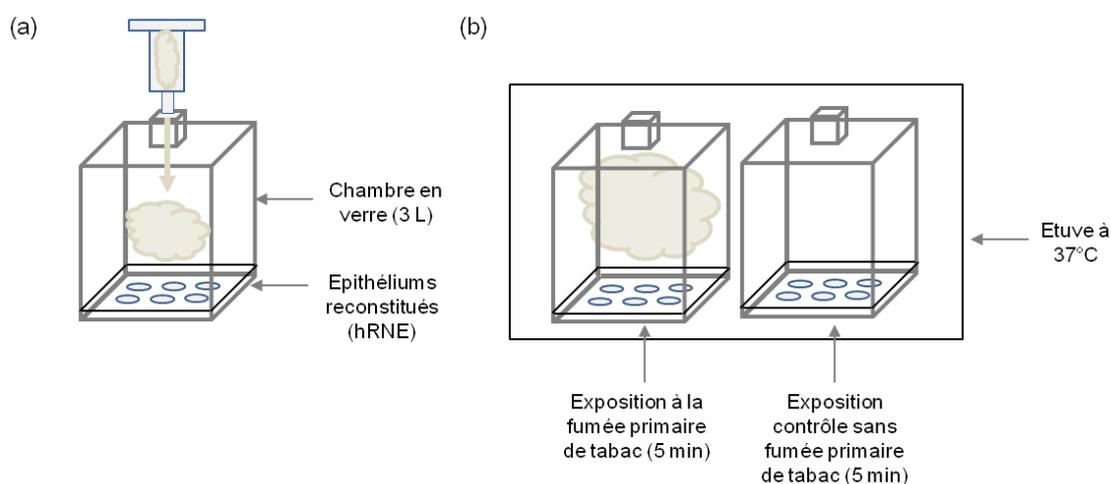


FIGURE 17 – Dispositif d'exposition statique en interface air-liquide. (a) Transfert de la fumée primaire de tabac (250 mL) dans une chambre en verre de 3 L. (b) Incubation dans une étuve à 37°C.

II.4 MARQUEURS D'EFFET

II.4.1 Fonctionnalité cellulaire : test au XTT

Le principe du test XTT est basé sur la mesure de l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules. Cette enzyme coupe le cycle tétrazolium du XTT (2,3-bis[2-Methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tétrazolium-5-carboxyanilide) de couleur jaune et libère des cristaux de formazan oranges (Roche Cell Proliferation Kit II#12566600, Roche, France) qui se solubilisent dans de l'HBSS (Hanks mL Balanced Salt Solution#14025, Invitrogen, France). Le kit Cell Proliferation contient : une solution de XTT (1 mg/mL), une solution de PMS (N-méthyl dibenzopyrazine méthyl sulfate), le coupleur d'électron (0,383 mg/mL) (Fig. 18). Ce protocole n'a été utilisé que pour les cellules hAECN. 300 μ L d'HBSS et 150 μ L de la solution de XTT/coupleur d'électron (un volume de coupleur d'électron pour 50 volumes de réactif XTT) chauffés à 37°C, sont déposés sur la partie apicale des cellules, puis les inserts sont maintenus dans l'incubateur à 37°C pendant 3 h. La lecture de la densité optique (DO) se fait au spectrophotomètre (Multiskan-EX, Thermo Scientific) à 490 nm. La DO est fonction du nombre de cellules fonctionnelles.

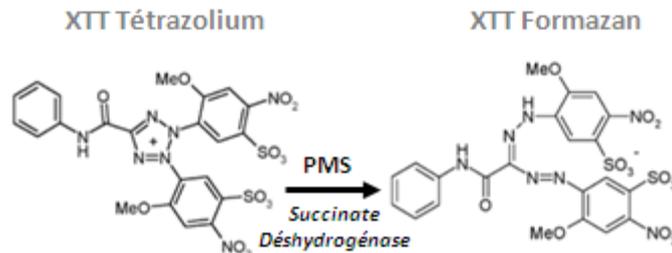


FIGURE 18 – Réduction du XTT en formazan par l'enzyme mitochondriale, la succinate déshydrogénase

. Les valeurs de DO obtenues pour les blancs (DO_{bl} : puits sans cellules) sont soustraites aux valeurs de DO obtenues pour les cellules hAECN exposées (DO_E) ou non exposées (DO_C). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle selon le calcul suivant :

$$\% = [(DO_E - DO_{bl}) / (DO_C - DO_{bl})] * 100$$

II.4.2 Viabilité cellulaire: dosage de la lactate déshydrogénase

La lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme, présente dans le cytosol des cellules, qui permet la réaction de transformation du pyruvate en lactate en présence de NADH, H⁺. (Fig. 19) Elle est relarguée dans le milieu de culture lorsqu'il y a rupture de la membrane plasmatique. L'activité en LDH dans le milieu de culture est mesurée à l'aide d'un kit (Siemens Vista 1500).

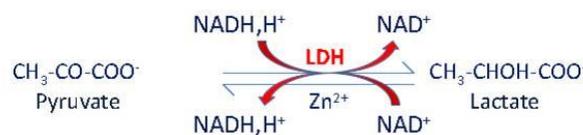


FIGURE 19 – Principe du dosage de la lactate déshydrogénase (LDH).

Sa concentration est directement proportionnelle à la diminution de la DO à 340 nm, due à la conversion du NADH, H⁺ en NAD⁺. L'activité en LDH d'un échantillon est exprimée en unité de substrat consommé par litre (U/L). Les résultats sont exprimés en pourcentage de variation par rapport au témoin positif, représentant l'activité maximale obtenue après la lyse complète des cellules (trois séries de congélation/décongélation des cellules sur membrane), selon la formule suivante :

$$\% \text{ viabilité} = 100 * [1 - (A_{\text{échantillon}} - A_{\text{témoin}}) / (A_{\text{témoin positif}} - A_{\text{témoin}})]$$

$A_{\text{échantillon}}$: Activité LDH de l'échantillon, $A_{\text{témoin}}$: Activité LDH du témoin incubateur, $A_{\text{témoin positif}}$: Activité LDH maximale

II.4.3 Résistance électrique trans-épithéliale (TEER) des épithéliums (hRNE)

La bonne cohésion des épithéliums hRNE est représentée par la présence de jonctions serrées entre les cellules et d'un transport ionique actif, et est évaluée par la mesure de la résistance membranaire. Cette mesure, nommée TEER (Trans Epithelial Electric Resistance), s'effectue à l'aide d'un voltohmmètre (EVOM 2, WPI Europe, Angleterre) relié à deux électrodes. Après avoir « lavé » la partie apicale de l'épithélium hRNE avec la solution stérile (NaCl 0,9 %, CaCl₂ 1,25 mM, Hépès 10 mM), 200 μ L et 700 μ L de cette même solution sont déposés respectivement en position apicale et

basale. La différence de potentiel est mesurée entre le pôle apical de l'épithélium et la solution stérile se trouvant au fond du puits. Elle est exprimée selon la formule suivante :

$$\text{TEER } (\Omega/\text{cm}^2) = (R_m - R_0) \times A$$

R_m : Moyenne de trois valeurs expérimentales mesurées (Ω), R_0 : Valeur expérimentale du blanc (sans cellules : 100 Ω), A : Surface de la membrane de l'insert (0,33 cm^2).

Des valeurs, comprises entre 300 et 700 Ω/cm^2 , reflètent une bonne intégrité cellulaire selon le fournisseur Epithelix.

II.4.4 Médiateurs de l'inflammation produits dans le milieu de culture

La réaction inflammatoire peut s'exprimer par la sécrétion d'une cascade de cytokines, chacune ayant leurs spécificités. Les interleukines IL-8, l'IL-6, l'IL-1 α et le GM-CSF font parties des cytokines pro inflammatoires. Les dosages de ces cytokines reposent sur la technique ELISA (Enzyme Link Immunosorbant Assay). Il s'agit de fixer les cytokines sur un anticorps primaire spécifique ; le complexe ainsi formé peut être reconnu par un anticorps secondaire biotinylé ayant une spécificité d'espèces. Une peroxydase fixée à la streptavidine qui se fixe au résidu biotinylé présent, permet ensuite de révéler le complexe contenant la cytokine fixée, en catalysant la formation d'un substrat coloré. L'intensité de coloration de ce dernier est proportionnelle à la quantité de cytokine en présence.

Les cytokines IL-8, IL-6, IL-1 α et GM-CSF du milieu de culture basal au contact des cellules ont été dosées à l'aide de kits de dosage ELISA (#DY208,#DY215,#DY201, #DY206, R&D Systems, France) qui contiennent ; une solution d'anticorps primaire, une solution standard, une solution d'anticorps secondaire biotinylé, une solution de streptavidine-peroxydase. Les solutions substrats (Substrat Solution#DY999, R&D Systems, France) et stop (Stop Solution#DY994, R&D Systems, France) sont vendues séparément.

Les autres réactifs nécessaires pour le dosage sont : la solution tampon phosphate salin de lavage (PBS#162323G5, Biosolve Chimie, France) à 0,05 % de Tween 20 (Tween 20#P2287, Sigma-Aldrich, France), la solution de tampon de saturation de PBS à 1 % d'albumine sérique bovine (BSA#A7906, Sigma-Aldrich, France), solution de tampon de dilution pour l'IL-8 de Trizma Base à 20 mM (Trizma base#T1503, Sigma, France), BSA à 0,1 %, NaCl à 150 mM (NaCl#S96251, Sigma-Aldrich, France) et 0,05 % de Tween 20.

Les concentrations en cytokines sont obtenues à partir de la courbe d'étalonnage reliant la DO à la concentration. Les concentrations sont exprimées en pg/ml. Les limites de quantification sont de 15,625 ; 7,81 ; 9,375 et 31,25 pg/ml respectivement pour GM-CSF, IL-1 α , IL-6 et IL-8.

II.4.5 Analyse histologique des épithéliums hRNE

- Inclusion en paraffine

Les épithéliums hRNE ont été inclus en paraffine afin de réaliser des coupes transversales de 4 μm , qui seront *in fine* colorées ou immunomarquées.

Plusieurs étapes sont nécessaires pour réaliser ces coupes transversales : la fixation, l'inclusion en paraffine et la coupe au microtome.

Les réactifs utilisés sont : Solution tampon phosphate salin (PBS#162323G5, Biosolve Chimie, France), Paraformaldéhyde à 32 % (PFA#15174, Euromedex), Ethanol (Ethanol absolu AnalaR

NORMAPUR#20821.2, VWR international), Xylène (Xylène Substitut#23410-10, Euromedex), Paraffine (Paraffine Paraplast Plus#06948430, VWR international), Azoture de sodium (Sodium Azide#S2002, Sigma-Aldrich, France).

La fixation des épithéliums hRNE est réalisée dans du PFA 4 % pendant 4 h après un rinçage de 10 min au PBS. Les membranes des inserts, contenant les épithéliums, ont ensuite été découpées au scalpel et rincées pendant 10 min au PBS, avant l'étape d'inclusion en paraffine.

L'inclusion en paraffine nécessite une première étape de déshydratation : les épithéliums hRNE sur membrane sont plongés dans de l'éthanol à 70 %, 95 % et 100 % puis dans du xylène pendant 1 h. Cette opération est reproduite deux fois. Les tissus sont ensuite déposés dans des bains successifs de paraffine liquide dans une étuve à 58°C : pendant 1 h, puis toute une nuit, puis une heure encore le lendemain, avant dépôt dans un moule en inox. Les moules sont placés pendant 3 h à température ambiante avant démoulage des blocs de paraffine et conservés à 4°C jusqu'à la découpe au microtome en sections de 4 µm d'épaisseur puis montage sur lames en vue des différentes colorations ou immunomarquages.

- Colorations de coupes transversales

Afin d'analyser la structure des épithéliums hRNE, des colorations sur coupes transversales sont réalisées. Des colorations standards sont effectuées afin d'identifier le noyau (Hémalum en solution de Mayer), le cytoplasme (Eosine) et le mucus (Bleu Alcian).

Les réactifs utilisés sont : Solution tampon phosphate salin (PBS#162323G5, Biosolve Chimie, France), Ethanol (Ethanol absolu AnalaR NORMAPUR®#20821.296, VWR international), Xylène (Xylène Substitut#23410-10, Euromedex), Bleu alcian (Bleu Alcian 8 GX#361180-0005, Coger, France), Acide acétique (acide acétique#1000631000, Merck, France), Hémalum en solution selon Mayer (Merck, France), Ammoniac (ammonia#QC1593, Sigma-Aldrich, France), Eosine (Eosin Y#230251, Sigma-Aldrich, France), Eukitt® (Eukitt® quick hardening mounting medium#03989, Sigma-Aldrich, France).

La coloration des coupes transversales nécessite une post-étape de réhydratation : les coupes sont plongées dans du xylène, de l'éthanol 100 % respectivement deux fois, puis dans de l'éthanol 95 %, de l'éthanol 70 % pendant 10 min. Différentes étapes de colorations se succèdent ; la coloration au bleu Alcian pendant 1 min, puis la coloration à l'Hémalum pendant 5 min et enfin la coloration à l'éosine (diluée au 1/100ème dans de l'acide acétique) pendant 1 min. Des étapes de rinçage à l'eau ou à l'eau ammoniacuée (0,5 %) ont lieu entre chaque coloration. Les lames sont ensuite déshydratées dans de l'éthanol 70 %, de l'éthanol 95 %, pendant 1 minute, puis dans de l'éthanol 100 % et du xylène respectivement deux fois pendant 1 minute. Les coupes sont ensuite montées avec une lamelle et une solution d'Eukitt®, puis séchées dans une étuve à 37°C pendant 2 h. Les coupes sont analysées à l'aide d'un microscope optique inversé (Automated Upright Microscope System with LED Illumination for Life Sciences - Leica DM4000 B LED).

- Immunomarquage sur coupes transversales : antigène Ki67

L'immunomarquage de l'antigène Ki67, présent sur la protéine nucléaire P46013 (360 kDa) dans le noyau des cellules prolifératives a été réalisé sur les coupes transversales.

Les réactifs utilisés sont : Solution tampon phosphate salin (PBS#162323G5, Biosolve Chimie, France), Ethanol (Ethanol absolu AnalaR NORMAPUR®#20821.296, VWR international), Xylène

(Xylène Substitut#23410-10, Euromedex), Acide citrique (Citric Acid#251275 Sigma-Aldrich, France), Glycine (Glycine#G7126, Sigma-Aldrich, France), Sérum de chèvre (goat serum#G9023, Sigma-Aldrich, France), BSA (Bovine Serum Albumin#G7126, Sigma-Aldrich, France), Triton (Triton®X-100#108643, Merck, France), Anticorps anti-Ki67 (Anti-Ki67 antibody #ab66155, Abcam, France), 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) (3,3'-Diaminobenzidine tablets# D4418, Sigma-Aldrich, France), Anti-Rabbit IgG ABC kit (VECTASTAIN® Universal# PK-6200, Vector Laboratories), Eukitt® (Eukitt® quick hardening mounting medium#03989, Sigma-Aldrich, France).

L'immunomarquage des coupes nécessite une post-étape de réhydratation : les lames sont plongées dans du xylène, de l'éthanol 100 % respectivement deux fois, puis dans de l'éthanol 95 %, de l'éthanol 70 % pendant 10 min. Les coupes sont ensuite démasquées à l'aide d'une solution tampon citrate (10 mM) à pH 6, pendant 20 min à 95°C. Un blocage des aldéhydes à la glycine (100 mM dans du PBS) pendant 20 min est ensuite réalisé après une étape de 3 rinçages au PBS pendant 5 min. Les sites non spécifiques sont bloqués à l'aide d'une solution de blocage contenant du sérum de chèvre 10 %, de la BSA 1 %, du triton 0,1 % et du PBS, pendant 30 min après deux rinçages pendant 10 min dans du PBS. Puis, les coupes sont incubées, pendant toute une nuit à 4°C à l'abri de la lumière, dans une solution d'anticorps anti-Ki67 diluée dans du PBS au 1/200^{eme}. Après une étape de rinçage, elles sont incubées pendant une heure à l'abri de la lumière dans une solution d'anticorps anti-IgG biotinyllé diluée au 1/200^{eme} dans du PBS, puis pendant 30 min dans une solution d'avidine (Avidin DH) et de peroxydase (Biotinylated Horseradish Peroxidase H) diluées dans du PBS à 0,05 % Triton selon les instructions du fabricant. Après 2 rinçages de 5 min au PBS, l'immunomarquage des coupes est révélé par une solution de 3'-Diaminobenzidine (DAB) et de H₂O₂ diluée dans du PBS selon les instructions du fabricant pendant 7 min. Les coupes sont ensuite rincées au PBS puis montées avec une lamelle et une solution d'Eukitt® et séchées à température ambiante pendant 2 h.

L'analyse est réalisée à l'aide d'un microscope optique inversé (Automated Upright Microscope System with LED Illumination for Life Sciences - Leica DM4000 B LED).

- Immunomarquages en partie apicale et microscopie confocale

L'utilisation d'immunomarquages détectables en fluorescence sur la partie apicale des épithéliums hRNE permet d'obtenir des informations complémentaires concernant la structure cellulaire.

Notre choix de marquage s'est porté vers :

- la β -tubuline, protéine présente dans les microtubules des cils des cellules ciliées,
- les filaments d'actine, constituants ubiquitaires du cytoplasme des cellules eucaryotes,
- les mucines (lectine WGA), glycoprotéines entrant dans la composition du mucus produit par les cellules muqueuses.

Les réactifs utilisés sont : Solution tampon phosphate salin (PBS#162323G5, Biosolve Chimie, France), Paraformaldéhyde à 32 % (PFA#15174, Euromedex), Glycine (Glycine#G7126, Sigma-Aldrich, France), Sérum de chèvre (goat serum#G9023, Sigma-Aldrich, France), BSA (Bovine Serum Albumin#G7126, Sigma-Aldrich, France), Triton (Triton®X-100#108643, Merck, France), Anticorps anti- β tubuline (Monoclonal Anti- β tubulin antibody produced in mouse#T4026, Sigma-Aldrich, France), Anticorps secondaire β tubuline (Gam-488) (Goat anti-Mouse IgG1 Secondary Antibody, Alexa Fluor® 488 conjugate#, A-21121, Invitrogen, (WI, USA)), WGA (Wheat Germ Agglutinin, Alexa Fluor® 633

conjugate, W21404, Invitrogen,(WI, USA)), Phalloïdine (Alexa Fluor® 555 Phalloïdin, A34055, Invitrogen, (WI, USA)), Glycérol (Glycerol#T3605, Sigma-Aldrich, France).

Avant la réalisation de l'immunomarquage, les fibroblastes humains se trouvant sous la membrane de l'insert sont retirés, afin d'identifier plus facilement la face où est positionné l'épithélium lors du montage. Toutes les incubations sont réalisées à température ambiante. Entre chaque étape, les tissus sont rincés trois fois au PBS pendant 10 min. Les épithéliums hRNE sont fixés dans du PFA 4 % pendant 30 min après une étape de rinçage au PBS pendant 10 min. La membrane des inserts où se trouvent les épithéliums est ensuite découpée puis placée dans un puits de plaque 24 puits.

Un blocage des aldéhydes à la glycine (100 mM dans du PBS) pendant 20 min est réalisé avant l'incubation des épithéliums hRNE dans la lectine WGA (dilué au 1/20^{ème} dans du PBS) pendant 20 min. Les sites non spécifiques sont bloqués à l'aide d'une solution de blocage contenant du sérum de chèvre 5 %, de la BSA 1 %, du triton 0,2 % et du PBS, pendant 30 min à l'abri de la lumière. Les tissus sont ensuite incubés pendant 2 h dans une solution d'anticorps primaire (Mouse anti- β tubuline au 1/200^{ème} dans du PBS), puis pendant 90 min dans une solution d'anticorps secondaire (Gam-488 dilué au 1/300^{ème} dans du PBS) à l'abri de la lumière. Les épithéliums hRNE sont ensuite incubés dans une solution de phalloïdine (diluée au 1/50^{ème} dans du PBS) pendant 20 min à l'abri de la lumière, puis montés entre lame et lamelle, et conservés à 4°C.

Ce montage est analysé en microscopie confocale à fluorescence afin d'identifier puis de quantifier les trois marqueurs choisis : β -tubuline, F-actine et mucus (WGA).

La microscopie confocale à fluorescence permet de réaliser des images à faible profondeur de champ. Le plan focal peut être déplacé à différents niveaux de profondeur le long de l'axe z, dans l'épaisseur des épithéliums hRNE. Ainsi plusieurs images peuvent être réalisées sur une même épaisseur permettant, par reconstitution informatisée, d'obtenir une représentation en trois dimensions de l'épaisseur du tissu observé. La partie apicale des épithéliums hRNE est observée au microscope confocale à fluorescence (Leica DM IRB) équipé d'un logiciel Leica software. Plusieurs images sont réalisées tous les 0,7 μ m (13 images en moyenne) sur une même épaisseur de 8 μ m. Les acquisitions sont effectuées dans les mêmes conditions : zoom 2, grossissement X400, longueurs d'onde d'émission (530 nm pour une excitation de 488 nm, 751 nm pour une excitation de 555 nm, 751 nm pour une excitation de 633 nm). Pour chaque condition, trois acquisitions sont réalisées.

- Quantification de l'intensité de fluorescence et comptage du nombre de cellules

Les images de microscopie confocale sont ensuite analysées et quantifiées en intensité de fluorescence à l'aide du logiciel ImageJ (version 1.48).

Au niveau de la partie apicale de l'épithélium hRNE, les cellules sont essentiellement muqueuses et ciliées. A l'aide du marquage de l'actine et des cellules muqueuses, le nombre de cellules totales et de cellules muqueuses est déterminé manuellement pour toutes les acquisitions. Le nombre de cellules ciliées est déduit par soustraction du nombre de cellules totales et de cellules muqueuses. Les résultats de quantification de l'intensité de fluorescence sont exprimés en intensité de fluorescence par cellule.

- Microscopie électronique à balayage en partie apicale

Afin d'apporter des informations complémentaires sur la structure de la partie apicale des épithéliums hRNE, une analyse en microscopie électronique à balayage est réalisée. Cette technique

permet de reproduire une image en haute résolution, à l'aide du principe d'interactions électrons-matière.

Les réactifs utilisés sont : NaCl 0,9 % (NaCl#5700, Minisol, France), CaCl₂ 1,25 mM (CaCl₂#21115, Sigma-Aldrich, France), Hépès 10mM (HEPES#15630-056, Invitrogen, France), Sodium cacodylate (Sodium cacodylate#70144, Sigma-Aldrich), Paraformaldéhyde à 32 % (PFA#15174, Euromedex), Glutaraldehyde (Glutaraldehyde solution#G5882, Sigma-Aldrich), Ethanol (Ethanol absolu AnalaR NORMAPUR®#20821.296, VWR international), Hexamethyldisilazane (Hexamethyldisilazane#440191, Sigma-Aldrich, France), Tétroxyde d'osmium (Osmium tetroxide#201030, Sigma-Aldrich), Acide chlorhydrique (Hydrochloric acid#H7020, Sigma-Aldrich, France), Oxyde de propylène ((±)- Propylene oxide# 471968, Sigma-Aldrich, France).

La préparation des échantillons nécessite une étape de fixation, de post-fixation, de déshydratation, puis de métallisation à l'or palladium.

Les épithéliums hRNE sont fixés dans une solution de cacodylate (p H 7,3 : PFA 2 %, GA 2,5 %, HCl 0,14 N, CaCl₂ 0,02 M, Caco 0,1 M) pendant 45 min à température ambiante après une étape de rinçage dans une solution stérile saline (NaCl 0,9 %, CaCl₂ 1,25 mM, Hépès 10 mM) trois fois 30 secondes. Puis, post-fixés dans 1 % de tétraoxyde d'osmium pendant 45 min à 4°C, et déshydratés par une série de dilution d'éthanol (30 %, 50 %, 70 % et enfin 95 % pendant 15 min puis éthanol 100 % deux fois 20 min) et dans une solution d'oxyde de propylène [éthanol 100 %/ Oxyde de propylène 100 % (v/v)] avant séchage à l'Hexaméthylidisilazane (HMDS), pendant 5 min. Ils sont ensuite découpés et déposés sur des plots pour analyse en microscopie électronique à balayage et séchés toute la nuit à température ambiante. Les plots sont alors déposés dans l'appareil (JFC-1300 autofine coater, JEOL), pour une pulvérisation cathodique à l'or palladium sous atmosphère d'Argon.

Les épithéliums ont ensuite été analysés au microscope électronique à balayage (JSM, JEOL) à l'aide du logiciel (Scanning Electron Microscope (SEM) control user interface V. 2.2.3.).

II.5 PROTOCOLES D'EXPOSITIONS

Le nombre de protocoles mis en œuvre au cours de ces travaux de thèse demande une description détaillée de chacun. Ces protocoles sont classés selon le type de modèle *in vitro*, et le type d'exposition.

Les éléments communs sont :

- L'intervalle entre l'ensemencement des cellules hAECN (96h) ou la réception des épithéliums hRNE (une semaine) et l'expérimentation,
- Les conditions d'exposition à une atmosphère, chargée ou non en polluant(s), après changement de milieu de culture,
- L'expérimentation en parallèle avec une atmosphère similaire mais sans polluant, et un contrôle sans sortie de l'incubateur,
- La mesure de marqueurs d'effets après l'exposition.

Les éléments variables sont :

- Le type de polluant,
- La durée de l'expérimentation, comptabilisée en jours ou en semaines,
- Le nombre, la durée de l'exposition, l'intervalle entre les expositions,
- Le type de marqueurs d'effets étudiés et l'intervalle après l'exposition pour leur étude.

II.5.1 Protocoles d'expositions dynamiques en interface air-liquide

- Expositions répétées des cellules hAECN (Protocole 1)

Après ensemencement des cellules hAECN sur membrane coatée ou non avec du collagène, les cellules sont exposées 1, 2 ou 3 fois à 24 h d'intervalle au formaldéhyde gazeux à la concentration de $200 \mu\text{g}/\text{m}^3$, pendant 1 h à un débit de 2 mL/min.

L'activité biologique a été évaluée par :

- le dosage des médiateurs de l'inflammation dans le milieu de culture, 72 h après exposition, et
- l'évaluation de la fonctionnalité et de la viabilité cellulaire, 72 h après exposition.

PROTOCOLE 1 – Expositions répétées des cellules hAECN en interface air-liquide. (x) Une exposition d'une heure.

Temps	0 h	24 h	48 h	72 h
1 exposition	x			
2 expositions	x	x		
3 expositions	x	x	x	
Activité biologique				VC, FC, RI

VC : Viabilité Cellulaire, FC : Fonctionnalité Cellulaire, RI : Réponse Inflammatoire

- Expositions répétées des épithéliums hRNE au formaldéhyde gazeux (Protocole 2)

Après réception, les épithéliums hRNE sont exposés pendant trois semaines au formaldéhyde gazeux ($200 \mu\text{g}/\text{m}^3$) sous un flux de 2 mL/min, 1, 2 ou 3 fois par semaine, à 24 h d'intervalle pendant 2 h.

Le prélèvement hebdomadaire des milieux de culture a permis d'évaluer l'activité biologique par :

- le dosage des médiateurs de l'inflammation, à 72h après la première exposition,
- l'évaluation de la viabilité cellulaire, 72 h après la première exposition,
- la mesure du TEER, 96 h après la première exposition.

PROTOCOLE 2 – Expositions répétées dynamiques des épithéliums hRNE à l'Air en interface air-liquide. (x) pour une exposition d'une heure à un débit de 2 mL/min.

Temps	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Trois expositions	x	x	x		
Activité biologique				RI / VC	Rm

RI : Réponse Inflammatoire, VC : Viabilité Cellulaire (LDH), Rm : Mesures TEER

- Expositions répétées des épithéliums hRNE aux composés organiques volatils (Protocoles 3-5)

Selon la peinture utilisée "récente" ou "ancienne", différents protocoles d'exposition ont été envisagés.

COV émis par la peinture "récente", aqueuse (Protocole 3)

Trois jours après génération de l'atmosphère chargée en COV, les épithéliums hRNE sont exposés à un flux de 2 mL/min, pendant 1 ou 2 h, une, deux ou trois fois par semaine à 24 h d'intervalle, pendant trois semaines.

L'activité biologique hebdomadaire a été évaluée par :

- le dosage des médiateurs de l'inflammation toutes les 24 h après la première exposition et,
- la mesure du TEER 96 h après la première exposition.

PROTOCOLE 3 – Expositions répétées dynamiques à des atmosphères chargées en COV générées à partir d'une peinture récente. (x) pour une exposition d'une heure ou de deux heures à un débit de 2 mL/min.

Temps	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Une exposition	X				
Deux expositions	X	X			
Trois expositions	X	X	X		
Activité biologique		RI	RI	RI	Rm

RI : Réponse Inflammatoire, Rm : Mesures TEER

COV émis par la peinture "ancienne", à base de solvants (Protocoles 4 et 5)

Trois jours après génération de l'atmosphère chargée en COV, les épithéliums hRNE ont été exposés à un flux de 2 mL/min, trois fois à 24 h d'intervalle pendant 1 ou 2 semaines.

L'activité biologique a été évalué par :

- le dosage des médiateurs de l'inflammation 72 h après la première exposition et,
- la mesure du TEER, 96 h après la première exposition.

PROTOCOLE 4 – Expositions répétées dynamiques des épithéliums hRNE en interface air-liquide. (x) pour une exposition d'une heure à un débit de 2 mL/min.

Temps	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Trois expositions	X	X	X		
Activité biologique				RI	Rm

RI : Réponse Inflammatoire, Rm : Mesures TEER

Trois jours après génération de l'atmosphère chargée en COV, les épithéliums hRNE ont été exposés à un flux de 2 mL/min, deux fois à 48 h d'intervalle pendant deux semaines.

L'activité biologique a été évaluée par :

- le dosage des médiateurs de l'inflammation toutes les 24 h et,
- la mesure du TEER, 96 h après la première exposition.

PROTOCOLE 5 – Expositions répétées dynamiques des épithéliums hRNE en interface air-liquide. (x) pour une exposition d'une heure à un débit de 2 mL/min.

Temps	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Deux expositions	X		X		
Activité biologique		RI	RI	RI	RI/Rm

RI : Réponse Inflammatoire, Rm : Mesures TEER

II.5.2 Protocole d'exposition statique en interface air-liquide des épithéliums hRNE (Protocole 6)

Ce protocole correspond aux expositions répétées des épithéliums hRNE à un mélange complexe de polluants – la fumée primaire de tabac. Après réception, les épithéliums hRNE sont exposés, pendant 5 ou 15 min, une ou deux fois par semaine à 48 h d'intervalle, à la fumée de tabac, et ce, pendant trois semaines.

L'activité biologique hebdomadaire a été évaluée par :

- le dosage des médiateurs de l'inflammation toutes les 24 h,
- la mesure du TEER, 96 h après la première exposition.
- l'analyse histologique des épithéliums hRNE, une semaine après la première exposition.

PROTOCOLE 6 – Expositions répétées en condition statique de 5 min à la fumée primaire de tabac (FT), une ou deux fois par semaine à 48 h d'intervalle pendant trois semaines.

Temps	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Une exposition	X				
Deux expositions	X		X		
Activité biologique	H	RI	RI	RI	RI/Rm

H : Histologie, RI : Réponse Inflammatoire, Rm : Mesures TEER

II.6 EXPRESSION DES RESULTATS ET ANALYSE STATISTIQUE

Les concentrations des cytokines sont exprimées en pg/mL et représentées sous forme soit d'un point équivalent à un épithélium hRNE, soit de la moyenne arithmétique avec l'écart-type associé. Les graphiques des expositions des épithéliums hRNE ont été réalisés à l'aide du logiciel GraphPad PRISM® (version 6.01). L'analyse statistique a été effectuée à l'aide du logiciel R (R version 2.11.1, www.r-project.org). L'analyse des différences entre deux moyennes a été réalisée à l'aide d'un test de Student ou par un test de Mann-Whitney-Wilcoxon, selon la normalité des expérimentations. Enfin, les différences entre les groupes ont été analysées à l'aide d'une analyse de variances ANOVA suivi d'un test de Bonferroni. Une différence significative est indiquée par * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$.

Troisième partie
Résultats & Discussion

III. 1 EXPOSITIONS DYNAMIQUES REPETEES DE CELLULES EPITHELIALES NASALES HUMAINES A UNE ATMOSPHERE MONO-POLLUANT.....	87
III.1. 1 Expositions répétées dynamiques en interface air-liquide d'une monocouche de cellules épithéliales nasales (hAECN).....	87
III.1.1.1 Conditions de culture des cellules hAECN sur membrane	87
III.1.1.2 Réponse des cellules hAECN à un stimulus pro-inflammatoire.....	89
III.1.1.3 Expositions répétées des cellules hAECN à l'Air en interface air-liquide	89
III.1.1.4 Contrôle des atmosphères de formaldéhyde gazeux.....	90
III.1.1.5 Expositions répétées dynamique des cellules hAECN au formaldéhyde gazeux	91
III.1. 2 Expositions répétées dynamiques en interface air-liquide d'épithéliums reconstitués humains hRNE.....	92
III.1.2.1 Choix du modèle d'épithélium hRNE.....	92
III.1.2.2 Epithélium hRNE provenant d'un seul donneur	93
III.1.2.3 Epithélium hRNE provenant d'un pool de 14 donneurs en co-culture ou non avec des fibroblastes.....	94
III.1.2.4 Comparaison des différentes reconstitutions d'épithélium hRNE	95
III.1.2.5 Caractérisation morphologique et histologique de l'épithélium hRNE	96
III.1.2.6 Expositions répétées dynamiques des épithéliums hRNE à l'Air.....	98
III.1.2.7 Expositions répétées dynamiques des épithéliums hRNR au formaldéhyde gazeux	99
III. 2 EXPOSITIONS REPETEES DES EPITHELIUMS RECONSTITUES HUMAINE D'ORIGINE NASALE A DES ATMOSPHERES MULTI-POLLUANTS.....	105
III.2.1 Profil qualitatif des atmosphères chargées en COV à l'ouverture des pots de peinture.....	105
III.2.2 Expositions répétées dynamiques à des atmosphères chargées en COV générées à partir de la peinture récente.....	107
III.2.3 Expositions répétées dynamiques à des atmosphères chargées en COV générée à partir de la peinture ancienne	108
III. 3 EXPOSITIONS REPETEES STATIQUES DES EPITHELIUMS HRNE A DES ATMOSPHERES COMPLEXES DE POLLUANTS : LA FUMEE PRIMAIRE DE TABAC.....	121
III.3.1 Contrôle de l'exposition à la fumée de tabac	121
III.3.2 Choix du temps d'exposition à la fumée primaire de tabac	121
III.3.3 Expositions répétées statiques des épithéliums hRNE à la fumée de tabac.....	122
III.3.4 Comparaison des expositions Air vs contrôle.....	123
III.3.5 Expositions répétées à la fumée primaire de tabac	123

Les résultats seront présentés en deux parties et seront suivis d'une discussion en italique, pour une meilleure compréhension de notre démarche expérimentale.

III. 1 EXPOSITIONS DYNAMIQUES REPETEES DE CELLULES EPITHELIALES NASALES HUMAINES A UNE ATMOSPHERE MONO-POLLUANT

Cette première partie des résultats comporte l'évaluation d'expositions répétées d'une atmosphère mono-polluant : le formaldéhyde gazeux généré à des concentrations environnementales sur des cellules épithéliales nasales humaines. Pour parvenir à cette évaluation, nous détaillerons la mise en place des deux modèles cellulaires employés, les cellules hAECN et l'épithélium reconstitué hRNE, puis nous vérifierons la faisabilité d'expositions dynamiques sur les cellules en comparant l'impact d'un flux d'air dynamique à de l'air statique, enfin nous présenterons les résultats de l'impact d'expositions répétées de formaldéhyde gazeux sur les cellules.

III.1. 1 Expositions répétées dynamiques en interface air-liquide d'une monocouche de cellules épithéliales nasales (hAECN)

III.1.1.1 Conditions de culture des cellules hAECN sur membrane

La mise en place des conditions de culture des cellules hAECN sur membrane a pour objectif d'exposer en interface air-liquide, une monocouche de cellules épithéliales au formaldéhyde gazeux, sans perte de viabilité et de fonctionnalité cellulaire.

Pour atteindre cet objectif, plusieurs paramètres en combinaison ont été définis :

- Les conditions initiales de culture des cellules hAECN,
- La densité d'ensemencement des cellules sur membrane, en présence ou non de collagène,
- Le temps de croissance des cellules sur membrane avant exposition.

Par ailleurs, lors d'essais préliminaires sur des cellules hAECN provenant de différents donneurs « sains », sans pathologies respiratoires, nous avons pu observer une grande variabilité de croissance des cellules. Cette variabilité a également été observée pour un même donneur, en fonction du temps de vieillissement cellulaire. Ainsi, afin de réduire cette variabilité expérimentale et standardiser les expérimentations, nous avons choisi de travailler avec des cellules provenant d'un seul donneur dont la variabilité de croissance était la plus faible et de réaliser toutes les expérimentations à un même temps de vieillissement cellulaire (passage 4).

- Ensemencement avec ou sans collagène

Dans un premier temps, deux densités d'ensemencement de cellules hAECN sur membrane, coatées ou non de collagène, ont été comparées : $5 \cdot 10^4$ et $5 \cdot 10^5$ cellules/mL.

On observe en microscopie optique, 24 h après ensemencement à une densité de $5 \cdot 10^4$ cellules/mL, une quantité importante de cellules rondes non adhérentes, identifiables par leurs contours blancs, en absence de collagène sur la membrane de l'insert, ce qui révèle une perte de viabilité cellulaire (Fig. 20a). En présence de collagène, la quantité plus importante de cellules adhérentes de forme allongée, souligne une bonne communication intercellulaire et une croissance cellulaire (Fig. 20b). Dans nos conditions, la présence de collagène semble augmenter l'adhérence et la croissance des cellules.

A une densité d'ensemencement de $5 \cdot 10^5$ cellules/mL en absence de collagène sur la membrane de l'insert, on observe un tapis cellulaire très hétérogène (Fig. 20c). *A contrario*, pour la même densité

d'ensemencement en présence de collagène un tapis cellulaire confluent et homogène présentant des cellules fusiformes et peu de cellules mortes, est observable 24 h après ensemencement (Fig. 20d).

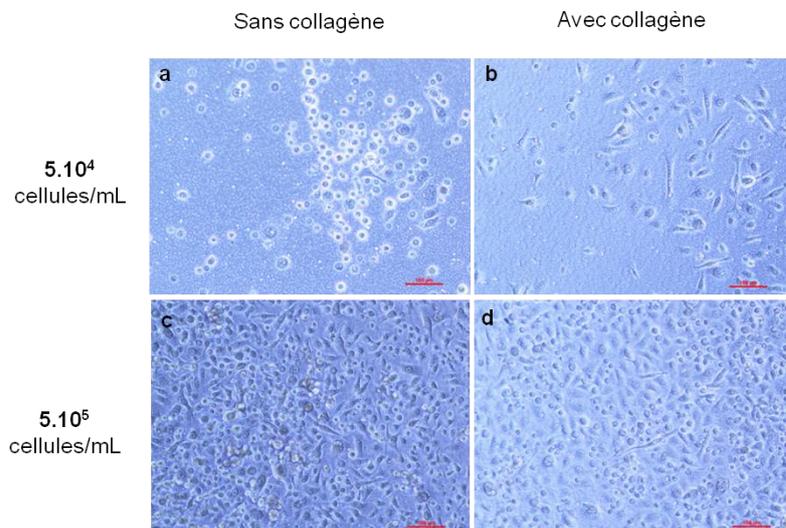


FIGURE 20 – Culture primaires cellules hAECN, 24 h après ensemencement à différentes densités, sans (a,c) et avec collagène (b, d). Photos prises en microscopie optique (X 100).

- Choix de la densité d'ensemencement des cellules hAECN

Les photos montrant les tapis cellulaires 24h après ensemencement indiquent que la densité d'ensemencement de 5.10^4 cellules/mL (Fig. 20b) est trop faible alors que celle de 5.10^5 cellules/mL (Fig. 20d) est trop forte, la confluence étant atteinte dès 24 h de culture. Pour la suite de notre travail, pour atteindre une confluence comprise entre 70-80 % avant le début des expositions, une densité d'ensemencement intermédiaire a été testée. L'évolution de la croissance cellulaire a été observée au microscope optique toutes les 24 h (Fig. 21).

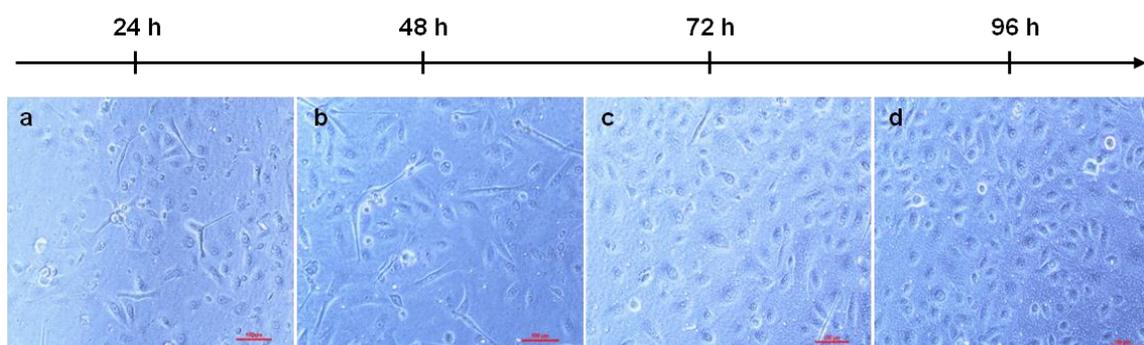


FIGURE 21 – Culture primaire de cellules hAECN, 24 h (a), 48 h (b), 72 h (c), 96 h (d) après ensemencement à une densité de 2.10^5 cellules/mL sur membrane coatée de collagène. Photos prises en microscopie optique (X100).

Ainsi, à la densité d'ensemencement de 2.10^5 cellules/mL une confluence comprise de 70-80 % est obtenue au bout de 96 h (4 jours) de culture sans perte de viabilité cellulaire. Ces conditions de culture sur membrane coatée de collagène IV permettent de constituer une monocouche cellulaire homogène pouvant supporter des expositions en interface air-liquide pendant plusieurs jours.

Pour parfaire la mise en place de ce modèle *in vitro*, nous avons souhaité tester la capacité des cellules hAECN à réagir à un stimulus pro-inflammatoire (TNF α), en mesurant la production de médiateurs de l'inflammation.

III.1.1.2 Réponse des cellules hAECN à un stimulus pro-inflammatoire

La réactivité des cellules hAECN a été évaluée par stimulation des cellules, 96 h après ensemencement et durant 72 h en condition submergée, à l'aide de trois concentrations différentes de TNF α : 2, 50 et 100 ng/mL. La viabilité cellulaire ainsi que la sécrétion des médiateurs de l'inflammation IL-8, IL-6, IL-1 α et GM-CSF ont été évaluées à la fin de l'expérimentation.

On observe une perte de fonctionnalité cellulaire de plus de 60 % après exposition des cellules à 100 ng/mL de TNF α , par rapport au contrôle sans stimulation au TNF α . Cette perte de viabilité n'a pas été observée pour les concentrations de 2 et 50 ng/mL. A la concentration de 50 ng/mL seulement, les productions en IL-8 et IL-6 sont significativement plus fortes par rapport au contrôle ($p < 0,001$) (Tab.VI). Les valeurs d'IL-1 α et de GM-CSF n'étaient jamais quantifiables.

TABLEAU VI – Production en médiateurs de l'inflammation (IL-8 et IL-6) dans le milieu de culture, des cellules hAECN sur membrane, en présence ou en absence de TNF α 50 ng/mL.

	IL-8 (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
Contrôle	799 \pm 353	77 \pm 26
TNF α (50 ng/mL)	1468 \pm 283***	386 \pm 45***

*** $p < 0,001$ vs Contrôle. Moyenne \pm écart-type (N=5, en triplicat).

Les cellules hAECN dans les conditions de culture choisies (densité, culture sur collagène, durée) ont donc la capacité de répondre à un stimulus inflammatoire.

III.1.1.3 Expositions répétées des cellules hAECN à l'Air en interface air-liquide

L'étape suivante de cette mise en place a été l'étude de l'impact d'un flux d'Air dynamique et répété sur les cellules hAECN. Pour cela, nous avons comparé des expositions en interface air-liquide dynamiques et répétées à l'Air via le dispositif d'exposition Vitrocell® (Air avec flux) à des expositions répétées à l'air statique de l'incubateur (Air sans flux) des cellules hAECN. L'exposition dynamique a été réalisée à un débit d'air de 2 mL/min, mais pour les deux conditions, les expositions ont duré une heure et ont été répétées jusqu'à trois fois à 24 h d'intervalle (N = 5, en triplicat) (Protocole 1).

PROTOCOLE 1 – Expositions répétées des cellules hAECN en interface air-liquide. (x) Une exposition d'une heure.

Temps	0 h	24 h	48 h	72 h
1 exposition	x			
2 expositions	x	x		
3 expositions	x	x	x	
Activité biologique				VC, FC, RI

VC : Viabilité Cellulaire, FC : Fonctionnalité Cellulaire, RI : Réponse Inflammatoire

- Médiateurs de l'inflammation

Une absence de différence significative dans la production en IL-8 et IL-6 a été observée entre l'exposition à l'Air avec flux (Air dynamique) et l'Air sans flux (Air contrôle), pour 1, 2 ou 3 expositions (Tab. VII). Les médiateurs de l'inflammation IL-1 α et GM-CSF n'étaient pas quantifiables quelles que soient les conditions d'exposition. Nous n'évoquerons plus ces marqueurs d'effet concernant les monocouches de cellules hAECN dans la suite de ce manuscrit.

TABLEAU VII – Production en IL-8 et IL-6 dans le milieu de culture par les cellules hAECN exposées à l’Air avec flux (Air dynamique) ou sans flux (Air contrôle), pour 1, 2 ou 3 expositions à 24 h d’intervalle (N=5, triplicat).

Expositions	1 exposition		2 expositions		3 expositions	
	Air dynamique	Air contrôle	Air dynamique	Air contrôle	Air dynamique	Air Contrôle
IL-8 (pg/ mL)	674 ± 129	664 ± 194	592 ± 169	578 ± 103	593 ± 191	639 ± 194
IL-6 (pg/ mL)	111 ± 56	76 ± 34	119 ± 60	94 ± 51	116 ± 45	107 ± 31

- Intégrité cellulaire

Les résultats de la production en médiateurs de l’inflammation, ont été corrélés à l’observation d’une absence de perte de viabilité et de fonctionnalité cellulaire jusqu’à trois expositions à 24 h d’intervalle pour l’Air dynamique par rapport à l’Air contrôle.

En conclusion, l’Air dynamique arrivant au contact cellules hAECN, durant 1 h et de façon répétée, n’impacte ni l’intégrité cellulaire ni la sécrétion en IL-8 et IL-6 par rapport à des expositions répétées à l’Air en absence de flux. Pour la suite de ces travaux, lors d’expositions à une atmosphère chargée en polluant, les expositions à l’Air dynamique seront donc considérées comme contrôle.

Ces premiers résultats ont permis de mettre en place un modèle de culture primaire de cellules épithéliales nasales humaines hAECN sur collagène, ainsi qu’un protocole d’expositions répétées en interface air-liquide (Protocole 1) que nous allons appliquer à une atmosphère gazeuse mono-polluante : le formaldéhyde. Préalablement à cette application, l’atmosphère de formaldéhyde générée pour ces expérimentations a été contrôlée en collaboration avec le pôle RIME de l’Ecole des Mines d’Alès.

III.1.1.4 Contrôle des atmosphères de formaldéhyde gazeux

Les atmosphères chargées de formaldéhyde gazeux (disponibles en bouteille), ne sont pas commercialisées en France. Aussi, pour exposer nos cellules à des concentrations proches de celles mesurées dans l’environnement, nous avons du d’une part générer l’atmosphère, et d’autre part contrôler cette génération afin de connaître les concentrations réelles d’exposition des cellules.

La génération d’atmosphère chargée en formaldéhyde avec notre dispositif de génération d’atmosphère (chambre en verre de 11 L) a été validée en comparant notre dispositif au système ayant permis la calibration pour le dosage (un banc à perméation de formaldéhyde gazeux relié à une chambre en verre de 50 L). Différentes concentrations théoriques de formaldéhyde gazeux (90, 180 et 360 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) générées (N=3) avec notre dispositif ont été dosées. Les résultats sont présentés dans le tableau VIII, les chromatogrammes correspondants figurent dans l’annexe D.

Nous observons que les concentrations mesurées sont inférieures aux concentrations théoriques : plus la concentration théorique est forte, plus le rendement est faible. Ce résultat est probablement dû à un phénomène d’adsorption du formaldéhyde sur les parois du dispositif. Toutefois, le coefficient de corrélation calculé entre les concentrations théoriques et mesurées est de l’ordre de 0,9961. De plus, le coefficient de variation pour une même concentration de formaldéhyde générée trois fois est inférieur à 10 %, ce qui est acceptable en terme reproductibilité des expérimentations. Un contrôle de l’air ambiant a été effectué et la concentration en formaldéhyde mesurée était de 40 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, valeur proche de celle rencontrée dans des investigations environnementales internationales. Il est à préciser que lors des expérimentations, la génération des atmosphères a été réalisée à partir de l’air provenant d’un Poste de Sécurité Microbiologique (PSM), car exempt de contaminants microbiologiques.

TABLEAU VIII – Comparaison des concentrations théoriques et mesurées du formaldéhyde gazeux des atmosphères générées dans le dispositif de génération d'atmosphère du laboratoire (N=3).

Concentrations théoriques ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Concentrations mesurées ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Rapport concentration mesurée / concentration théorique (%)
$d_1 = 360$	175 ± 2	49
$d_2 = 180$	103 ± 9	57
$d_3 = 90$	66 ± 5	73
Contrôle Air	40 ± 25	-

III.1.1.5 Expositions répétées dynamiques des cellules hAECN au formaldéhyde

A la suite de ces dosages, le protocole d'expositions répétées des cellules hAECN (Protocole 1) a été appliqué à une concentration approximant $200 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de formaldéhyde gazeux.

- Médiateurs de l'inflammation

Après trois expositions au formaldéhyde gazeux, uniquement, la production en IL-8 est significativement plus faible ($p < 0,05$) que celle mesurée après exposition à l'Air dynamique dans les mêmes conditions. Les niveaux d'IL-6 quant à eux ne varient pas d'une condition d'exposition à l'autre (Air *versus* formaldéhyde), quel que soit le nombre d'expositions (Fig. 22).

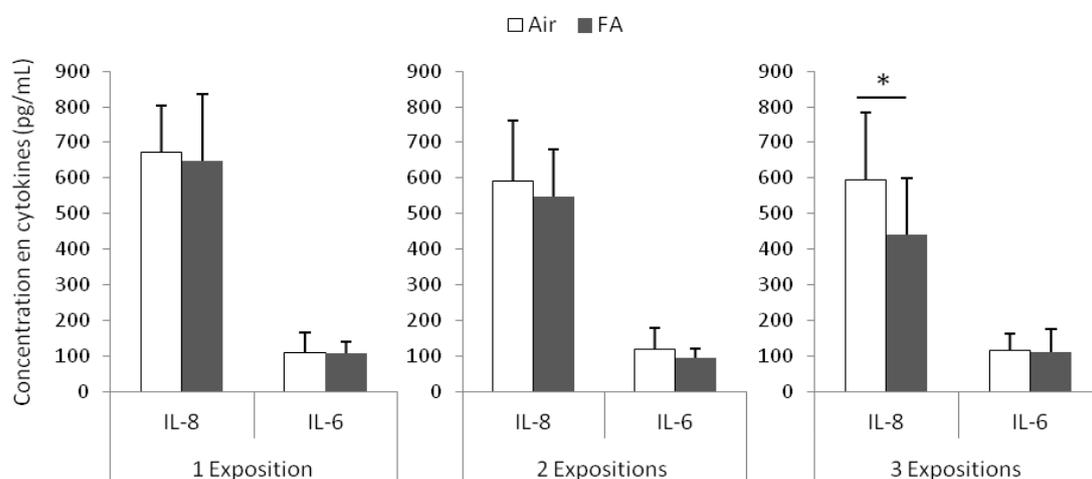


FIGURE 22 – Production en médiateurs de l'inflammation (IL-8, IL-6) après 1, 2, ou 3 expositions à 24 h d'intervalle au formaldéhyde ($200 \mu\text{g}/\text{m}^3$) ou à l'Air. (N=5, en triplicat), * $p < 0,05$ vs Air (Protocole 1).

- Intégrité cellulaire

Aucune perte de viabilité et de fonctionnalité cellulaire n'a été observée 72 h après 1, 2 ou 3 expositions dynamiques au formaldéhyde, par rapport l'Air dynamique (Fig. 23).

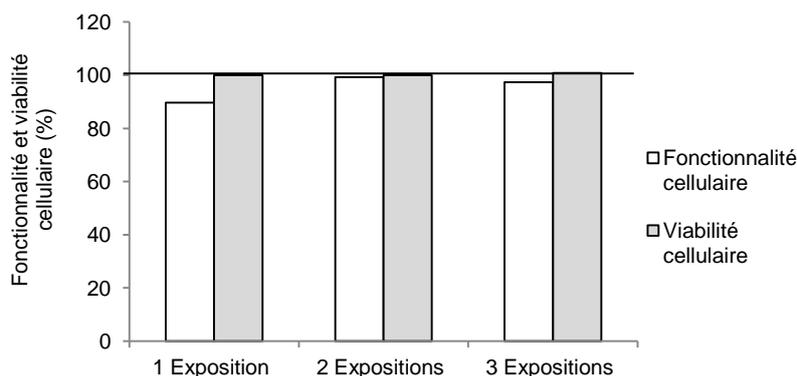


FIGURE 23 – Intégrité cellulaire pour 1, 2 ou 3 expositions au formaldéhyde gazeux ($200 \mu\text{g}/\text{m}^3$) par rapport à l'Air (N=5, en triplicat).

Au terme de ces premiers travaux, nous avons mis en place un protocole d'expositions répétées en interface air-liquide de cellules hAECN, que nous avons appliqué à un polluant ubiquitaire de l'air intérieur le formaldéhyde gazeux ($200 \mu\text{g}/\text{m}^3$). L'intégrité cellulaire conservée, tend à conforter notre démarche expérimentale. L'exposition au formaldéhyde gazeux dans nos conditions ne produit pas de réaction inflammatoire. A l'inverse, un effet inhibiteur de la production en cytokine IL-8 seulement après trois expositions à 24 h d'intervalle est observé.

L'utilisation de cellules en culture primaire pour réaliser ces expositions répétées dans nos conditions limite néanmoins la durée des expérimentations au-delà de trois expositions par jours à 24 h d'intervalle, temps nécessaire pour atteindre une confluence maximale. C'est pourquoi nous avons choisi d'étudier un modèle cellulaire plus pertinent : des épithéliums reconstitués en interface air-liquide à partir de cellules épithéliales humaines nasales, afin de poursuivre l'étude d'expositions répétées sur une plus longue période de temps.

Dans la suite de ce travail, nous présenterons les résultats de caractérisation de l'épithélium reconstitué hRNE ainsi que l'impact d'une atmosphère mono-polluante, en reprenant le cas du formaldéhyde, sur la réponse inflammatoire de ce modèle *in vitro*.

III.1.2 Expositions répétées dynamiques en interface air-liquide d'épithéliums reconstitués humains hRNE

III.1.2.1 Choix du modèle d'épithélium hRNE

Dans le cadre de ces travaux, nous avons utilisé des modèles d'épithéliums « prêts à l'emploi », reconstitués à partir de cellules hAECN, commercialisés par la société Epithelix®. Différents épithéliums reconstitués étaient disponibles et afin de privilégier *in fine* le modèle le plus adapté à nos objectifs, nous avons étudié au préalable plusieurs configurations qui se déclinent selon :

- le nombre de donneurs : un seul donneur (mono-donneur, D) ou un pool de quatorze donneurs (multi-donneurs, MD) ou,
- la construction de l'épithélium (en co-culture ou non avec des fibroblastes humains déposés sur la membrane de l'insert du côté opposé aux cellules épithéliales (HF-MD)).

Un suivi des différents épithéliums hRNE dans l'incubateur en interface air-liquide, a été réalisé. Une semaine après réception, les épithéliums ont été suivis pendant trois semaines et les milieux de culture ont été renouvelés tous les deux à trois jours. L'évaluation a porté sur :

- Le dosage des cytokines produites (IL-8, IL-6 et GM-CSF) dans le milieu de culture pendant 72 h, une semaine après réception
- La mesure hebdomadaire de la résistance membranaire (TEER)
- Le contrôle hebdomadaire de l'état des épithéliums en partie apicale.

III.1.2.2 Epithélium hRNE provenant d'un seul donneur

Au cours de ces travaux, nous avons eu l'occasion d'étudier en parallèle cinq épithéliums hRNE provenant de 5 donneurs différents (D1 à D5).

Médiateurs de l'inflammation

Les niveaux de production en cytokines (IL-8, IL-6 et GM-CSF) montrent une variabilité importante d'un donneur à l'autre : les valeurs les plus fortes sont observées pour le donneur 4 (D4), celles-ci tranchent fortement avec les valeurs les plus faibles observées pour le donneur 2 (D2) (Fig. 24).

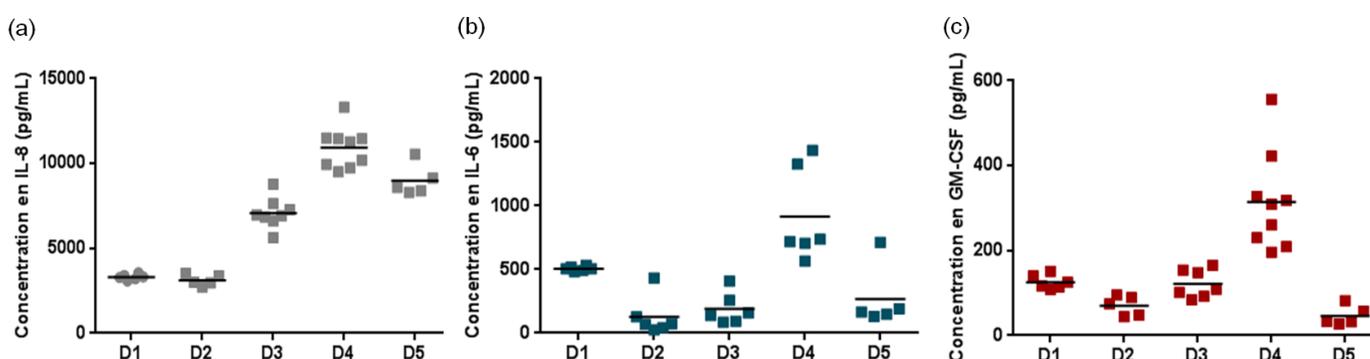


FIGURE 24 – Médiateurs de l'inflammation (IL-8, IL-6, GM-CSF), dans le milieu de culture produits par les épithéliums reconstitués hRNE de cinq donneurs différents (D1, D2, D3, D4, D5) Les barres noires correspondent à la moyenne arithmétique des points pour chaque condition (N=1, cinq inserts minimum par donneur).

Résistance membranaire

Les valeurs TEER mesurées pendant trois semaines, montrent une variabilité inter-donneur importante pour une même semaine (60 %) ainsi qu'une différence de niveau au cours des semaines pour un même donneur. Les valeurs comprises entre 272 ± 36 et $672 \pm 59 \Omega/\text{cm}^2$ restent dans la limite définissant une bonne intégrité tissulaire (Fig. 25).

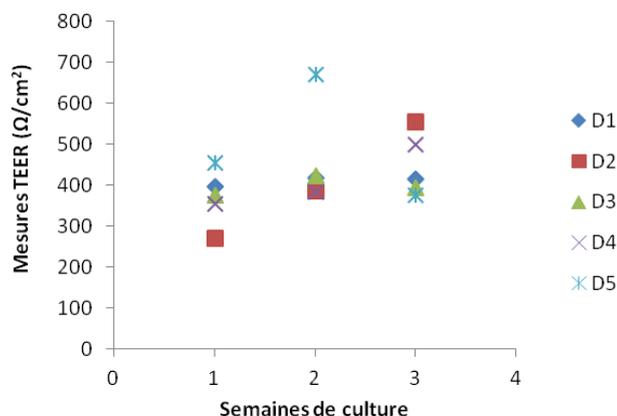


FIGURE 25 – Mesures de la résistance membranaire (TEER) hebdomadaire pendant 3 semaines des épithéliums hRNE de 5 donneurs (D1, D2, D3, D4, D5) (N=1; triplicat).

Aucune perte de résistance membranaire et donc d'intégrité tissulaire n'est observée pendant ces trois semaines de culture. L'observation hebdomadaire en microscopie optique de la partie apicale des épithéliums confirme l'homogénéité tissulaire au cours des trois semaines.

En conclusion, la très forte variabilité inter-donneur observable nous a conduits à tester les épithéliums hRNE reconstitués à partir d'un pool de 14 donneurs (MD).

III.1.2.3 Épithéliums hRNE provenant d'un pool de 14 donneurs en co-culture ou non avec des fibroblastes

Le même pool de 14 donneurs a été utilisé pour reconstruire les deux types d'épithéliums, en co-culture (HF-MD) ou non (MD) avec des fibroblastes humains.

Médiateurs de l'inflammation

La production des médiateurs de l'inflammation IL-8 et IL-6 est comparable entre les épithéliums MD et HF-MD, alors que la production de GM-CSF de l'épithélium MD est très augmentée par rapport à celle de HF-MD (Fig. 26).

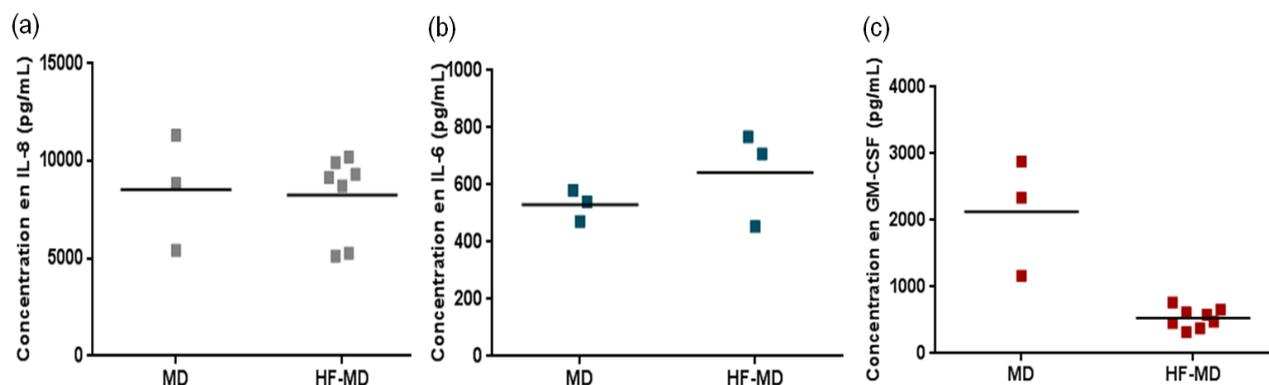


FIGURE 26 – Production en médiateurs de l'inflammation (IL-8, IL-6 et GM-CSF) par les épithéliums hRNE reconstitués à partir d'un pool de 14 donneurs différents en co-culture (HF-MD) ou non (MD) avec des fibroblastes humains. Les barres noires correspondent à la moyenne arithmétique des points pour chaque condition (N=1, Trois inserts minimum par condition).

Résistance membranaire

Lorsqu'on compare les différentes valeurs de mesures TEER hebdomadaires entre les deux épithéliums, MD et HF-MD, on observe une baisse de la résistance membranaire des épithéliums MD, à la troisième semaine de culture. Ces résultats sont à mettre en relation avec l'observation de plages vides en partie apicale des épithéliums (MD), la troisième semaine de culture (Fig. 27a&b).

La co-culture des épithéliums hRNE multi-donneurs (MD) avec des fibroblastes humains (HF-MD) permet un maintien en culture et une homogénéité tissulaire sur une période de temps plus longue qu'en absence de fibroblastes, trois semaines au moins dans nos conditions. Au terme de ces résultats, nous avons poursuivi nos expérimentations avec le modèle (HF-MD). Il est à préciser qu'il a été convenu avec le fournisseur que les épithéliums seraient toujours reconstitués avec le même lot de cellules primaires nasales épithéliales humaines issues du pool de 14 donneurs, et qu'ils seraient envoyés après 48 jours, soit au terme de leur reconstitution.

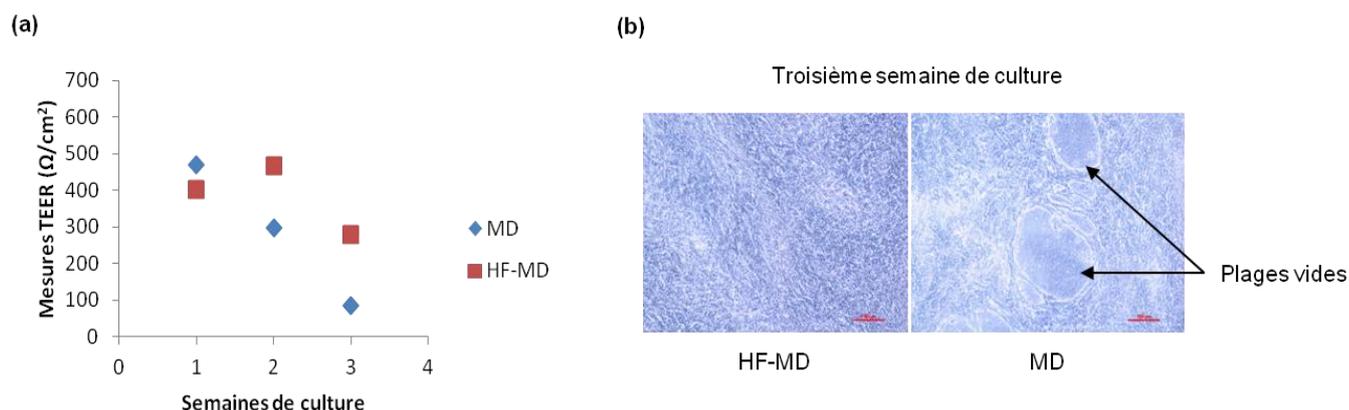


FIGURE 27 – Comparaison des épithéliums hRNE avec (HF-MD) ou sans fibroblastes humains (MD) (a) Mesures TEER (Ω/cm^2) hebdomadaires pendant trois semaines (N=1, triplicat) (b) Photos en microscopie optique (X100) de la partie apicale des épithéliums (HF-MD et MD) à la troisième semaine de culture.

Avant d'exposer ce modèle d'épithélium de façon répétée aux polluants gazeux, nous avons souhaité vérifier l'absence de variabilité en matière d'activité biologique sur plusieurs reconstitutions.

III.1.2.4 Comparaison de différentes reconstitutions d'épithéliums hRNE multidonneurs en co-culture avec fibroblastes humains

Trois reconstitutions d'épithéliums effectuées à des temps différents ont été envisagées (R1, R2, R3). Dans l'objectif de comparer la variabilité de l'activité biologique, les milieux de culture ont été récupérés tous les 24 h une semaine après réception, pendant trois semaines et une mesure de la résistance membranaire (TEER) a été effectuée toutes les semaines, tout comme le contrôle de l'état des épithéliums en microscopie optique.

Médiateurs de l'inflammation

La production journalière moyenne des cytokines (IL-8, IL-6 et GM-CSF), au cours des trois semaines de culture, pour trois reconstitutions indépendantes (R1, R2 et R3) varie, mais reste toutefois dans les mêmes ordres de grandeur (Fig. 28).

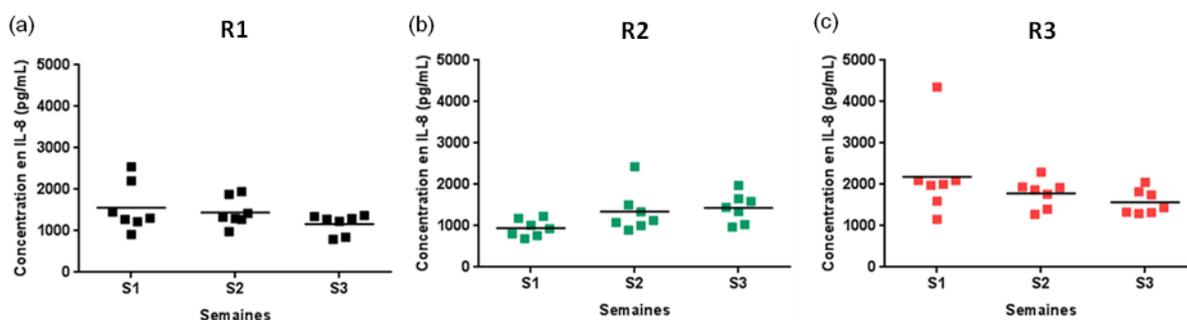


FIGURE 28 – Sécrétion journalière en médiateurs de l'inflammation (IL-8) pendant 3 semaines. R1, R2, R3 correspondent à trois reconstitutions indépendantes. Les barres noires correspondent à la moyenne arithmétique des points pour chaque condition (N=1, sept inserts par reconstitutions).

Au regard de la variabilité intra-expérimentation, les variations sont plus importantes pour les valeurs d'IL-6 et GM-CSF, que pour l'IL-8. Les valeurs d'IL-8 sont présentées dans la figure 28. Ce bio-marqueur d'effet de la réponse inflammatoire, sera donc privilégié dans la suite de notre travail.

Résistance membranaire

Les valeurs TEER hebdomadaires suivies pendant trois semaines pour les reconstructions ne varient pas et restent dans les valeurs indiquant une bonne intégrité tissulaire : 453 ± 36 , 301 ± 71 et 320 ± 15 (Ω/cm^2), respectivement pour la 1^{ère}, 2^{ème} et 3^{ème} reconstitution (R1, R2, R3). L'observation hebdomadaire en microscopie optique de la partie apicale des épithéliums confirme l'homogénéité tissulaire au cours des trois semaines.

L'ensemble de ces résultats indique qu'il existe une variabilité de reconstitution dont il faudra tenir compte dans l'interprétation des résultats.

III.1.2.5 Caractérisation morphologique et histologique de l'épithélium hRNE

Différentes techniques de microscopie ont été employées pour caractériser la structure morphologique de ce modèle *in vitro* : la microscopie optique, la microscopie confocale à fluorescence et la microscopie électronique à balayage. Les différentes images de l'épithélium hRNE sont présentées dans la figure 30.

Les observations en **microscopie optique** et en **microscopie électronique à balayage** de la partie apicale des épithéliums hRNE montrent la présence de mucus et de cils permettant des battements ciliaires réguliers (Fig. 30d). Les **colorations** (Hemalun - Eosine, Bleu Alcian) des coupes transversales de l'épithélium hRNE (Fig. 30b) permettent dans un premier temps, d'estimer l'épaisseur totale moyenne de l'épithélium à $30 \mu\text{m}$ (de la partie apicale à la membrane poreuse de l'insert), puis dans un deuxième temps, de localiser les différents types cellulaires présents au sein de l'épithélium. Les cellules ciliées et muqueuses sont plutôt localisées en partie apicale alors que les cellules basales sont situées proche de la membrane poreuse de l'insert. Les fibroblastes quant à eux, sont situés sur la membrane poreuse de l'insert à l'opposé des cellules basales.

Afin, les **immunomarquages** de la partie apicale réalisés sur une épaisseur de $8 \mu\text{m}$ et analysés par **microscopie confocale à fluorescence**, permettent de visualiser en partie apicale : les cellules ciliées (β -tubuline), les cellules sécrétrices de mucus (marquage du mucus par WGA), et d'observer l'état du cytosquelette (F-Actine). Ces observations ont permis d'estimer par comptage (cellules sécrétrices de mucus et cellules totales) entre 1/3 et 1/4, la proportion de cellules muqueuses et cellules ciliées dans la partie apicale sélectionnée (Fig. 30c). Une quantification de l'intensité de fluorescence par cellule des immunomarquages en partie apicale de l'épithélium hRNE a également été réalisée (Fig. 29).

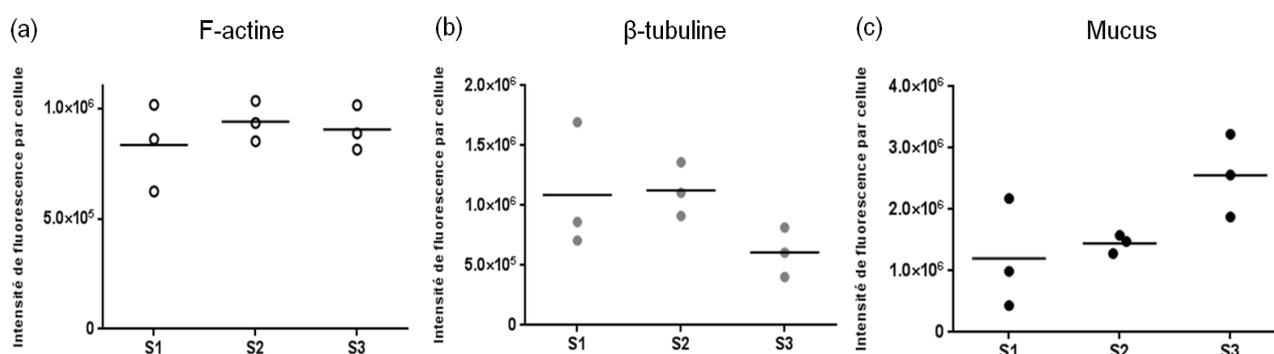


FIGURE 29 – Quantification de l'intensité de fluorescence par cellule des immunomarquages en partie apicale des épithéliums hRNE : F-Actine (a), β -tubuline (b) et mucus (c). Les barres noires correspondent à la moyenne.

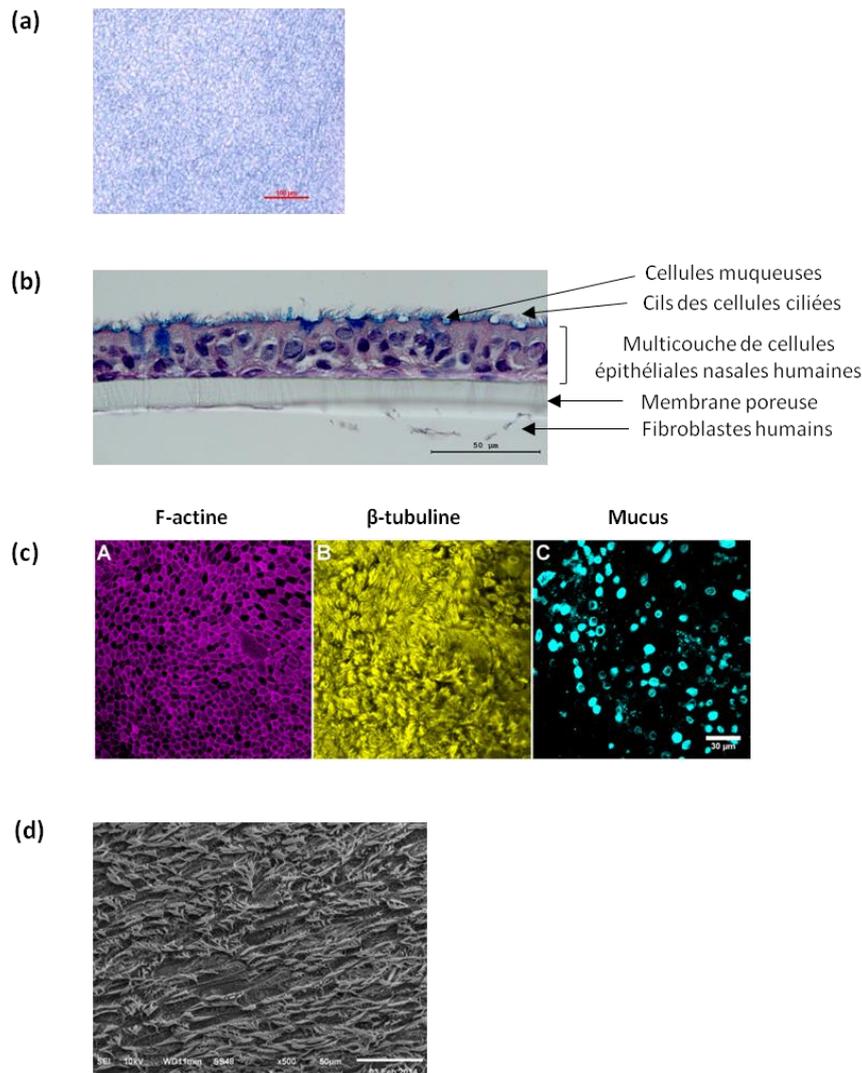


FIGURE 30 – Caractérisation histologique de l'épithélium hRNE. Photos de (a) la partie apicale en microscopie optique (X100) ; (b) la coupe transversale après colorations à l'Hemalun - Eosine et Bleu Alcian – Microscopie optique (x400), échelle de 50 μm ; (c) les immunomarquages en partie apicale. (A) Cytosquelette : F-Actine, (B) Cils des cellules ciliées : β -tubuline et (C) mucus : WGA – Microscopie confocale à fluorescence, échelle de 30 μm . (d) la partie apicale – Microscopie électronique à balayage (X500).

Les valeurs d'intensité de fluorescence par cellule pour la F-Actine (cytosquelette) et la β -tubuline (cils des cellules ciliées), semblent relativement stables pendant les trois semaines de culture. Une diminution de l'intensité de la β -tubuline est toutefois observable pour la troisième semaine. En ce qui concerne l'intensité de fluorescence par cellule pour le mucus, celle-ci est très variable d'une semaine à l'autre de culture, cette observation semble liée à la répartition hétérogène du mucus au sein du l'épithélium hRNE.

Si l'étude de l'épithélium hRNE a été réalisée seulement pendant trois semaines, nous avons pu les maintenir en culture pendant deux mois sans modification visible de la partie apicale en microscopie optique.

La longévité de ce modèle en culture ainsi que la présence de cellules ciliées, muqueuses et basales et de fibroblastes humains aidant à maintenir l'épithélium en interface air-liquide, nous a conduits à utiliser ce modèle pour poursuivre nos expérimentations. Préalablement aux expositions au formaldéhyde gazeux, nous avons cherché à évaluer l'impact d'expositions répétées dynamiques à l'Air sur l'épithélium hRNE.

III.1.2.6 Expositions répétées dynamiques des épithéliums hRNE à l'Air

Les expositions répétées dynamiques durant 1 h en interface air-liquide ont été réalisées *via* le dispositif d'exposition Vitrocell®. Le protocole 2 a été suivi et répété pendant 3 semaines.

PROTOCOLE 2 – Expositions répétées dynamiques des épithéliums hRNE à l'Air en interface air-liquide. (x) pour une exposition d'une heure à un débit de 2 mL/min.

Temps	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Trois expositions	x	x	x		
Activité biologique				RI / VC	Rm

RI : Réponse Inflammatoire, VC : Viabilité Cellulaire (LDH), Rm : Mesures TEER

Les résultats présentés sous forme de nuage de points, sont regroupés sur la figure 31.

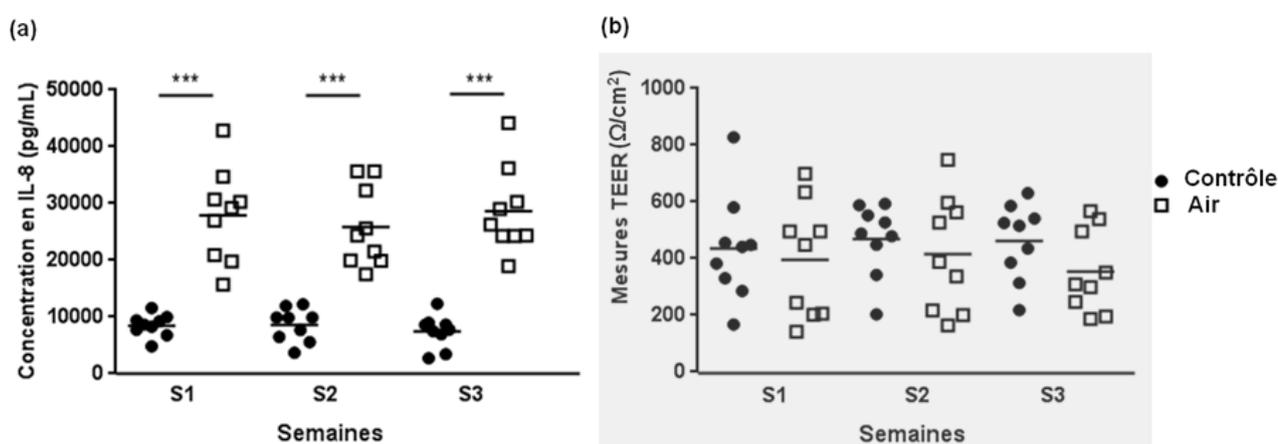


FIGURE 31 – Exposition dynamique (Air) et statique (Contrôle) à l'Air des épithéliums hRNE en interface air-liquide pendant 3 semaines (S1, S2, S3) (a) Production en IL-8 (b) Mesures TEER. Les barres noires correspondent à la moyenne arithmétique des points pour chaque condition (N=3 ; triplicat). ***p < 0,001 (Contrôle vs Air).

Médiateurs de l'inflammation

Nous avons pu observer une dispersion des niveaux de sécrétion d'IL-8, 72 h après la première exposition, des épithéliums hRNE lorsqu'ils sont soumis à une exposition dynamique à l'air (Air) en comparaison avec ceux maintenus en interface air-liquide à l'incubateur (Contrôle). On observe une valeur significativement plus élevée de l'IL-8 ($p < 0,001$) après exposition à l'air dynamique (Air) en comparaison avec l'air statique (Contrôle) (Fig. 31a).

Résistance membranaire

Les mesures TEER ne montrent aucune altération de l'intégrité tissulaire des épithéliums tout au long des semaines, quel que soit le type d'exposition à l'air (Fig. 31b).

Ces résultats nous indiquent que des expositions répétées appliquées en mode dynamique, c'est à dire avec un flux dont le débit est fixé à 2 mL/min (Air dynamique) ne perturbent pas l'intégrité tissulaire des épithéliums hRNE, c'est à dire les jonctions serrées et les flux ioniques, mais impactent significativement la sécrétion en médiateurs de l'inflammation, comparé à une exposition statique à l'air. Pour la suite des expérimentations, les expositions à l'air en interface air-liquide dans des conditions dynamiques seront prises comme Contrôle et permettront de comparer les expositions aux atmosphères chargées en polluant(s), appliquées dans les mêmes conditions.

III.1.2.7 Expositions répétées dynamiques des épithéliums hRNE au formaldéhyde gazeux

Les épithéliums hRNE ont été exposés à une atmosphère chargée en formaldéhyde à $200 \mu\text{m}^3$. Le protocole 2 a été suivi et répété pendant 3 semaines. Une seule différence est notable, le temps d'exposition de 2 h. Les résultats sont regroupés sur la figure 32.

Médiateurs de l'inflammation

Comme indiqué dans la figure l'exposition au formaldéhyde gazeux ne produit pas de variation significative de la production d'IL-8 au cours du temps en comparaison avec le contrôle Air (Fig. 32a). Les productions d'IL-6 et de GM-CSF ne montrent, également, aucune variation.

Résistance membranaire

De même, quelles que soient les conditions d'expositions, les valeurs TEER n'indiquent pas de modification de l'intégrité tissulaire pour chaque semaine d'exposition (Fig. 32b).

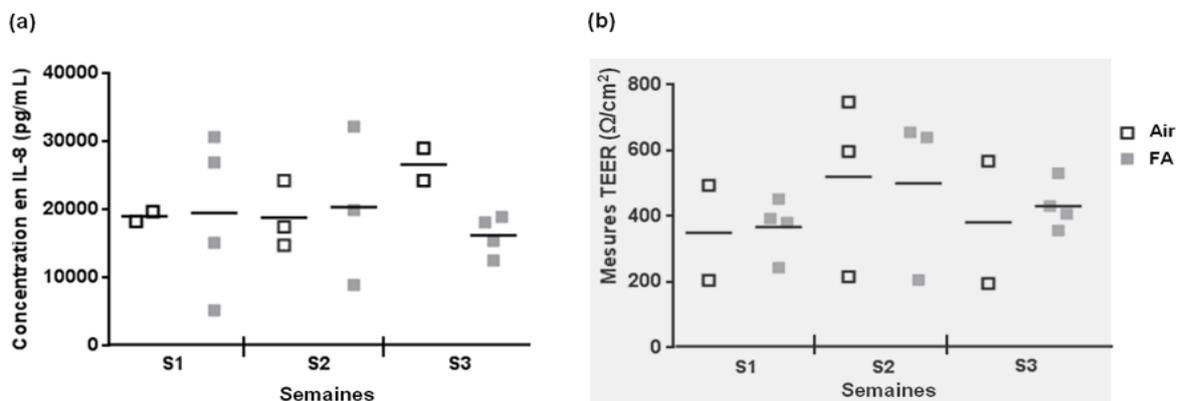


FIGURE 32 – Expositions dynamiques répétées durant trois semaines (S1, S2, S3) des épithéliums hRNE au formaldéhyde gazeux (FA : $200 \mu\text{g}/\text{m}^3$) ou à l'air (Air). (a) Sécrétions en IL-8. (b) Mesures TEER (Ω/cm^2). Les barres noires représentent la moyenne arithmétique des points pour chaque condition (N=1, duplicat)

Pour répondre à notre objectif, nous avons cherché dans cette première partie, à nous rapprocher des conditions physiologiques d'exposition de l'appareil respiratoire humain aux polluants de l'air intérieur. Des modèles cellulaires proches de la physiologie de l'épithélium respiratoire humain ont été exposés, de façon répétée, en interface air-liquide, à une atmosphère de formaldéhyde gazeux générée à des concentrations proches de celles mesurées dans les investigations environnementales.

Une attention particulière a été portée, dans la première étape de ce travail, aux modèles cellulaires étudiés ainsi qu'à leurs conditions de culture ou de maintien.

Deux modèles cellulaires ont été étudiés : le premier est une monocouche de cellules primaires et le second est un épithélium reconstitué présentant une multicouche de cellules primaires différenciées. Ces deux modèles ont pour même origine des cellules épithéliales nasales humaines (hAECN). Le choix de l'origine cellulaire s'est justifié par la volonté de se rapprocher de l'exposition réelle, l'épithélium nasal étant la première barrière de l'appareil respiratoire humain en contact direct avec les polluants de l'air intérieur.

En ce qui concerne les cellules hAECN, les conditions de culture ont été optimisées et standardisées. Nous avons tenu compte de différents paramètres rapportés dans la littérature, tels que le temps de croissance des cellules, la densité d'ensemencement, le revêtement de la membrane poreuse de la chambre de culture (insert) par du collagène, le passage et l'état de confluence avant exposition [160, 166, 224, 225], pour mettre en place les conditions expérimentales. Pour exemple, il est courant de retrouver dans la littérature des valeurs de confluence proches de 80 à 90 % avant exposition en interface air-liquide [160, 204, 205]. Dans ces études, les cellules sont exposées une seule fois aux polluants gazeux. Dans la mesure où nous souhaitons répéter les expositions et que la durée de l'expérimentation devait être de plusieurs jours, nous avons choisi une confluence comprise entre 70-80 % pour que les cellules continuent de se multiplier et arrivent à confluence en fin d'expérimentation.

Les cellules hAECN, comme les cultures primaires humaines, sont des cellules non transformées provenant de donneurs différents. Elles sont donc sujettes à des variations d'un donneur à l'autre, en matière de production de bio-marqueurs ou de vitesse de croissance. Pour limiter ces variations inter-donneurs, il a été décidé de travailler avec des cellules provenant d'un seul donneur, et de réserver le même lot pour l'optimisation et l'ensemble des expérimentations.

La production de base des différentes cytokines par les cellules hAECN a été déterminée. Les productions d'IL-8 et d'IL-6 sont quantifiables, contrairement à l'IL-1 α et au GM-CSF, dont les niveaux sont inférieurs à la limite de détection. Nous avons également vérifié la capacité des cellules à répondre à un stimulus inflammatoire, en exposant les cellules au TNF α (50 ng/mL), cytokine pro-inflammatoire connue pour son action sur les cellules épithéliales. Une augmentation significative de la production d'IL-8 et d'IL-6 (facteur 2 et 5 respectivement) a été observée, sans perte de viabilité et de fonctionnalité cellulaire.

La mise en place des conditions de culture des cellules hAECN, a permis de former une monocouche homogène et viable, applicable à des expositions répétées sur une longue période de temps, comme nous allons le voir dans la suite de cette discussion.

A côté des cultures primaires de cellules hAECN, nous avons enrichi notre étude en mettant en place un modèle *in vitro* plus proche de la physiologie de l'épithélium respiratoire humain, pouvant être maintenu en culture pendant une longue période de temps. Ce modèle est un épithélium respiratoire reconstitué à partir de cellules épithéliales nasales humaines (hAECN), cultivé en interface air-liquide. Dans la littérature l'intérêt d'un tel modèle est souligné notamment pour évaluer la toxicité de polluants inhalés car ces épithéliums reconstitués sont plus robustes et peuvent être exposés à des concentrations plus fortes de substances ou

de polluants [160, 172, 226]. Il est souligné également qu'ils sont proches de la structure de l'épithélium respiratoire humain car ils sont constitués de plusieurs couches de cellules : des cellules ciliées, sécrétrices de mucus, des cellules basales qui forment des jonctions serrées ce qui facilite un transport ionique actif [168, 169, 176, 227] ainsi qu'une couche de mucus en production continue en partie apicale [171, 228].

Afin de pouvoir travailler sur un modèle optimisé, nous avons caractérisé au mieux cet épithélium hRNE. Notre choix s'est porté sur les épithéliums reconstitués multi-donneurs co-cultivés avec des fibroblastes, car une grande variabilité de production en cytokines a été observée pour les épithéliums reconstitués à partir d'un seul donneur. De même, en absence de fibroblastes, nous avons constaté après trois semaines de culture, une diminution des mesures TEER, indicateur de l'intégrité tissulaire et marqueur précoce de stress tissulaire selon certains auteurs [160]. La présence de fibroblastes contribue au maintien des épithéliums en culture.

La nature même de l'épithélium hRNE nous a conduits à l'analyse de sa structure tissulaire que nous avons abordée par différentes techniques d'imagerie. Nous avons également évalué la variation inter-reconstruction dans la production de base des cytokines de ces épithéliums produits dans les mêmes conditions et dont l'utilisation a été standardisée jusqu'à la première exposition. Enfin, la capacité de cet épithélium hRNE à moduler sa production de médiateurs de l'inflammation (IL-8, IL-6 et GM-CSF) a été vérifiée lors de l'exposition dynamique à l'Air dans nos conditions, sans modification structurale des épithéliums hRNE confirmée par la mesure TEER. Ces informations préliminaires, peu décrites dans la littérature, nous ont paru essentielles pour statuer de la signification des variations observées lors des expérimentations ultérieures. La période la plus longue pendant laquelle les épithéliums hRNE d'une même reconstruction ont été maintenus au laboratoire a été de huit semaines. Durant cette période, ni la résistance membranaire, ni les battements ciliaires, ni la production de mucus n'ont été altérés. Nous n'avons pas testé plus longtemps le maintien de ces épithéliums hRNE pour des raisons d'organisation de leur entretien, bien qu'il est reporté dans la littérature que ces épithéliums reconstitués peuvent être maintenus en culture entre six mois et un an [168, 171]. La mise en place, la caractérisation et la définition des conditions d'entretien de ce modèle d'épithélium ont confirmé son adéquation avec l'objectif que nous nous étions fixé : utiliser un outil adapté à l'évaluation de l'impact de polluants de l'air sur la santé respiratoire.

L'étape suivante de ce travail a été d'appréhender d'une part la réaction de ces modèles *in vitro*, hAECN et hRNE, à l'exposition dynamique c'est-à-dire en présence d'un flux dynamique (mL/min) comparée à l'absence de flux et d'autre part d'adapter à notre objectif, les conditions d'utilisation du dispositif d'exposition dynamique en interface air-liquide.

Peu d'études mettant en œuvre des cultures primaires de cellules et des polluants gazeux sont disponibles dans la littérature. Lorsqu'elles existent, elles concernent des lignées cellulaires bronchiques ou alvéolaires, exposées une seule fois pendant un temps variant de 30 min à 3 h [155, 158, 205, 229] à un flux dynamique allant de 2 à 10 mL/min [200, 202, 204, 205, 215]. En choisissant un faible flux d'exposition (2 mL/min) afin d'éviter un assèchement cellulaire souvent reporté dans la littérature [202, 204, 205] et en ajustant la hauteur de l'arrivée du flux par rapport à la partie apicale des cellules, nous avons pu exposer les cellules pendant une durée de une ou deux heures et répéter les expositions jusqu'à trois fois par semaine pendant trois semaines sans perte de viabilité cellulaire.

Dans ces conditions, en comparant la production de médiateurs de l'inflammation lors d'une exposition dynamique à l'Air, à celle des cellules ou épithéliums restés dans l'incubateur, on peut observer que la réaction des deux types de modèle diffère. Alors que la production d'IL-8 par les cellules hAECN ne change

pas, celle de l'épithélium hRNE augmente d'un facteur trois, dès la première exposition et dès la première semaine. Dans la littérature certains auteurs rapportent l'impact, lors d'expositions dynamiques à l'air, de la température et de l'humidité sur les cellules de l'arbre respiratoire [230, 231]. Dans nos conditions, les cellules sont maintenues à une température de 37°C et une humidité proche de 90 % dans l'incubateur. Au moment des expositions, les cellules sont exposées à des températures proches ($22,3 \pm 1,7$ °C vs $20-25$ °C, respectivement pour les cellules hAECN et les épithéliums hRNE) alors que l'humidité est variable $30 \pm 9,7$ % pour les cellules hAECN et $79 \pm 8,1$ % pour les épithéliums hRNE. Davidovich et al. [231], rapportent une augmentation de la sécrétion en mucus en partie apicale après une exposition de 15 minutes à un flux d'air dynamique ($0,5 \text{ dyne}^p/\text{cm}^2$) de cellules épithéliales nasales humaines cultivées en interface air-liquide à une température de 40°C et une humidité de 40 % par rapport au contrôle. Les auteurs évoquent un phénomène de déshydratation des cellules pendant l'exposition conduisant à une production plus importante de mucus en partie apicale. Dans nos conditions, nous n'avons pas eu l'occasion et le temps de tester cette hypothèse, bien que ces paramètres puissent certainement influencer la réaction inflammatoire des épithéliums hRNE.

En conséquence dans le cadre de nos expérimentations, le témoin des expositions à des atmosphères chargées en polluant(s) choisi sera l'exposition à la même atmosphère sans polluant.

La dernière étape, a été d'exposer de façon dynamique et répétée en interface air-liquide les modèles au formaldéhyde gazeux, polluant ubiquitaire de l'air intérieur, à une concentration proche de $200 \mu\text{g}/\text{m}^3$ générée et contrôlée.

Au sein de la littérature, différentes techniques sont rapportées pour générer des atmosphères chargées en formaldéhyde. Le formaldéhyde gazeux peut être généré à l'aide de bouteille et dilué à la concentration souhaitée à l'aide d'air synthétique, le plus souvent humidifié. L'inconvénient est que les dilutions importantes appliquées peuvent conduire à un manque de stabilité des atmosphères. Le formaldéhyde gazeux peut-être également obtenu à partir de para-formaldéhyde chauffé dans des dispositifs à perméation. Cependant ces dispositifs ne permettent pas de générer des concentrations proches de celles retrouvées dans l'environnement intérieur [204]. La moyenne de formaldéhyde gazeux mesurée dans l'investigation environnementale de la cohorte PARIS est de $19,8 \pm 1,6$ [6,6-66] $\mu\text{g}/\text{m}^3$ [57, 232].

Au sein du laboratoire, une technique décrite par Saltzman et al.[221], basée sur le principe de la nébulisation du formaldéhyde liquide en forme gazeuse, à température ambiante, dans une chambre en verre préalablement mise sous vide, a donc été mis en place [205, 217, 218].

Le choix de la concentration de $200 \mu\text{g}/\text{m}^3$ s'est justifié par le manque de réponse des cellules des voix basses de l'arbre respiratoire, cellules bronchiques et alvéolaires, exposées à des niveaux plus faibles lors de précédents travaux du laboratoire [205, 217, 218]. Cependant, nous ne voulions pas d'atmosphères chargées à des niveaux utilisés lors des études toxicologiques.

Le contrôle de ces atmosphères générées a été réalisé en collaboration avec le pôle RIME de l'Ecole des Mines d'Alès. Dans la littérature, les atmosphères chargées en COV générées sont souvent peu ou pas contrôlées. Pour plusieurs études, les concentrations d'exposition sont énoncées en fonction des valeurs aériennes théoriques, calculées en fonction des propriétés physico-chimiques du polluant et de la pression atmosphérique [210, 215], ou selon la dilution appliquée en sortie de la bouteille de gaz du polluant [229].

^p Dyne : La force requise pour produire sur une masse d'un gramme une accélération d'un $1 \text{ cm}/\text{s}^2$

Les techniques pré-analytiques décrites dans la littérature pour quantifier les composés organiques volatils, dont le formaldéhyde, font état principalement de prélèvements passifs utilisant des tubes adsorbants (Radiello®, par exemple). Ces prélèvements sont suivis d'une analyse en chromatographie en phase gazeuse reliée à un spectromètre de masse ou à un détecteur à ionisation de flamme [202, 204, 205, 213, 233]. Pour notre étude, le prélèvement a été réalisé sur fibre SPME (PDMS/DVB) préalablement recouverte à l'aide d'un agent dérivatif (PFBHA) réagissant avec le formaldéhyde gazeux [223]. L'avantage majeur de cette technique réside en son gain en sensibilité pour le dosage de composés traces et sa rapidité d'extraction.

Le contrôle des atmosphères chargées en formaldéhyde a permis d'une part, de préciser la concentration à laquelle les cellules étaient exposées, et d'autre part de s'assurer de la reproductibilité de la génération.

A cette concentration et dans nos conditions expérimentales, aucun dommage cellulaire ou tissulaire n'a été observé au cours des expositions répétées des cellules hAECN et des épithéliums hRNE. De même, aucun effet majeur sur la réponse inflammatoire n'a été noté. Le peu de données dans la littérature sur l'effet de l'exposition *in vitro* au formaldéhyde tranche avec les nombreuses études *in vivo* ou épidémiologiques qui sont principalement menées dans l'objectif d'évaluer à des concentrations plus fortes le caractère cancérogène du formaldéhyde [234].

La seule étude rapportant des expositions répétées (4 expositions de 30 min à 24 h d'intervalle) en interface air-liquide à un mélange de formaldéhyde ($200 \mu\text{g}/\text{m}^3$) et de NO_2 ($800 \mu\text{g}/\text{m}^3$), réalisée sur un autre type cellulaire (la lignée cellulaire bronchique Calu-3), cultivé sur plaque et recouvert d'une fine quantité de milieu de culture, montre une augmentation de la production d'IL-8 associée à une baisse significative du métabolisme cellulaire [204]. Cependant cette étude diffère en beaucoup de points de nos conditions d'exposition.

Finalement, au regard de l'absence d'effet de l'exposition à une atmosphère chargée en un seul polluant, le formaldéhyde, nous avons poursuivi ces travaux en évaluant des atmosphères multi-polluants chargées en différents types de polluants : les COV principalement mais aussi les particules. Par ailleurs, pour nous approcher de l'exposition chronique à la pollution de l'air, nous avons privilégié l'étude de l'épithélium hRNE, plus adapté à des expositions répétées sur une longue période de temps.

III. 2 EXPOSITIONS REPETEES DES EPITHELIUMS RECONSTITUES HUMAINS D'ORIGINE NASALE A DES ATMOSPHERES MULTI-POLLUANTS

Dans cette partie, nous avons évalué l'impact d'expositions répétées dynamiques et statiques en interface air-liquide de différentes atmosphères complexes de polluants, sur l'épithélium hRNE.

Dans un premier temps, nous avons étudié des expositions dynamiques d'atmosphères générées à partir de deux peintures de composition différente. Préalablement aux expositions, nous avons porté une attention particulière au contrôle des atmosphères générées chargées en COV.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes attachés à vérifier la réactivité biologique de notre modèle hRNE face à une exposition environnementale complexe, la fumée primaire de tabac, composée de polluants de natures différentes ; chimiques ou particulaires.

Cette partie des résultats est à caractère exploratoire, chaque protocole ayant été réalisé le plus souvent une seule fois. Deux peintures différentes quant à leur composition chimique en COV, ont été utilisées pour réaliser ces expérimentations : une peinture aqueuse « récente » et une peinture à base de solvants organiques « ancienne », ayant pu avoir été utilisée pour les travaux de rénovation du logement des enfants de la cohorte PARIS, lors de leur inclusion dans l'étude. Il est à préciser que les deux pots n'avaient pas été ouverts avant leur caractérisation.

Nous avons choisi au préalable de caractériser et de comparer les compositions des atmosphères générées par les deux peintures dès l'ouverture du pot, puis de quantifier les COV contenus dans les atmosphères générées, au cours de l'expérimentation. Les épithéliums hRNE ont ensuite été exposés de façon répétée aux atmosphères générées à partir du troisième jour de génération. Nous présenterons successivement les résultats des expositions aux atmosphères chargées en COV générées à partir de la peinture récente puis de la peinture ancienne.

La mise en place du dispositif de génération d'atmosphères chargées en COV à partir des peintures et les analyses (qualitative et quantitative) ont été réalisées en collaboration avec le pôle RIME de l'école des Mines d'Alès.

III.2.1 Profil qualitatif des atmosphères chargées en COV à l'ouverture des pots de peinture

Nous avons comparé la composition des atmosphères chargées en COV générées dès l'ouverture des pots des deux peintures. Les résultats des différents composés présents dans les atmosphères générées sont présentés en fonction des aires des pics, dans la figure 33.

Le profil de l'atmosphère de COV émis par la peinture récente après ouverture du pot montre la présence de 15 COV appartenant à des familles différentes d'hydrocarbures (Fig. 33 a). On observe une prédominance d'hydrocarbures substitués de types différents :

- des alcools ; 1-butanol, 1-pentanol,
- des cétones ; 2,4-diméthyl pentanone, acétone,
- des éthers de glycol ; *n*-butyl éther, éther de glycol,
- des esters ; propanoate de butyle, acétate de butyle,
- des esters conservant un groupement -OH ; texanol A et texanol B,
- et un glycol ; propylène glycol.

Trois hydrocarbures aromatiques sont identifiés : le toluène, l'éthylbenzène et le *m*-xylène, et un hydrocarbure aliphatique ; le diméthoxy méthane. Les aires des pics indiquent que les texanol a et b et le toluène sont présents en forte concentration dès l'ouverture du pot.

Par comparaison, le profil de l'atmosphère de COV émise par la peinture ancienne après ouverture, montre la présence de 18 COV appartenant majoritairement à la famille des hydrocarbures aliphatiques particulièrement des alcanes.

On observe trois composés appartenant aux hydrocarbures aromatiques : l'éthylbenzène, le *p*-xylène et les *o/m*-xylènes et deux composés appartenant aux hydrocarbures substitués : une cétone (2-butanone) et un glycol (propylène glycol). Les aires des pics indiquent que le *n*-décane, le nonane et le triméthylcyclohexane sont présents en forte concentration dès l'ouverture (Fig. 33b).

Trois composés seulement sont présents dans les deux atmosphères chargées en COV : le propylène glycol, le *m*-xylène et l'éthylbenzène.

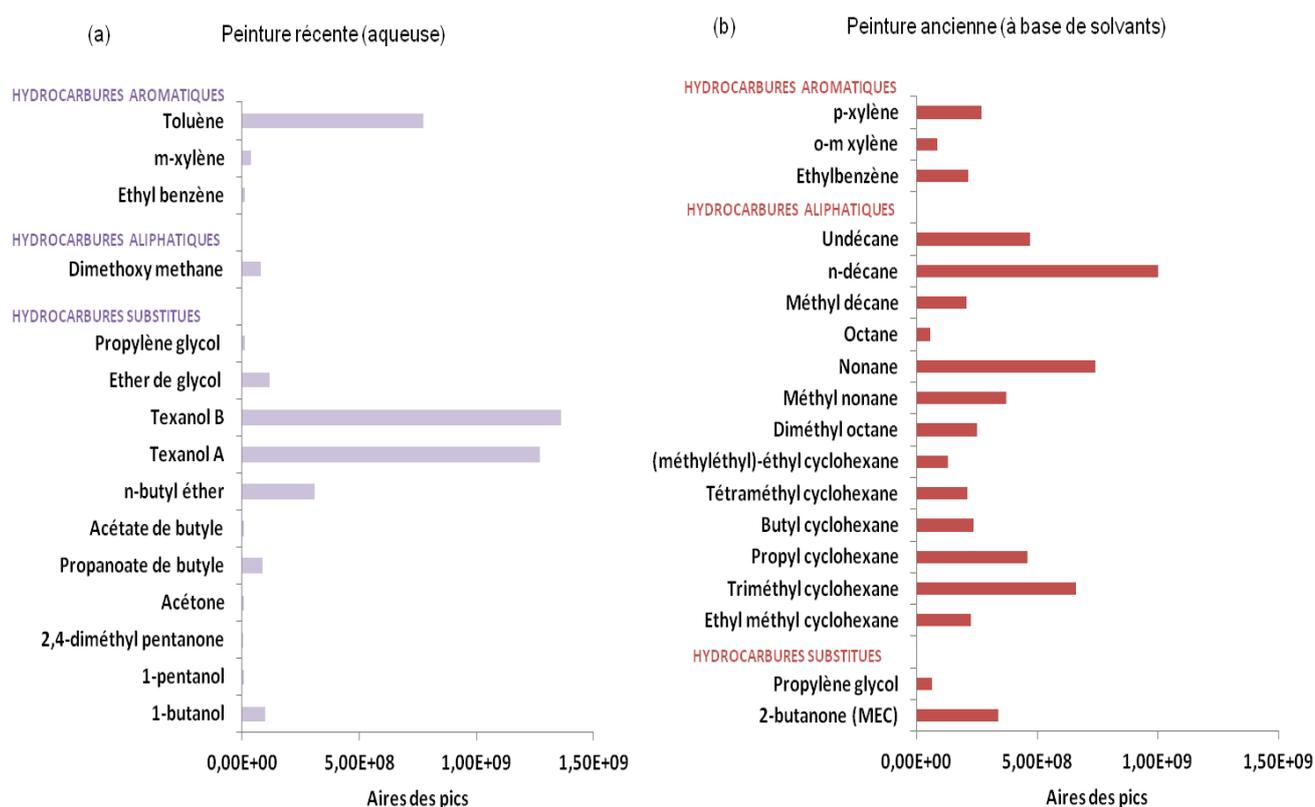


FIGURE 33 – Profil des atmosphères chargées en COV à l'ouverture des pots de peintures. (a) Peinture récente (b) Peinture ancienne.

Cette différence de composition des deux atmosphères observable, s'explique par la nature même des deux peintures utilisées (l'une est à base d'eau et l'autre est à base de solvants), mais également par la période de production des peintures (l'une datant d'avant la réglementation^q visant à réduire les sources d'émission des COV dans l'air intérieur).

^q Arrêté du 19 avril 2011 relatif à l'étiquetage des produits de construction ou de revêtement de mur ou de sol et des peintures et vernis sur leurs émissions de polluants volatils.

III.2.2 Expositions répétées dynamiques à des atmosphères chargées en COV générées à partir de la peinture récente

Quantification des atmosphères chargées en COV générées pendant une semaine

Pour générer les atmosphères chargées en COV, nous avons mis en place un dispositif inspiré des normes ISO 16000-9 et 16000-11, relatives au dosage de l'émission de COV de produits de construction et d'objets d'équipement. Une surface en verre a été recouverte de peinture puis déposée dans une chambre de génération d'atmosphère ventilée par un flux d'air humidifié pendant cinq jours. Les premières expositions ont été réalisées dans tous les cas au troisième jour de génération. Une semaine d'exposition correspond à une génération d'atmosphère.

La génération d'atmosphère chargée en COV avec notre dispositif de génération d'atmosphère (chambre en verre de 11 L) a été validée grâce la comparaison des concentrations émises par la peinture (déposé selon les mêmes paramètres) dans une chambre en verre de 50 L utilisée dans le cadre des normes pour les dosages des émissions de produits de construction et d'objets d'équipement dans le Laboratoire du pôle RIME de l'Ecole des Mines d'Alès.

Les quantifications des atmosphères chargées en COV ont été réalisées au 3^{ème}, 4^{ème} et 5^{ème} jour de génération via le dispositif décrit dans la deuxième partie du manuscrit (Matériels et Méthodes), à l'aide d'un étalonnage en toluène. Trois composés majoritaires : le propylène glycol (1,2 propanediol), le texanol a et le texanol b (Fig. 34), déjà présents lors de l'ouverture du pot, sont détectés lors de la quantification après 3 à 5 jours d'émission par la peinture. Les autres composés présents n'étaient plus détectables après 3 jours.

Les moyennes des concentrations émises pendant les trois jours de génération, sont assez proches ($1,89 \pm 0,37$; $1,80 \pm 0,31$; $2,39 \pm 0,40$ mg/m^3 respectivement pour le propylène glycol, le texanol A et le texanol B) et sont relativement stables d'un jour à l'autre au cours de l'expérimentation. La somme des concentrations moyennes a été estimée à 6 mg/m^3 (Fig. 34).

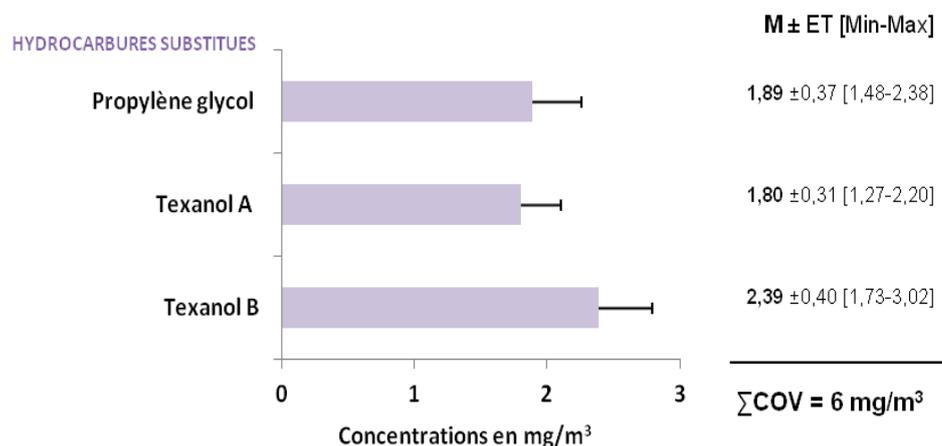


FIGURE 34 – Principaux COV présents dans l'atmosphère générée à partir de la peinture récente au 3^{ème}, 4^{ème} et 5^{ème} jour de génération. (N=1, triplicat). Σ COV : Somme des concentrations moyennes lors des 3 jours de génération.

Après avoir identifié et quantifié les COV présents dans les atmosphères, nous avons évalué leur impact lors d'expositions répétées dynamiques en interface air-liquide sur les épithéliums hRNE.

Dans le cadre de ces premiers essais avec cette atmosphère multi-polluants le protocole 3 a été appliqué, les épithéliums hRNE ont été exposés 1, 2 ou 3 fois par semaine, pendant 1 ou 2 h, à 24 h d'intervalle, pendant trois semaines (Protocole 3).

PROTOCOLE 3 – Expositions répétées dynamiques à des atmosphères chargées en COV générées à partir d'une peinture récente. (x) pour une exposition d'une heure ou de deux heures à un débit de 2 mL/min.

Temps	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Une exposition	X				
Deux expositions	X	X			
Trois expositions	X	X	X		
Activité biologique		RI	RI	RI	Rm

RI : Réponse Inflammatoire, Rm : Mesures TEER

Médiateurs de l'inflammation

Globalement, on n'observe pas d'effet sur la production de l'IL-8 (Figure 35). De même, aucune différence concernant les productions en IL-6 et GM-CSF n'apparaît lors de cette expérience.

Résistance membranaire

Au cours de l'exposition dynamique à l'atmosphère chargée en COV, aucune perte de résistance membranaire quelle que soit la condition étudiée n'a été observée (Figure 36).

L'exposition aux atmosphères chargées en COV des épithéliums hRNE ne produit pas de variation de sécrétion de cytokines, et n'affecte pas leur intégrité tissulaire. Nous avons donc poursuivi ces travaux en exposant les épithéliums hRNE à des atmosphères issues d'une autre sorte de peinture, plus chargée en COV.

III.2.3 Expositions répétées dynamiques à des atmosphères chargées en COV générées à partir de la peinture ancienne

La peinture utilisée pour générer l'atmosphère de cette série d'expérimentation dans les mêmes conditions que précédemment, est différente de la précédente, de par sa composition en COV et leurs concentrations.

Quantification des atmosphères chargées en COV générées pendant une semaine

Après 3 jours de génération, 18 composés supplémentaires sont détectés, principalement des hydrocarbures aliphatiques en majorité des alcanes (14) et un aldéhyde (hexanal). Trois composés sont toujours présents dans l'atmosphère, à l'ouverture et après trois jours de génération : l'undécane, le n-décane et le butyl cyclohexane (Tab. IX). Enfin, 14 composés ne sont plus détectés à 3 jours de génération. Nous avons ensuite quantifié les COV émis par cette peinture ancienne au cours du 3^{ème}, 4^{ème} et 5^{ème} jour de génération. Les moyennes des concentrations individuelles en COV émises sur les trois jours de génération sont présentées dans la figure 37.

Les concentrations des COV sont variables. Les COV les plus concentrés appartiennent aux hydrocarbures aliphatiques : l'undécane $28,91 \pm 19,10 \text{ mg/m}^3$ et le tridécane $59,52 \pm 38,89 \text{ mg/m}^3$. Par comparaison, la plus faible est de $1,3 \pm 0,55 \text{ mg/m}^3$ pour le butyl cyclohexane. On observe une forte

variabilité de concentrations moyennes d'un jour à l'autre de génération pour tous, mais le profil relatif reste constant. La somme des concentrations moyennes sur trois jours de génération a été estimée à 184 mg/m^3 . Dans la suite de ce travail, nous avons cherché à évaluer l'impact de ces atmosphères générées sur l'épithélium hRNE.

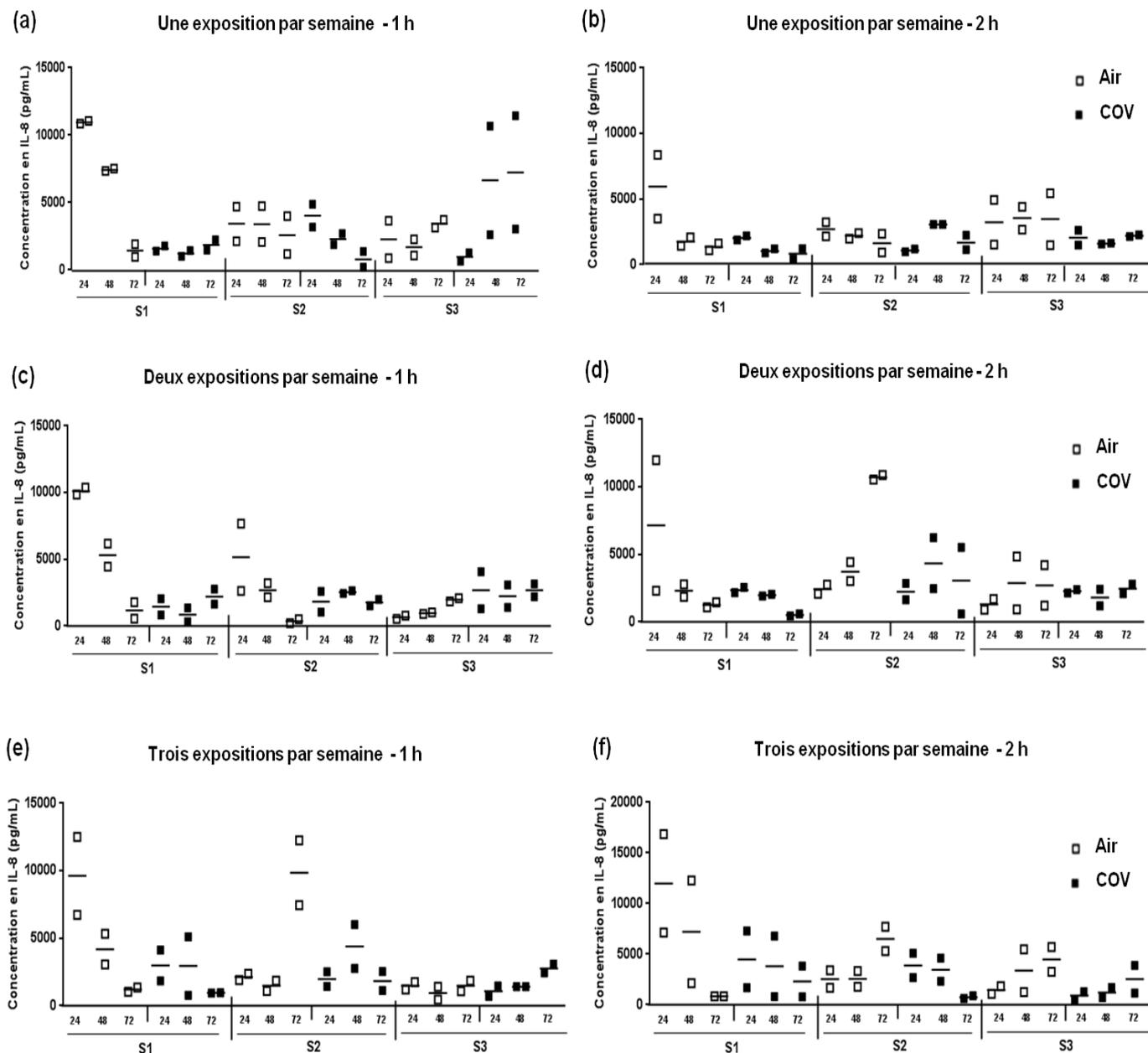


FIGURE 35 – Effet de l'exposition aux COV issus de la peinture aqueuse (pendant 1 h (a&c&e) ou 2 h (b&d&f)) sur la production d'IL-8: 24 h, 48 h et 72 h après la première exposition, pour 1 (a&b), 2 (c&d) ou 3 expositions (e&f) pendant 3 semaines (S1, S2 et S3). Les barres noires correspondent à la moyenne arithmétique des points pour chaque condition (N=1, duplicat).

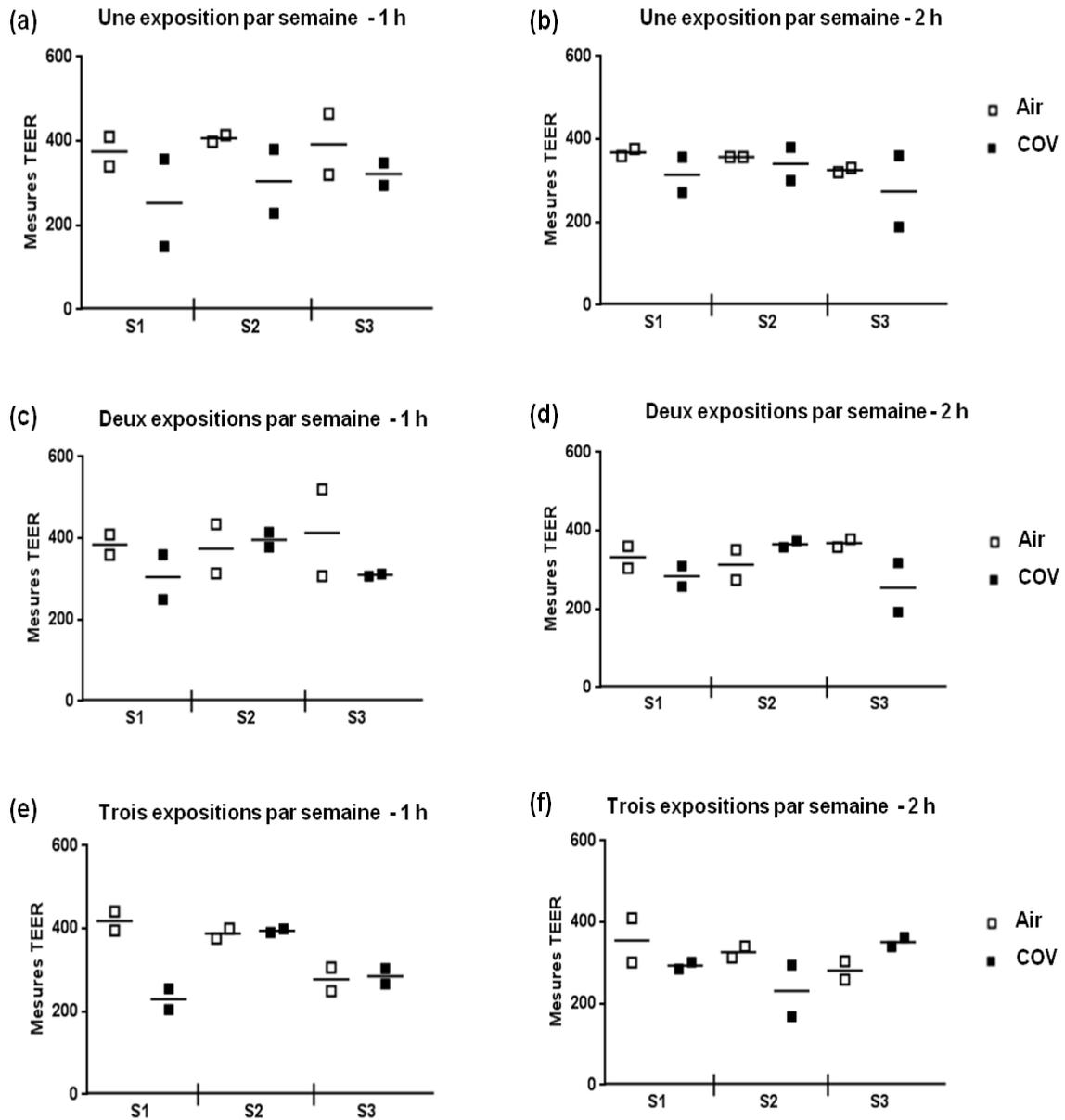


FIGURE 36 – Effets de l'exposition (1, 2 ou 3 expositions hebdomadaires) des épithéliums hRNE à une atmosphère chargée en COV à partir de la peinture récente sur l'intégrité tissulaire (TEER) pendant trois semaines (S1, S2, S3). Les barres noires correspondent à la moyenne arithmétique des points pour chaque condition (N=1, duplicat).

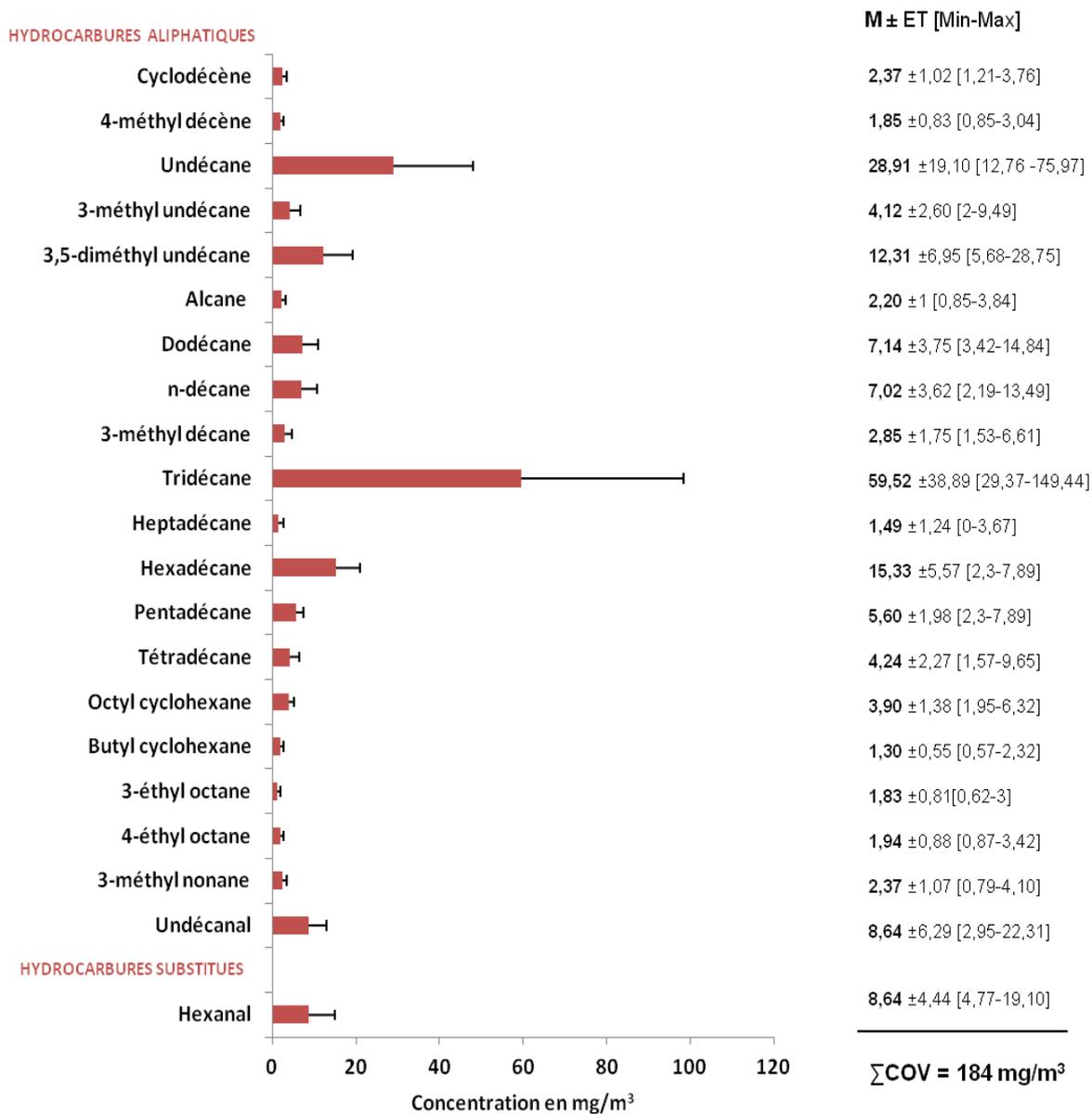


FIGURE 37 – Quantification des atmosphères chargées en COV générées à partir de la peinture ancienne. Les résultats sont présentés en moyenne arithmétique ± écart-type [Min-Max] des COV générés au 3^{ème}, 4^{ème} et 5^{ème} jour. (N=2, 3 jours, duplicat). ∑COV : Somme des concentrations moyennes lors des 3 jours de génération.

TABLEAU IX – Détection des COV dans les atmosphères chargées en COV générées à partir de la peinture ancienne. En bleu, les composés détectés à la fois à l'ouverture et après trois jours de génération. ND : COV présents à l'ouverture mais non détectables à 3 jours. D : non détectables à l'ouverture mais détectés après 3 jours.

Composés détectés	Composés détectés après trois jours
HYDROCARBURES AROMATIQUES	
Ethylbenzène	ND
o-m xylène	ND
p-xylène	ND
HYDROCARBURES ALIPHATIQUES	
Cyclodécène	D
4-méthyl décène	D
Undécane	D
3-méthyl undécane	D
3,5-diméthyl undécane	D
Alcane	D
Dodécane	D
n-décane	D
3-méthyl décane	D
Tridécane	D
Heptadécane	D
Hexadécane	D
Pentadécane	D
Tétradécane	D
Propyl cyclohexane	ND
Tétraméthyl cyclohexane	ND
(méthyléthyl)-éthyl cyclohexane	ND
Triméthyl cyclohexane	ND
Ethyl méthyl cyclohexane	ND
Octyl cyclohexane	D
Butyl cyclohexane	D
Octane	ND
Diméthyl octane	ND
3-éthyl octane	D
4-éthyl octane	D
Méthyl nonane	ND
Nonane	ND
3-méthyl nonane	D
Undécanal	D
HYDROCARBURES SUBSTITUES	
Propylène glycol	ND
2-butanone (MEC)	ND
Hexanal	D

Plusieurs protocoles ont été mis en œuvre pour évaluer la réponse des épithéliums hRNE à l'exposition à cette peinture ancienne.

Le premier protocole appliqué correspond au protocole 2 déjà énoncé dans la partie première partie des résultats. Les épithéliums hRNE ont été exposés de façon répétée durant 1 h en interface air-liquide, jusqu'à trois fois à 24 h d'intervalle, pendant trois semaines. Les résultats sont présentés dans la figure 38.

PROTOCOLE 4 – Expositions répétées dynamiques des épithéliums hRNE en interface air-liquide. (x) pour une exposition d'une heure à un débit de 2 mL/min.

Temps	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Trois expositions	x	x	x		
Activité biologique				RI	Rm

RI : Réponse Inflammatoire, Rm : Mesures TEER

Médiateurs de l'inflammation

La production journalière en IL-8 et IL-6 se révèle plus faible par rapport à l'air, quelle que soit la semaine d'exposition aux COV (Fig. 38a&b). Il en est de même pour la production en GM-CSF mais uniquement pour la première et deuxième semaine d'expositions (Fig. 38a).

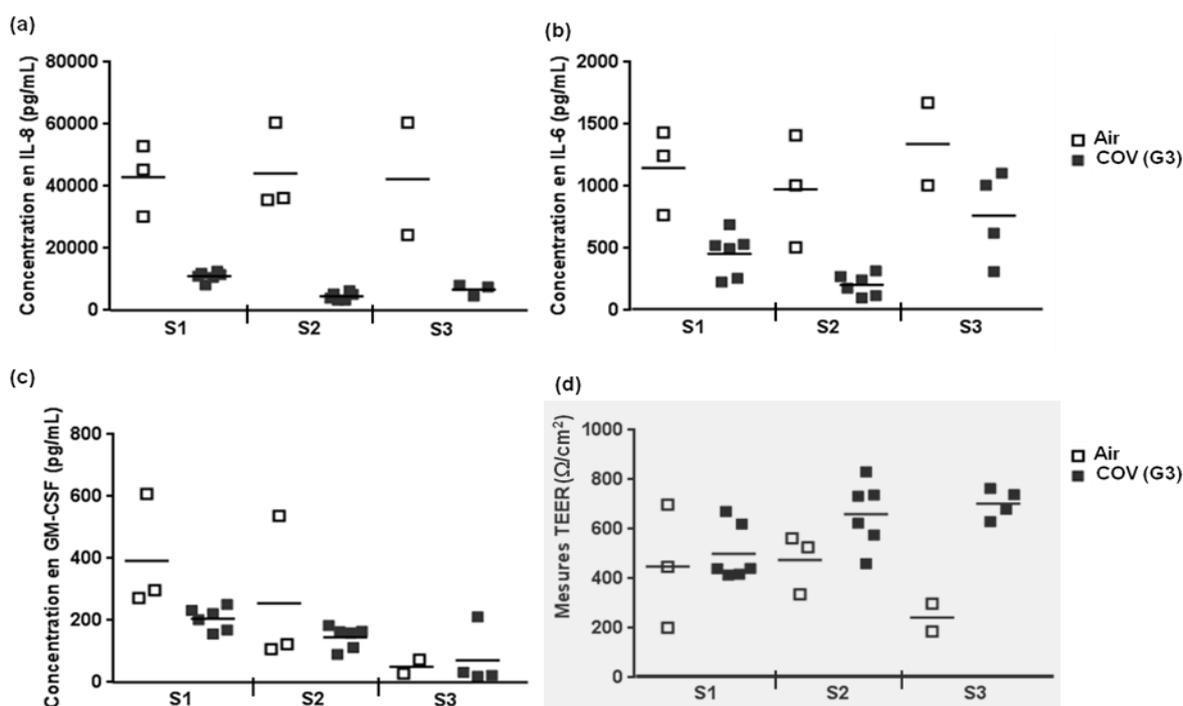


FIGURE 38 – Effets de 3 expositions hebdomadaires d'une heure à 24 h d'intervalle pendant trois semaines des épithéliums hRNE à une atmosphère chargée en COV issue de la peinture ancienne. (a,b,c) Production en médiateurs de l'inflammation (IL-8, IL-6 et GM-CSF) (d) Résistance membranaire (TEER). Les barres noires correspondent à la moyenne arithmétique des points pour chaque condition (N=1, duplicat).

Résistance membranaire

On observe une absence de perte de résistance membranaire lors de l'exposition à l'atmosphère chargée en COV, quelle que soit la semaine d'exposition (Fig. 38d).

Les résultats observés lors de l'exposition à l'atmosphère issue de la peinture ancienne montrent une production de cytokines plus faible que celle lors de l'exposition à l'air seul.

Dans la suite de ce travail, un essai d'effet dose-réponse a été mis en œuvre, au cours duquel le dépôt de peinture a été divisé par 2 (atmosphère G2), ou par 10 (atmosphère G1), comparé au poids de la peinture déposée pour générer l'atmosphère dans les conditions décrites dans la section Matériel et méthodes (atmosphère G3). Le protocole suivi correspond au protocole 2, les expositions ont toutefois été réalisées pendant une seule semaine puisque l'effet est observable dès la première semaine. Les résultats sont présentés dans la figure 39.

Médiateurs de l'inflammation

La production en IL-8, IL-6 et GM-CSF est d'autant plus faible par rapport à l'air, que le dépôt de peinture est important (Fig. 39a&b&c). Pour G1, la production en médiateurs de l'inflammation (IL-8, IL-6 et GM-CSF) est équivalente à celle de l'exposition à l'Air.

Résistance membranaire

La résistance membranaire n'est pas modifiée, quelle que soit la condition d'exposition (Fig. 39d).

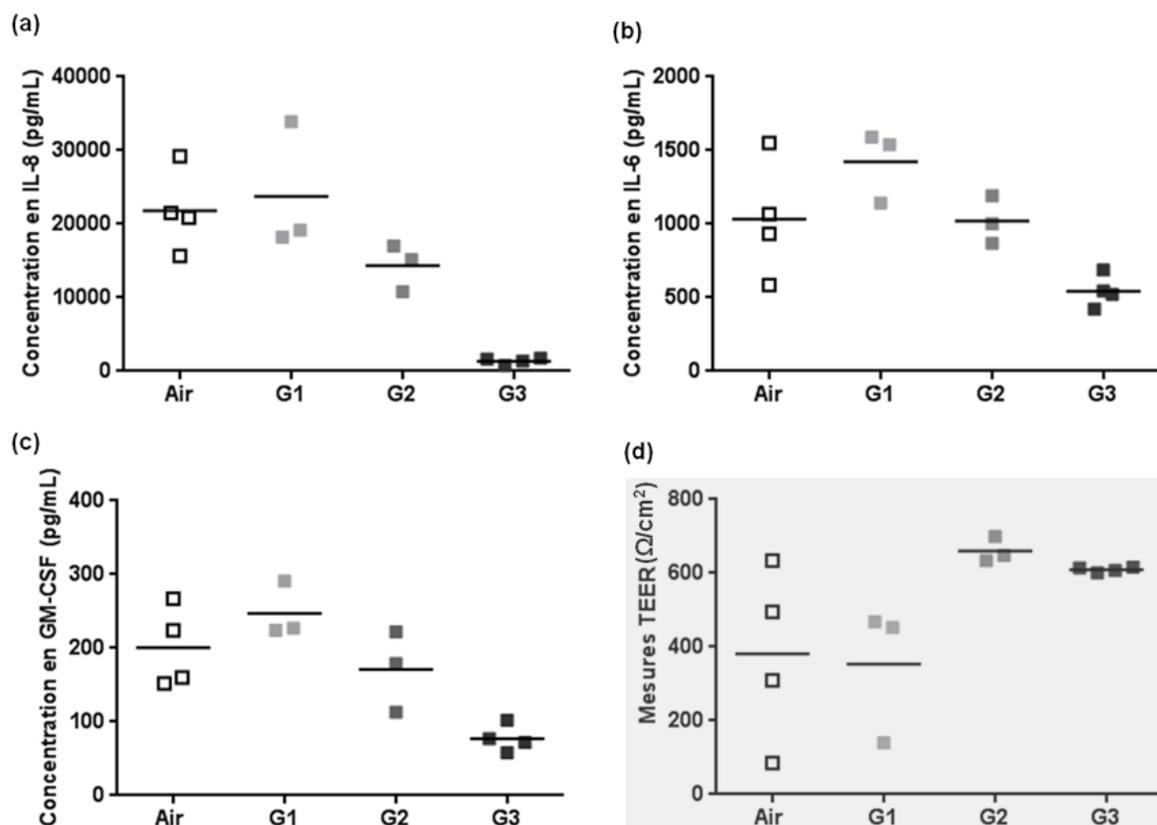


FIGURE 39 – Effet dose de 3 expositions d'une heure à 24 h d'intervalle pendant une semaine des épithéliums hRNE à 3 atmosphères chargées en COV issues de la peinture ancienne (G1, G2, G3). (a,b,c) Production en médiateurs de l'inflammation (IL-8, IL-6 et GM-CSF) (b) Mesures de la résistance membranaire (TEER). Les barres noires correspondent à la moyenne arithmétique des points pour chaque condition (N=1, triplicat).

On observe très nettement un effet-dose, qui ne semble pas être lié à un effet toxique potentiel de l'atmosphère chargée en COV, puisque la résistance membranaire de l'épithélium n'est pas modifiée.

Parallèlement à l'essai portant sur l'effet-dose, nous avons testé l'influence du protocole en lui-même sur l'effet des COV sur les épithéliums hRNE, le nombre d'expositions par semaine et le délai entre l'exposition et la récupération du milieu de culture, sur la production en médiateurs de l'inflammation. Les épithéliums hRNE ont été exposés deux fois à 48 h d'intervalle pendant 1 h durant deux semaines, les milieux de culture étant récupérés tous les 24 h (Protocole 5).

PROTOCOLE 5 – Expositions répétées dynamiques des épithéliums hRNE en interface air-liquide. (x) pour une exposition d'une heure à un débit de 2 mL/min.

Temps	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Deux expositions	x		x		
Activité biologique		RI	RI	RI	RI/Rm

RI : Réponse Inflammatoire, Rm : Mesures TEER

Médiateurs de l'inflammation

La production d'IL-8 dans ces conditions, ne diffère pas entre l'exposition à l'atmosphère chargée en COV et celle sans COV (Air) (Fig. 40a). La production en IL-6 confirme cette observation (Fig. 40b). En revanche, ce suivi au jour le jour de la production d'IL-8 montre une variabilité durant la première semaine d'exposition qui s'atténue au cours de la deuxième semaine. Résistance membranaire

Résistance membranaire

La résistance membranaire n'est pas modifiée, quel que soit le type d'atmosphère (Fig. 40c).

Le nombre d'expositions par semaine ainsi que le temps de récupération des milieux de culture influent sur la réponse inflammatoire des épithéliums hRNE. Dans la suite de ces travaux nous privilégierons une récupération journalière des milieux de culture afin de prendre en compte l'impact des expositions sur toute la période expérimentale.

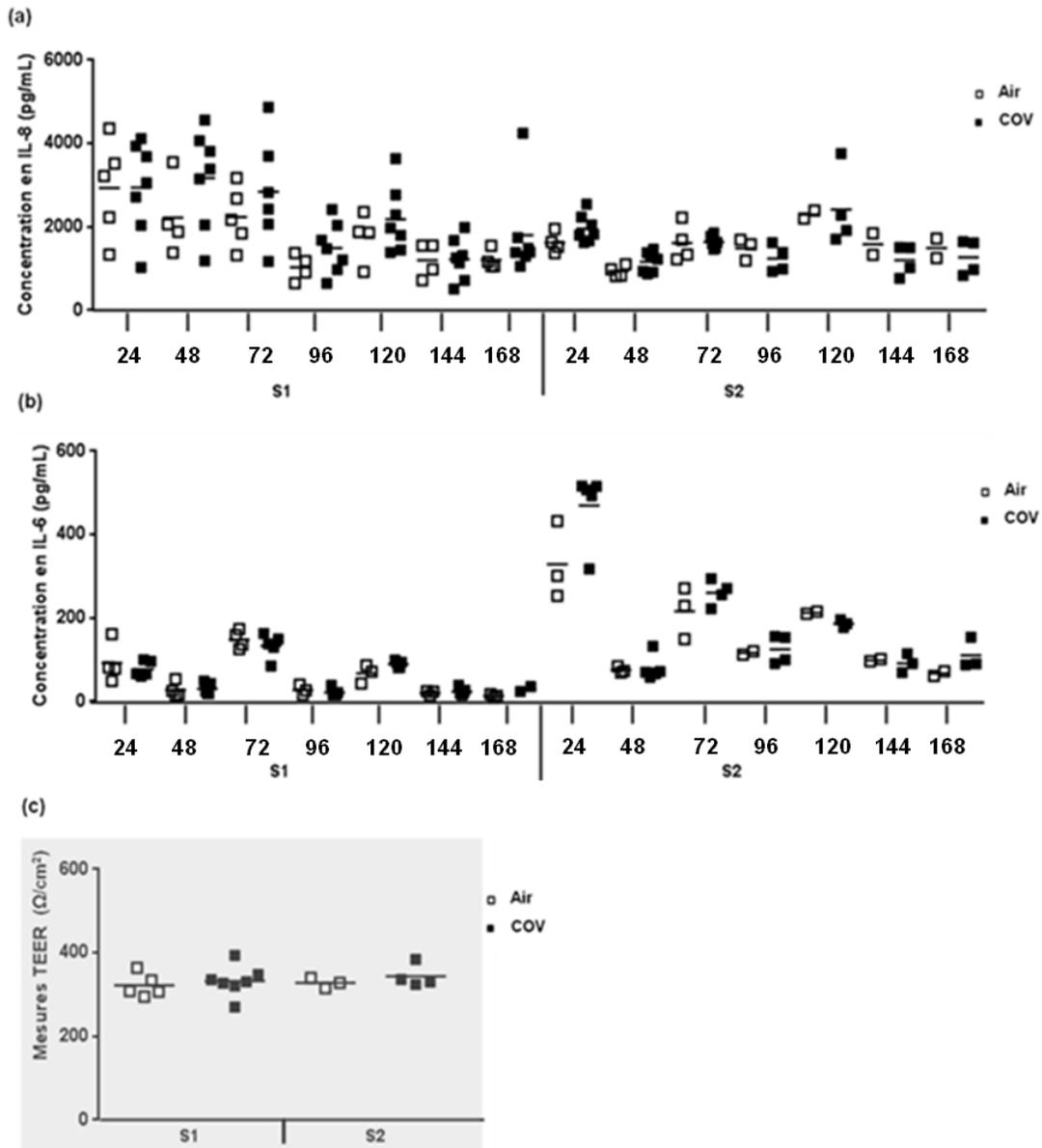


FIGURE 40 – Effet de l'exposition des épithéliums hRNE à une atmosphère chargée (COV) en COV issue de la peinture ancienne ou non (Air), pendant 2 semaines (S1, S2) (a) sur la production en IL-8, (b) sur la production en IL-6, (c) sur l'intégrité tissulaire (TEER). Les barres noires correspondent à la moyenne arithmétique des points pour chaque condition. (N=1, quatre inserts minimum par condition).

Au terme des premiers résultats obtenus lors de l'exposition au formaldéhyde, nous avons poursuivi ces travaux par une exposition à des atmosphères multi-polluants.

Nos travaux s'inscrivent dans la recherche d'éléments de plausibilité biologique afin d'appuyer la relation de causalité entre une exposition environnementale et l'apparition d'une maladie, selon les critères énoncés par Bradford Hill en 1965 [235]. Aussi, nous avons opté pour des atmosphères d'exposition reflétant la réalité, produites à partir de sources présentes dans l'habitat.

Dans la littérature, les protocoles de génération d'atmosphères gazeuses de COV seuls ou en mélange pour l'exposition à des cellules de l'arbre respiratoire, vont être dépendants principalement des propriétés physico-chimiques des composés évalués, et de la concentration à laquelle le ou les polluants vont être générés.

On distingue principalement deux méthodologies de génération :

La première regroupe la génération de COV à l'aide de bouteilles de gaz du polluant. Le gaz est alors dilué, en sortie de la bouteille, à la concentration souhaitée, dans une chambre spécifique à l'aide d'air synthétique le plus souvent humidifié [200, 202, 204, 207, 212]. On observe dans la littérature, que cette méthodologie a été appliquée à la génération individuelle de composés non organiques (le NO₂, le SO₂, le NH₃) et organiques (le toluène, le benzène et le formaldéhyde) [207, 212].

La deuxième méthodologie, regroupe la génération d'atmosphères par nébulisation ou par évaporation du composé liquide injecté, à une concentration définie, dans une chambre en verre à l'aide d'un flux d'air synthétique, ou par dépôt sur un filtre ou dans du milieu de culture, au sein de la chambre d'exposition des cellules [180, 205, 208-210, 215, 217, 218, 220, 236]. Cette méthodologie a été rapportée pour la génération de composés aromatiques comme le chlorobenzène, le styrène, les xylènes et de composés aliphatiques : alcanes, ou terpènes (limonène) [208-210, 220]. Les concentrations générées, via ces méthodologies, restent néanmoins relativement élevées par rapport aux concentrations environnementales, entre 320 et 5000 µg/m³ pour le benzène [207, 212], de 1 à 10⁶ µg/m³ pour le styrène [220], 110 mg/m³ pour le limonène [180].

Ces méthodologies peuvent être appliquées également pour réaliser des mélanges de COV, mais celles-ci sont rarement composées d'un mélange de plus de deux polluants gazeux et les concentrations générées sont souvent supérieures aux concentrations environnementales [180, 207, 208, 210, 220]. A notre connaissance, une seule étude rapporte la génération d'une atmosphère de COV à l'aide d'une source provenant de l'habitat : des panneaux de particules en bois (en pin ou en copeaux de bois orientés). Les panneaux ont été déposés dans une chambre de 250 L ventilée et contrôlée en température (23 ± 1 °C) et en humidité (50 ± 5 %) pendant 28 jours en fonction des indications de la norme ISO 16000-6. Cinq terpènes et quatre aldéhydes ont été retrouvés dans les atmosphères pendant les 28 jours. Les concentrations diminuent en fonction du temps, celles-ci s'étendent de 81,8 mg/m³ (observé au premier jour) pour le maximum à 7,25 mg/m³ (observé au 28^{ème} jour) pour le minimum. Des cellules alvéolaires (A549) ont été ensuite exposées à ces atmosphères, via le dispositif d'exposition dynamique Vitrocell® pendant une heure à un débit de 5 mL/min. Les auteurs rapportent une absence de cytotoxicité et d'endommagement de l'ADN après exposition à ces atmosphères [216].

Finalement, on peut noter la difficulté à produire des atmosphères stables à partir de sources de la vie courante et non reconstituées artificiellement, au regard du peu d'études existantes à l'heure actuelle.

Pour générer des atmosphères chargées en COV issues de sources provenant de l'habitat, nous nous sommes inspirés également des normes ISO relatives aux dosages de l'émission de composés organiques

volatils de produits de construction et d'objets d'équipement. Le choix de la peinture comme source d'atmosphère se justifie par l'observation d'associations rapportées dans la littérature concernant l'augmentation des concentrations en COV dans l'habitat du à des travaux de rénovation incluant la peinture [58-60]. De plus, les données de la cohorte PARIS mettent en avant que les peintures sont les principaux revêtements aux murs dans les logements et les chambres des nouveau-nés [57]. Deux peintures de décoration intérieure ont été étudiées, toutes deux provenant du commerce. La première est une peinture aqueuse achetée en 2014, contenant une concentration en COV de 20 g/L. La seconde est une peinture à base de solvants (glycérophtalique) achetée avant 2007 ayant pu être utilisée au moment de l'investigation environnementale réalisée dans le cadre de la cohorte PARIS dans les logements des enfants, aucune information sur la concentration en COV dans la peinture n'était indiquée sur l'étiquette. Il est à préciser que les deux peintures n'avaient pas été ouvertes avant les expérimentations.

La composition de ces peintures n'étant pas accessible au public, nous nous sommes donc attachés à caractériser les COV émis par les peintures encore liquides au moment de l'ouverture. Pour chacune un profil différent d'émission, plus ou moins riche de divers COV, d'une peinture à l'autre a été observé. Pour générer les atmosphères chargées en COV, nous avons adapté spécifiquement les normes ISO 16000-9 et 16000-11. Après étalement d'un dépôt de peinture, défini selon ses caractéristiques physico-chimiques, sur une plaque de verre, déposée dans une chambre en verre ventilée et contrôlée en température et en humidité, nous avons qualifié et quantifié les COV présents dans l'atmosphère au 3^{ème}, 4^{ème} et 5^{ème} jour. Le premier temps de quantification choisi (le troisième jour), correspond au temps estimé par la norme comme suffisant pour que la peinture soit complètement sèche. Les autres temps (4^{ème} et 5^{ème} jour), correspondent aux expositions réalisées.

Il est à noter que la composition en COV pour chacune des peintures, est très différente entre l'atmosphère à l'ouverture du pot et celle après séchage de la peinture, mais que celle-ci ne varie plus après 3 jours, lorsque la peinture est sèche. Ces données appuient notre choix initial de laisser un délai de trois jours entre l'étalement de la peinture sur la plaque de verre et le début des expositions. Compte-tenu de la stabilité des atmosphères au 3^{ème}, 4^{ème} et 5^{ème} jour, il a été décidé de renouveler les atmosphères toutes les semaines afin d'exposer les épithéliums hRNE à des concentrations similaires. Il est à préciser que les facteurs d'émission des COV par les peintures testées dans la littérature diminuent au cours du temps ce qui ne semble pas être le cas pour nos résultats. Toutefois, ces études restent différentes de notre approche, puisque la quantité de dépôt et la surface d'étalement, ainsi que les dispositifs de génération employés (chambre expérimentale (allant de 50 m³ à 0,020 m³) ou de cellules expérimentales (placé au plus proche de la peinture) sont variables d'une étude à l'autre [63, 65, 66, 68, 237, 238]).

Par ailleurs, la composition en COV des atmosphères générées est très différente en matière de famille de COV, mais également au sein d'une même famille entre les deux peintures, sans aucun COV en commun. Ce résultat se justifie par la nature même des deux peintures employées, mais également par la réglementation mise en place en France en 2011 visant à maîtriser les émissions de COV des produits de construction et de décoration. La peinture à base de solvants organiques (ancienne) produit beaucoup plus de COV que la peinture aqueuse (récente). Il est intéressant de constater que la peinture récente est composée de COV (propylène glycol, texanol A et B) dont les effets sanitaires ont été très peu étudiés jusqu'à maintenant. Enfin, pour un dépôt équivalent entre les deux peintures, la concentration en COV totale diffère là encore (6 vs 184 mg/m³ respectivement pour la peinture nouvelle et la peinture ancienne).

Comme l'exposition d'épithéliums reconstitués à l'atmosphère chargée en COV issue de peinture n'est pas rapportée dans la littérature, notre démarche a été principalement à caractère exploratoire, plusieurs protocoles ont été appliqués, respectant tous l'intégrité tissulaire des épithéliums hRNE. Les différences ont porté sur la durée d'exposition, le nombre d'expositions, la durée dans le temps, et le délai entre l'exposition et recueil des milieux de culture.

Au terme des expositions aux atmosphères de la peinture aqueuse (récente), il n'y a pas eu d'effet visible sur les marqueurs de l'inflammation, quel que soit le protocole d'exposition. En revanche, l'exposition à l'atmosphère issue de la peinture ancienne provoque un effet inhibiteur de la production des cytokines, IL-8 et IL6, et dans une moindre mesure de GM-CSF. Cet effet constant, a été observé en fonction de la quantité de peinture déposée lors de la génération et donc indirectement en fonction de la concentration en COV. De plus, cet effet dépend aussi du nombre d'exposition et de l'espacement des expositions.

Cet effet inhibiteur de la réponse inflammatoire sur les épithéliums hRNE, constaté avec la peinture ancienne, demanderait à poursuivre des investigations à l'aide d'une approche mécanistique beaucoup plus poussée. On peut néanmoins se poser la question de la différence d'effet entre les deux peintures. Cette différence peut provenir des concentrations des atmosphères chargées en COV, bien supérieure en ce qui concerne la peinture à base de solvants organiques (ancienne), que pour la peinture aqueuse (récente). Toutefois, pour un dépôt d' $1/10^{\circ}$ de la peinture à base de solvants organiques, correspondant à une concentration estimée en COV de 20 mg/m^3 , nous n'avons pas observé cet effet inhibiteur sur la production de cytokines. Ce résultat a également été observé pour les expositions aux atmosphères chargées en COV générées à partir de la peinture aqueuse (récente), alors que les concentrations étaient trois fois moins importante (6 mg/m^3). Cette différence d'effet peut alors être due spécifiquement à la composition de l'atmosphère chargée en COV générée à partir de la peinture à base de solvants organiques, dont les effets seraient plus délétères que ceux de l'atmosphère chargée en COV à partir de la peinture aqueuse (récente).

A ce stade de notre étude, les atmosphères mono- et multi-polluants générées ne permettent pas d'établir un impact clair des expositions répétées sur l'épithélium hRNE. Nous n'observons pas de réponse inflammatoire. Pour appuyer ces résultats et vérifier la capacité de l'épithélium à réagir à un mélange plus chargé en polluants de différents types, nous avons poursuivi ce travail en exposant de façon répétée les épithéliums hRNE à la fumée primaire de tabac.

III. 3 EXPOSITIONS REPETEES STATIQUES DES EPITHELIUMS hRNE A DES ATMOSPHERES COMPLEXES DE POLLUANTS : LA FUMEE PRIMAIRE DE TABAC

Les expériences sur les expositions dynamiques des épithéliums hRNE aux atmosphères chargées en formaldéhyde gazeux et en COV, ne montrent pas d'effet ou bien une plus faible production de médiateurs de l'inflammation, respectivement, comparé à la même expérience sans polluant (contrôle). D'autre part, l'exposition dynamique à l'Air seul provoque une augmentation de la production d'IL-8, comparé à l'exposition dans l'incubateur.

Pour confirmer ces résultats et s'assurer de la capacité des épithéliums hRNE à réagir à une exposition à un polluant connu pour ses effets toxiques, en matière de réponse inflammatoire, nous avons évalué l'impact de la fumée primaire de tabac (FT), lors d'expositions statiques.

La fumée primaire de tabac est constituée d'une phase gazeuse et d'une phase particulaire. Du fait de la durée de l'exposition, l'effet observé est à attribuer à la phase particulaire. Aussi le contrôle de l'atmosphère s'est basé sur le dépôt des particules de tabac au cours de l'exposition.

Enfin, la série d'expériences menées avec la FT a été l'occasion d'évaluer un autre type de marqueur d'effet adapté à la nature même de notre modèle, à savoir son étude morphologique et histologique.

III.3.1 Contrôle de l'exposition à la fumée de tabac

Lors de l'exposition à la FT pendant une durée de 5 min dans la chambre d'exposition en verre, 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de particules se déposent sur la plaque 24 puits. Le coefficient de variation, évaluant la reproductibilité de l'exposition, calculé à partir de la pesée des particules déposées au cours de quatre générations de FT, est de 10 %.

III.3.2 Choix du temps d'exposition à la fumée primaire de tabac

Afin d'évaluer l'impact de l'exposition statique, en interface air-liquide sur l'épithélium hRNE, deux temps ont été comparés : 5 et 15 min. Une analyse morphologique des épithéliums a été réalisée, une semaine après exposition, par observation des parties apicales en microscopie électronique à balayage et des coupes transversales colorées en microscopie optique.

Résistance membranaire

L'exposition à la FT durant 15 min provoque une perte de résistance membranaire ($\text{TEER} < 50 \Omega/\text{cm}^2$), contrairement à l'exposition durant 5 min, qui ne diffère pas de celle du contrôle.

Etude morphologique et histologique

Une étude morphologique et histologique a été réalisée en partie apicale des épithéliums hRNE, l'exposition à la FT durant 15 min se caractérise par une diminution de la densité et de la longueur des cils ainsi que par une couche de mucus plus dense, comparé à l'exposition durant 5 min (Fig. 41a). Mais également, en coupe transversale des épithéliums hRNE, l'exposition à la FT se caractérise par une diminution de l'épaisseur de l'épithélium après 15 min d'exposition, par rapport au contrôle et à 5 min d'exposition (Fig. 41b).

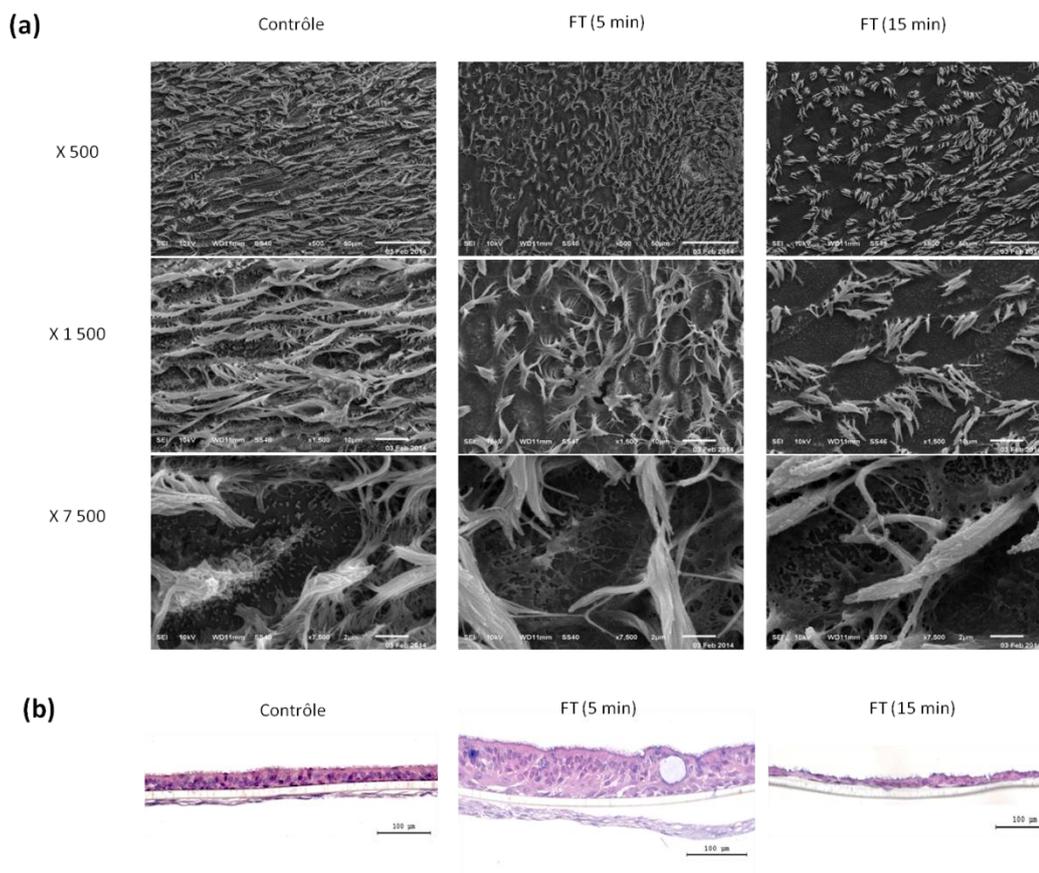


FIGURE 41 – Effet de l'exposition à la fumée primaire de tabac de 5 ou de 15 min sur l'épithélium hRNE, comparé à un épithélium non exposé. Photos en (a) microscopie électronique à balayage de la partie apicale. Grossissements : X 500, X 1 500, X 7 500. (b) Colorations (Hemalun&Eosine, Bleu alcian) de coupes transversales. Barre d'échelle : 100 μm acquisition grossissement X 200. (N=1).

Au terme de ces résultats préliminaires, une exposition de 15 min par rapport à 5 min à la FT, endommage de façon trop importante l'épithélium hRNE pour permettre son évaluation de la réactivité cellulaire et morphologique après expositions répétées à la FT sur une longue période de temps. La durée d'exposition choisie est donc 5 min.

III.3.3 Expositions répétées statiques des épithéliums hRNE à la fumée primaire de tabac (Protocole 6)

Le protocole choisi pour l'exposition à la FT durant 5 min comprend 1 ou 2 expositions à 48 h d'intervalle, à la FT ou à l'Air, pendant 3 semaines. L'analyse histologique est réalisée une semaine après la première exposition, pour chaque semaine d'exposition : en microscopie optique, analyse des coupes transversales des épithéliums hRNE (coloration, et marquage de l'antigène Ki67), mais aussi en microscopie confocale à fluorescence, analyse des parties apicales des épithéliums hRNE (immuno-marquages des filaments d'actine, de la β -tubuline et du mucus). Ce protocole d'exposition est l'adaptation du protocole 5 réalisé précédemment.

PROTOCOLE 6 – Expositions répétées en condition statique de 5 min à la fumée primaire de tabac (FT), une ou deux fois par semaine à 48 h d'intervalle pendant trois semaines.

Temps	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Une exposition	X				
Deux expositions	X		X		
Activité biologique	H	RI	RI	RI	RI/Rm

H : Histologie, RI : Réponse Inflammatoire, Rm : Mesures TEER

III.3.4 Comparaison des expositions Air vs contrôle

Bien que les expositions soient relativement courtes (5 min), nous avons évalué l'impact de la manipulation des épithéliums hRNE, par rapport à ceux maintenus en culture dans l'incubateur (contrôle).

Médiateurs de l'inflammation

La production journalière moyenne en IL-8, IL-6 et GM-CSF est comparable, que ce soit lors d'une ou deux expositions à l'Air et par rapport au contrôle, pendant trois semaines (Tab. X).

TABLEAU X – Valeurs journalières moyennes de sécrétion en IL-8, IL-6 et GM-CSF pour une, deux expositions à 48 h d'intervalle par semaine à l'Air pendant trois semaines. Le contrôle correspond au maintien des épithéliums hRNE à l'incubateur pendant trois semaines (N=2, au moins deux inserts par condition).

	IL-8 (pg/ mL)	IL-6 (pg/ mL)	GM-CSF (pg/ mL)
1 exposition (Air)	1228 ± 216	105 ± 39	42 ± 27
2 expositions (Air)	1530 ± 596	113 ± 43	38 ± 26
Contrôle	1240 ± 258	74 ± 26	35 ± 19

Résistance membranaire

De même, les valeurs TEER moyennes sur trois semaines ne varient pas, que ce soit pour une exposition ($309 \pm 51 \Omega / \text{cm}^2$) ou deux expositions par semaine à l'Air ($326 \pm 41 \Omega / \text{cm}^2$) par rapport au contrôle ($301 \pm 71 \Omega / \text{cm}^2$). Une ou deux expositions à l'Air pendant 5 min à 48 h d'intervalle, durant trois semaines, n'ont pas d'impact sur les épithéliums hRNE par rapport au contrôle incubateur. Pour la suite de ces expérimentations, le contrôle des expositions à la FT sera l'exposition statique à l'Air.

III.3.5 Expositions répétées à la fumée primaire de tabac

Une et deux expositions à la FT d'une durée de 5 min à 48 h d'intervalle, ont été réalisées pendant trois semaines. Pour chaque exposition à la FT, une exposition contrôle à l'Air a été réalisée.

Médiateurs de l'inflammation

La sécrétion journalière en médiateurs de l'inflammation (IL-8, IL-6 et GM-CSF) dans le milieu de culture, montre une augmentation significative ($p < 0,01$) de la sécrétion en IL-8, 24 h après la première exposition à la FT par rapport à l'exposition à l'Air (Fig. 42a&b). Les productions en IL-6 et GM-CSF ne montrent pas de différences significatives de production par rapport aux expositions à l'Air.

Résistance membranaire

Les valeurs TEER pour chaque semaine d'exposition, sont présentées dans le tableau XI.

TABLEAU XI – Mesures TEER (Ω/cm^2) une fois par semaine pendant trois semaines (S1, S2, S3). FT pour fumée primaire de tabac. Résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm écart-type (N=2, au moins deux inserts par condition).

		S1	S2	S3
1 exposition	Air	341 \pm 11	336 \pm 17	250 \pm 24
	FT	281 \pm 110	385 \pm 28	289 \pm 34
2 expositions	Air	325 \pm 38	367 \pm 37	286 \pm 32
	FT	304 \pm 28	294 \pm 61	289 \pm 34

La résistance membranaire ne varie pas de façon significative entre l'exposition à l'air et celle à la FT ; quelle que soit la semaine d'exposition. Les observations en microscopie optique de la partie apicale des épithéliums hRNE confirment l'homogénéité et la cohésion cellulaire tout au long des semaines d'exposition.

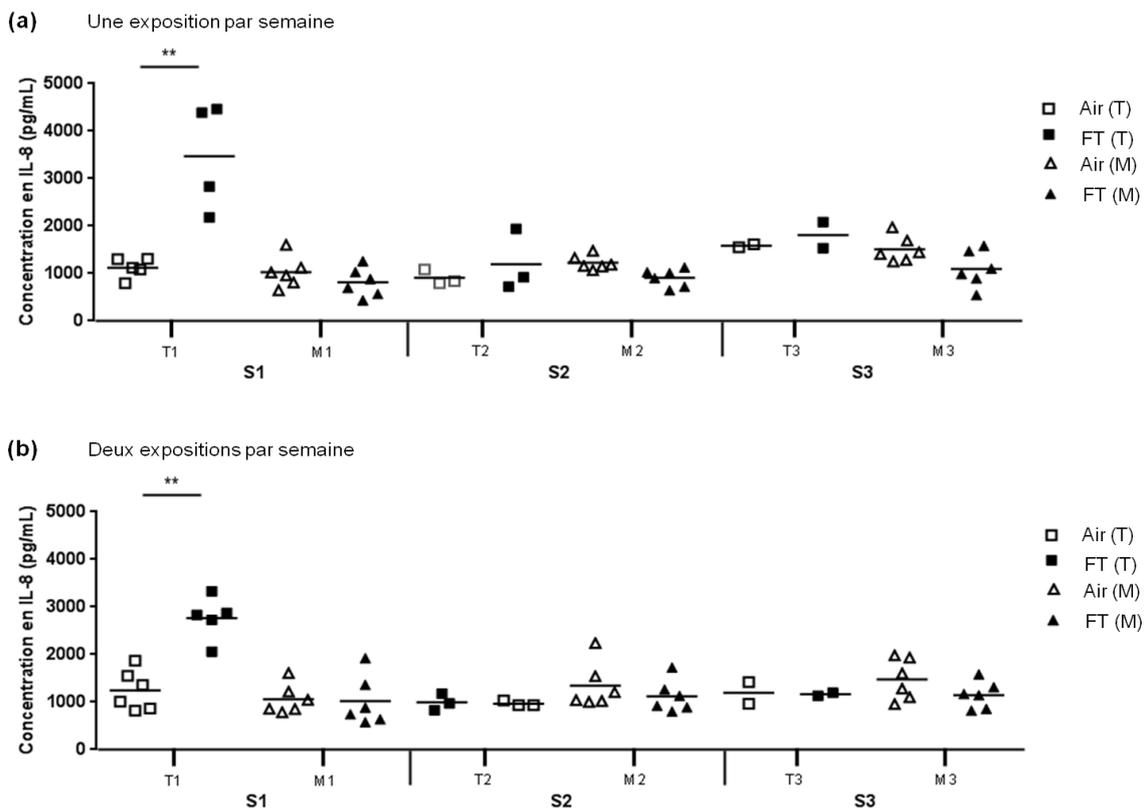
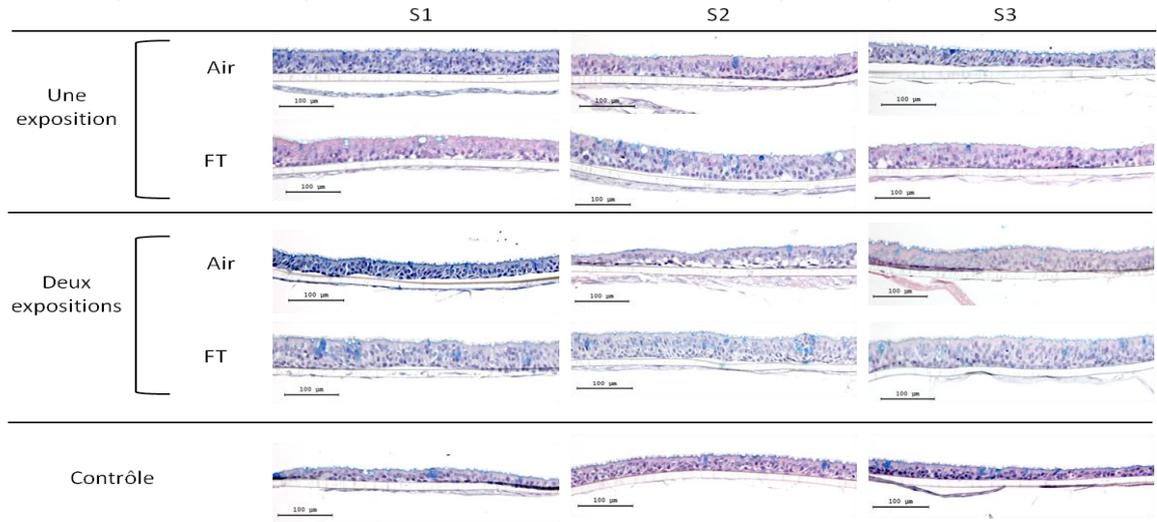


FIGURE 42 – Concentration en IL-8 (pg/ mL), 24 h après la première exposition pour chaque semaine d'exposition (S1, S2, S3). (a) Une exposition par semaine pendant trois semaines. (b) Deux expositions par semaines à 48 h d'intervalle pendant trois semaines. FT : Fumée primaire de tabac. T : 24 h de production après la première exposition pour chaque semaine d'exposition (1,2 et 3) M : Moyenne des autres jours de production. ** $p < 0,01$ versus Air. (N=2, duplicat).

Pour compléter ces résultats, une analyse morphologique des épithéliums hRNE a été réalisée, une fois par semaine, une semaine après la première exposition à la FT.

L'observation des colorations des coupes transversales des épithéliums montre une tendance à l'augmentation de l'épaisseur de l'épithélium en fonction du nombre d'exposition par semaine à la FT



(Fig. 43a).

FIGURE 43 – Effet de l'exposition à la fumée de tabac des épithéliums hRNE sur la structure. Colorations (Hemalun-Eosine, bleu Alcian) de coupes transversales des épithéliums reconstitués (hRNE) une semaine après la première exposition pour chaque semaine d'exposition (S1, S2, S3). Barre d'échelle : 100 µm acquisition. Grossissement X 200 (N=1).

Une faible prolifération cellulaire a été observée à l'aide de l'immunomarquage de l'antigène Ki67 quelles que soit les conditions d'exposition. Les résultats figurent dans l'annexe E.

Ces résultats restent préliminaires, puisqu'ils ont été réalisés sur une seule coupe transversale d'une épaisseur de 4 µm provenant d'un épithélium hRNE par condition. On peut néanmoins conclure qu'un changement dans la structure des épithéliums hRNE est observable après exposition à la fumée primaire de tabac pour une ou deux expositions par semaine pendant trois semaines.

L'analyse de la partie apicale des épithéliums hRNE en microscopie confocale à fluorescence, nous apporte des informations complémentaires sur ces changements observables en microscopie optique.

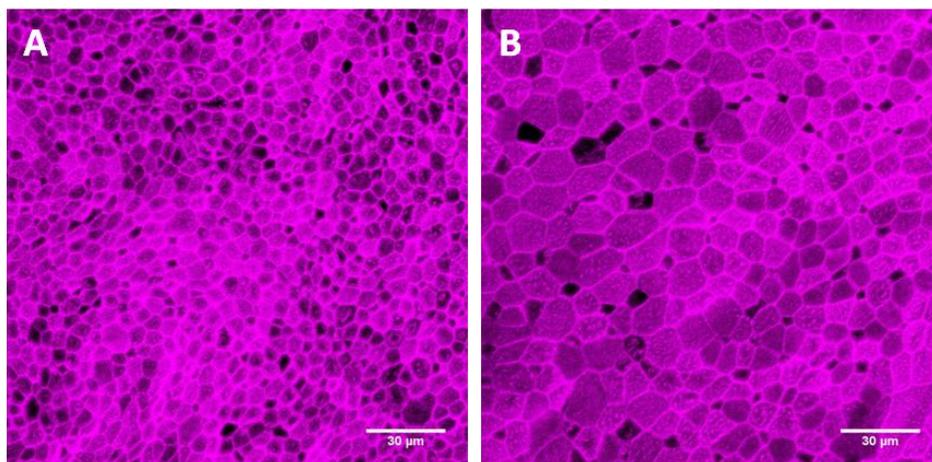


FIGURE 44 – Effet de l'exposition des épithéliums hRNE à la fumée de tabac (a) Projection (z-stack) de l'immunomarquage des filaments d'actine en partie apicale pour une exposition à l'Air statique (Contrôle) (b) Projection (z-stack) Immunomarquage des filaments d'actine en partie apicale pour une exposition à la fumée primaire de tabac (FT). Les deux conditions correspondent à la première semaine d'exposition. Barre d'échelle correspond à 30 µm. Images obtenues à l'aide du logiciel Image J (version 1.48).

A l'aide de l'immunomarquage des filaments d'actine en partie apicale, on observe une augmentation du diamètre des cellules après exposition à la fumée de tabac (Fig. 44b) en comparaison de celles exposées à l'air (Fig. 44a).

Cette observation est corrélée à une diminution de l'intensité de fluorescence de l'actine par cellule. Cet effet est fonction nombre d'expositions hebdomadaires (Fig. 45).

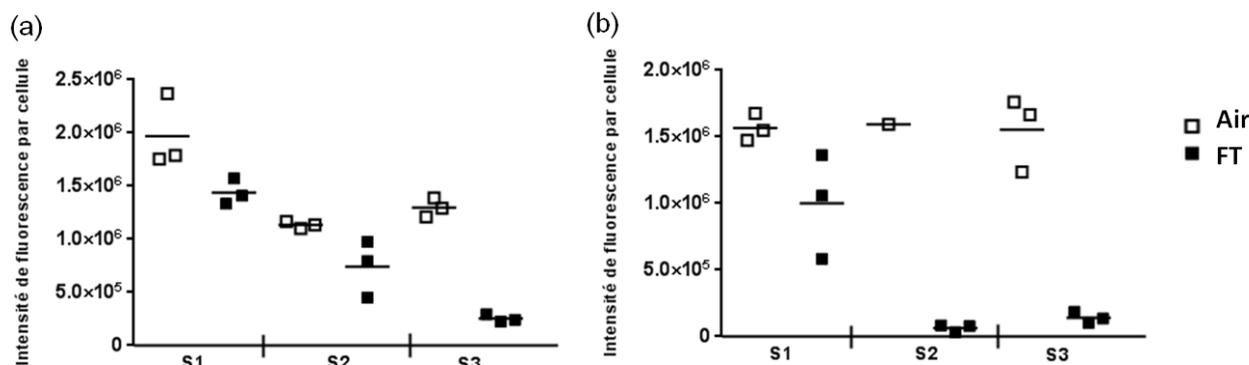


FIGURE 45 – Intensité de fluorescence par cellule de l'immunomarquage de la F-actine en partie apicale. (a) une exposition par semaine, (b) deux expositions par semaine. Trois z-stack par condition. Résultats obtenus à l'aide du logiciel Image J (version 1.48).

Pour évaluer un changement dans la composition des cellules en partie apicale corrélée à l'impact d'expositions répétées à la FT (Tab.XII); nous avons comptabilisé le nombre de cellules muqueuses présentes par champ, à l'aide des immunomarquages du mucus ainsi que le nombre de cellules totales à l'aide des immunomarquages des filaments d'actine

On observe une diminution du nombre de cellules totales et muqueuses par champ lors de l'exposition à la FT dès la première semaine d'exposition, à rapprocher de l'augmentation de la taille des cellules dans ces mêmes conditions. Cependant, la proportion des cellules muqueuses par rapport aux cellules totales ne varie pas, comprise entre 1/4 et 1/3.

TABLEAU XII – Comptabilisation du nombre de cellules total, à l'aide de l'immunomarquage des filaments d'actine, et du nombre de cellules muqueuses à l'aide de l'immunomarquage du mucus en partie apicale, pour une ou deux expositions par semaine pendant trois semaines (S1, S2, S3). Le ratio correspond au nombre de cellules muqueuses par le nombre de cellules ciliées (déduit par soustraction du nombre total du nombre de cellules muqueuses).

		S1			S2			S3		
		Cellules totales	Cellules muqueuses	Ratio	Cellules totales	Cellules muqueuses	Ratio	Cellules totales	Cellules muqueuses	Ratio
1 exposition	Air	545 ± 110	145 ± 14	0,36	632 ± 46	161 ± 16	0,34	585 ± 32	171 ± 15	0,41
	FT	360 ± 2	65 ± 12	0,22	362 ± 8	99 ± 13	0,38	467 ± 46	142 ± 26	0,44
2 expositions	Air	817 ± 10	167 ± 23	0,26	681 ± 11	157 ± 4	0,30	779 ± 43	230 ± 30	0,42
	FT	266 ± 4	84 ± 13	0,46	276 ± 50	113 ± 6	0,71	479 ± 104	158 ± 27	0,49

Dans la dernière partie de ce travail, nous avons fait le choix d'exposer les épithéliums hRNE à la fumée primaire de tabac, afin de nous assurer de la capacité des épithéliums hRNE à réagir à un mélange complexe de polluants.

La fumée primaire de tabac présente sans conteste, l'avantage d'être constituée d'un grand nombre de composés de différents types (gazeux, particulaires,...). La littérature concernant l'impact du tabac sur la santé est très fournie et un grand nombre de composés du tabac, souvent toxiques, ont été associés à des pathologies liées au tabagisme, pour exemple : les adéhydes de la phase gazeuse sont associés à l'apparition de BPCO (Broncho-Pneumopathies Chroniques Obstructives) et les PAHs (Polycyclic aromatic hydrocarbons), l'arsenic, le cadmium, le chrome retrouvés dans la phase particulaire sont associés à l'apparition de nombreux cancers [77, 239, 240].

L'impact de la fumée de tabac sur les cellules épithéliales de l'arbre respiratoire est assez bien documenté au sein de la littérature. Les études portent principalement sur l'évaluation de la phase particulaire qui est capturée à l'aide d'un filtre cambridge et diluée dans du DMSO, ou bullée dans du milieu de culture ou du PBS (l'extrait de fumée de cigarette). Différentes dilutions sont alors appliquées en condition submergée sur les cellules de l'arbre respiratoire [77]. Certaines études évaluent également les composés du tabac séparément, en condition submergée sur les cellules de l'arbre respiratoire [173, 241]. Concernant la réponse inflammatoire, il a été démontré dans plusieurs études que l'exposition à ces extraits ou composés de la fumée de tabac induisait une augmentation significative de la production en IL-8, ainsi qu'une inhibition du processus de réparation des cellules [242-244]. Ces études ne reflètent néanmoins pas la réalité de l'exposition du fumeur à la fumée de tabac. Des machines à fumer (Borgwaldt RM20S ; Burghart MSB-01 ; Vitrocell® VC 10) ont donc été mises en place et reliées à des dispositifs d'exposition de cellules en interface air-liquide (Vitrocell®, Cultex®,...). Au regard de ces études, la fumée de tabac induit une multitude d'impacts sur les cellules de l'arbre respiratoire. Nous pouvons citer pour exemple, l'induction de toxicité, la dérégulation des paramètres biologiques des cellules, les modifications génétiques, les altérations de l'ADN. Beaucoup de paramètres varient néanmoins d'une étude à l'autre : les paramètres biologiques mesurés, le mode de culture des cellules, le mode d'exposition, la durée des expériences [77, 230, 240, 245-248].

Pour évaluer la réactivité cellulaire et morphologique des épithéliums hRNE à la fumée de tabac, nous nous sommes limités à une exposition aux particules par dépôt statique de l'équivalent d'une cigarette, soit 10 bouffées de 25 mL chacune, pendant 5 min, afin de tenir compte de la toxicité de ce mélange de polluants gazeux et particulaire. Bien que d'autres techniques pour quantifier les particules existent à l'heure actuelle (analyse chimique spectrofluorométrique, mesure de la densité optique au photomètre, microbalance en quartz), nous avons souhaité privilégier une méthodologie relative à la quantification de la phase particulaire dans les normes ISO/TC 126/SC1 d'étiquetage des produits du tabac : un procédé de pesée sur filtre Cambridge avant et après impaction de la phase particulaire [77]. Selon cette méthodologie, 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ sont déposés par exposition en partie apicale des épithéliums.

Deux protocoles ont été mis en œuvre différant uniquement par la durée d'exposition 5 et 15 min. Les temps sont relativement courts, car les particules de tabac générées se déposent rapidement sur le mucus recouvrant la partie apicale des épithéliums, prolongeant ainsi le temps de contact entre le polluant et les cellules et donc le temps d'exposition [183]. Pour évaluer l'impact à la fois de la phase particulaire et de la phase gazeuse, il aurait fallu laisser les cellules plus longtemps en présence de la fumée de tabac. Nous n'avons pas choisi d'exposer plus longtemps les épithéliums car un endommagement cellulaire a été observé dès 15 minutes d'exposition.

Notre objectif n'étant pas d'étudier la fumée de tabac, nous n'avons pas utilisé de machines à fumer, et de cigarettes standardisées dans des conditions définies par les normes ISO pour générer nos atmosphères [77].

Après 5 minutes d'exposition à la fumée de tabac, 1 ou 2 fois par semaine, pendant trois semaines, on constate une augmentation de la production d'IL-8, 24 h après la première exposition par rapport au contrôle air. Cependant cette augmentation est limitée à l'IL-8, et est transitoire, puisque la production redevient comparable à celle des épithéliums non exposés à la FT dès 48 h après cette première exposition et ce, durant les trois semaines qui suivent. Le retour aux niveaux de base malgré les expositions suivantes peut évoquer une adaptation de l'épithélium à cette agression. En revanche, on observe un effet cellulaire sur l'épithélium, au bout de la première semaine d'exposition : un changement de la taille des cellules et une augmentation de l'épaisseur du tissu. L'équipe de Balharry et al. [173], en 2007 a constaté également un épaississement du modèle d'épithélium bronchique reconstitué, lors d'exposition submergée à différents composés de la fumée de tabac. De cet épaississement, les auteurs ont déduit que le modèle subissait une hyperplasie et une hypertrophie des cellules muqueuses déjà observé physiologiquement chez des fumeurs atteints de bronchopneumopathies chroniques obstructives [249]. Nous n'avons pas pu confirmer cette hypothèse.

On observe également des changements dans le cytosquelette des cellules, et une diminution de la taille des cils des cellules ciliées. Ces changements au niveau des cellules ne s'accompagnent pas de désorganisation du tissu ou de changement de composition cellulaire, comme reporté dans d'autres études [173, 174, 181]. En effet, la proportion de cellules muqueuses par rapport aux cellules totales en partie apicale des épithéliums hRNE, n'est pas modifiée.

Ces changements, associés à l'exposition aux particules de la fumée de tabac, peuvent être attribués au dépôt sur la face apicale de l'épithélium hRNE des particules entrant en contact avec le mucus. La libération par diffusion dans le mucus des composants des particules, peut expliquer l'effet retard sur la structure, sans observation de toxicité aiguë.

Ces résultats confirment l'intérêt de l'épithélium hRNE comme modèle *in vitro* adapté à l'étude des effets de l'exposition aux polluants de l'air, en exposition répétée sur plusieurs semaines.

Quatrième partie
Discussion générale

Depuis la seconde partie du 20^{ème} siècle, l'augmentation de la prévalence des pathologies allergiques et respiratoires à travers le monde [4, 250], ainsi que l'apparition de symptômes spécifiques d'environnements clos dans les pays industrialisés (syndrome du bâtiment malsain) [7], ont contribué à incriminer la pollution de l'air intérieur comme facteur de risque d'apparition de ces pathologies. Compte-tenu du temps que passe la population générale dans des environnements clos (80- 90 %), et du coût économique que la pollution de l'air intérieur représente, elle a été estimée en France en 2014 à 19 milliards d'euros par an^r, il est primordial de disposer d'un faisceau d'arguments convaincants pour établir une relation de causalité entre les expositions aux polluants de l'air intérieur et l'apparition ou le développement de pathologies respiratoires et allergiques.

Afin de préciser cette relation, il est nécessaire de coupler aux observations épidémiologiques, des éléments expérimentaux, notamment pour évaluer la contribution de chacun des polluants : séparément ou en mélanges. Il découle toutefois de cette mise en relation entre études épidémiologiques et expérimentales, une grande difficulté dans la transposition des expositions, essentiellement due à la diversité des expositions en matière de niveaux et de nature de polluants rencontrés selon les environnements clos [20, 24].

Les études expérimentales, qu'elles soient menées sur l'animal (*in vivo*) ou sur des cellules (*in vitro*), renseignent principalement les mécanismes d'action cellulaires et tissulaires spécifiques d'un ou de plusieurs polluants. A l'heure actuelle, les politiques expérimentales^s visent à substituer les expérimentations animales par le développement de méthodes alternatives, dont les méthodes *in vitro*, pour des raisons éthiques mais également économiques [154]. Cependant, les modèles *in vitro* adaptés à l'étude des polluants environnementaux sont encore peu développés [160]. Les études les mieux documentées dans ce domaine concernent principalement l'évaluation *in vitro* de l'impact de la fumée de tabac ou des particules sur des cellules de la partie basse de l'appareil respiratoire humain [77, 185, 194, 211, 251-253]. Il faut comprendre que les études expérimentales *in vitro*, portant sur l'impact de polluants aériens de l'environnement domestique, sont délicates à mettre en œuvre et nécessitent d'intégrer plusieurs contraintes majeures. Notamment le choix du modèle cellulaire ou tissulaire, celui de l'atmosphère à étudier, également des protocoles d'exposition à rapprocher des conditions d'exposition de la population et enfin le choix de bio-marqueurs pertinents et adaptés [187].

L'objectif principal de cette thèse était de proposer une démarche expérimentale originale permettant l'étude de la relation entre la pollution de l'air intérieur et la santé respiratoire, associant modèles *in vitro* et atmosphères représentatives de l'environnement intérieur, chargées principalement en COV. La force de ce travail est d'avoir mis en place une méthodologie proche des conditions réelles d'expositions, tant sur le plan biologique, avec l'utilisation de modèles *in vitro* adaptés à la répétition dans le temps à des expositions à des polluants gazeux, en interface air-liquide, que métrologique par la génération et le contrôle d'atmosphères réalistes.

Les polluants aériens entrant directement en contact avec la barrière épithéliale lors de l'inhalation, l'étude de modèles de cellules épithéliales de l'arbre respiratoire semble être pertinent dans de telles approches *in vitro* [146, 155]. Cependant, les conditions de culture de la plupart des modèles

^r Etude exploratoire du coût socio-économique des polluants de l'air intérieur, avril 2014, rapport d'étude ANSES

^s Directive européenne du 22 janvier 2010 (2010/63/UE) exige que pour une procédure donnée soit choisie en priorité des méthodes alternatives suivant les principes éthiques des 3 R (Reduce, Refine, Replace) (Russell et Burch, The Principles of Human Experimental Technique 1959).

proposés demandent le maintien des cellules en conditions submergées. Ces conditions ne reflètent pas la situation *in situ* des cellules épithéliales de l'arbre respiratoire et ne sont pas adaptées à l'exposition directe à des polluants aériens. Aussi, des systèmes de chambre de culture sur membrane (ou insert) ont été développés afin de pouvoir cultiver et/ou exposer les cellules en interface air-liquide [155, 254].

Lors de précédents travaux réalisés au sein du laboratoire, les lignées cellulaires alvéolaires (A549) et bronchiques (BEAS 2B) avaient été utilisées et de faibles variations de la réponse inflammatoire avaient été observées après une exposition unique au formaldéhyde gazeux ($50 \mu\text{g}/\text{m}^3$) [205, 217, 218]. Ces résultats nous ont conduits à remonter l'arbre respiratoire et à utiliser, pour ces travaux, des cultures primaires de cellules épithéliales nasales humaines (hAECN). Dans la littérature, ce type de modèle cellulaire est peu étudié en raison de la grande variabilité inter-donneur observée, ainsi que de la difficulté d'obtention de prélèvements humains et de la durée de vie limitée des cellules en culture [159, 160]. Ces modèles cellulaires sont toutefois intéressants car les cellules gardent leurs capacités métaboliques originelles, les réponses cellulaires sont donc plus proches de la réalité *in vivo* [159, 166, 255].

Au cours de ce travail, le modèle de culture primaire de cellules hAECN sur membrane a été mis en place, dans le but de l'appliquer à des expositions répétées en interface air-liquide de façon dynamique sans perte de viabilité. Cependant, ce modèle hAECN en monocouche ne permet pas l'évaluation de l'impact d'expositions répétées, au-delà de trois expositions à vingt-quatre heures d'intervalle, ce qui s'est trouvé être limitant au regard de notre objectif. Nous nous sommes alors tournés vers des modèles d'épithélium reconstitué en interface air-liquide maintenu en culture sur une longue période de temps. Ces modèles, développés depuis une dizaine d'années semblent être une réelle alternative à l'expérimentation animale [176, 227]. Ils peuvent être reconstitués à partir de cellules primaires épithéliales nasales, trachéales ou bronchiques et provenir d'un ou de plusieurs donneurs sains ou atteints de pathologies respiratoires (BPCO, fibrose kystique) et allergiques (asthme, rhinite allergique) [168, 256]. Ils forment un environnement tissulaire composé de plusieurs couches de cellules différenciées : cellules ciliées, sécrétrices de mucus et basales, capables par la présence d'une fonction mucociliaire et la production de médiateurs de l'inflammation ou d'espèces radicalaires, de mimer le rôle de protection et de régulation de l'épithélium respiratoire humain [156, 168]. De tels modèles peuvent être reconstitués en laboratoire ou commercialisés « prêts à l'emploi » par plusieurs sociétés, dont Epithelix® (Genève, Suisse). Il est intéressant de souligner que les deux modèles *in vitro* envisagés dans cette thèse proviennent de la même source : l'un, le modèle MucilAir™ étant issu de la différenciation de l'autre, les cellules primaires hAECN. Nous avons travaillé sur des épithéliums nasaux et issus de sujets sans pathologie respiratoire.

Au vue de la littérature, ces modèles sont adaptés à l'évaluation de la toxicité de certains composés, au transport transmembranaire, à l'impact de molécules (nanoparticules) ou d'agents biologiques, ainsi qu'à l'étude des phénomènes de réparation et de régénération tissulaire [171-177, 179]. Cependant, alors que l'homéostasie tissulaire stable (jusqu'à 12 mois) de ce modèle permet des expérimentations longues dans le temps [168, 172, 226], très peu de publications de travaux scientifiques portent sur l'étude de l'impact des polluants de l'air intérieur, comme les COV, sur la réponse inflammatoire lors d'expositions répétées. A notre connaissance, une seule étude décrit l'impact d'un mélange de COV en phase gazeuse (le limonène et l'ozone) générés à des niveaux

environnementaux sur ces épithéliums après expositions répétées [180]. Notre approche est donc particulièrement novatrice.

Les méthodes d'exposition décrites lors d'études toxicologiques, semblent peu adaptées à l'évaluation des effets des polluants aériens, qu'ils soient gazeux ou particulaires, car l'exposition aux cellules est réalisée de manière submergée. Dans de telles conditions, les concentrations ne sont pas transposables aux concentrations aériennes. De plus, une modification des propriétés physico-chimiques des composés à tester peut intervenir. Enfin, l'interface d'exposition (submergée) modélise mal les phénomènes réels, ce qui conduit à des résultats difficilement applicables en physiopathologie [160, 197]. Depuis maintenant une vingtaine d'années, de nouveaux systèmes d'exposition *in vitro* utilisant l'interface air-liquide pour l'étude des polluants aériens ont été développés, permettant d'exposer directement des cellules à une atmosphère en phase gazeuse [155, 186, 236, 257]. La force de ces dispositifs d'exposition est leur grande flexibilité permettant de varier la nature et le nombre des polluants étudiés, les niveaux envisagés pour chacun d'entre eux, ainsi que le modèle cellulaire utilisé. Ils offrent donc une très bonne applicabilité à la problématique des expositions environnementales et de la santé respiratoire.

Au cours de ce travail, deux dispositifs ont été utilisés ; un dispositif dynamique d'exposition Vitrocell® et un dispositif statique adapté du dispositif Vitrocell® Cloud. Le dispositif dynamique permet de faire arriver l'atmosphère gazeuse à tester au niveau de la partie apicale des cellules à un débit contrôlé, ce qui permet d'approcher le processus respiratoire *in vivo* [258]. Cependant, la durée d'exposition doit être adaptée à la vitesse du flux et au type de cellules exposées, afin d'éviter un assèchement cellulaire. Le système statique permet, quant à lui, de mimer la déposition des polluants particulaires, particules de la fumée de tabac dans notre cas, sur l'épithélium respiratoire. Dans ce dernier cas, les expositions étaient de courte durée, 5 min, temps suffisant pour une déposition complète des particules sur le pôle apical des épithéliums et pour éviter que la phase gazeuse rentre en contact et détériore l'épithélium. Des dispositifs d'exposition de particules en interface air-liquide existent. Ils permettent une exposition plus longue des cellules, grâce à des systèmes assurant l'approvisionnement en CO₂, et sont contrôlés en température et en humidité [251].

Pour compléter notre démarche expérimentale, nous avons choisi des atmosphères chargées en polluants en tenant compte de ceux rencontrés dans l'air intérieur des logements des enfants de la cohorte PARIS, cohorte mise en place et suivie au sein du laboratoire.

Tout d'abord, le formaldéhyde qui est un polluant ubiquitaire majeur de l'air intérieur retrouvé dans les logements de la cohorte, ayant un impact supposé dans l'apparition des pathologies respiratoires et allergiques, en particulier chez le jeune enfant [104, 111, 129].

Puis les COV, associés aux travaux récents de rénovation, dont la peinture (premier revêtement aux murs des logements de la cohorte PARIS), et sont suspectés d'être impliqués dans la modification de la réponse inflammatoire et dans l'apparition ou l'exacerbation du risque d'asthme ou de symptômes liés à l'asthme [58-60]. Les émissions de COV par les peintures dans l'habitat perdurent plusieurs jours, voire plusieurs mois et vont dépendre de la composition de la peinture utilisée, des paramètres intérieurs et du support utilisé pour le dépôt de peinture [52]. Dans la littérature, les rares évaluations de l'impact des émissions de COV par les peintures intérieures sur la santé respiratoire révèlent l'apparition de sifflements [133].

Enfin, la fumée de tabac, source entre autre de formaldéhyde et de COV dans l'habitat. Bien connue pour son effet sanitaire. Il est à signaler qu'au sein de la cohorte PARIS, un cinquième des enfants ont des parents fumeurs réguliers [57, 239, 240].

Une attention particulière a été apportée au cours de ces travaux de thèse, à la génération et au contrôle des atmosphères qu'elles soient mono-polluant (formaldéhyde) ou multi-polluants (COV). La génération d'atmosphères de polluants est peu développée dans la littérature, en particulier la génération d'atmosphère de mélange de polluants à des niveaux environnementaux. Quand elles existent, les études évaluent des atmosphères artificielles composées très rarement d'un mélange de plus de deux polluants gazeux [180, 204]. Pour générer des mélanges beaucoup plus complexes, il semble plus pertinent de partir directement de la source, en tenant compte des incertitudes liées à la génération : composition complète inconnue, variation des polluants émis et des concentrations au cours du temps, stabilité des atmosphères générées [216].

Au cours de ces travaux, afin d'atteindre des atmosphères proches de l'habitat, nous avons généré de façon statique les atmosphères de formaldéhyde gazeux et de façon dynamique les atmosphères chargées en COV à partir d'une source de peintures commerciales (aqueuse et à base de solvants), recréant un mélange réaliste adapté des normes ISO relatives au dosage de l'émission de produits de construction et d'objets d'équipement. Enfin, nous avons généré une atmosphère plus complexe de polluants composée d'une phase gazeuse et d'une phase particulaire, la fumée de tabac, obtenue, par combustion d'une cigarette. Plusieurs dispositifs de génération de la fumée de tabac sont décrits dans la littérature, comme les machines à fumer standardisées [77]. Cependant, notre objectif n'était pas d'étudier l'effet de la fumée de tabac en soi, mais seulement de générer une atmosphère riche en un mélange complexe et toxique de polluants pouvant être présents dans l'habitat.

Une des forces de ce travail est d'avoir mis en place un contrôle de ces atmosphères, étape rarement décrite dans la littérature. Les contrôles quantitatifs réalisés ont permis de mener les expérimentations sur la base de la concentration mesurée en polluant(s) de l'atmosphère générée, et non pas sur la concentration attendue, qui, finalement a différé de celle mesurée, pour le formaldéhyde, ou qui n'était pas définissable pour les COV de la peinture et les particules produites par la fumée de tabac. De plus, la reproductibilité des générations a pu être testée : ce point était essentiel, dans la mesure où l'atmosphère chargée en formaldéhyde et en fumée de tabac étaient générées à chaque exposition, c'est-à-dire de façon journalière. En plus de la reproductibilité de la génération, nous avons aussi vérifié la stabilité de la composition en COV des peintures au cours de la semaine suivant sa génération.

Nos expérimentations se basent sur des protocoles incluant les modèles *in vitro* décrits, avec une exposition en interface air-liquide répétée et des polluants choisis pour cette étude. Un grand nombre de protocoles (six) ont été envisagés, cinq pour les expositions aux atmosphères chargées en COV, un pour les particules de fumée de tabac. Nous avons volontairement favorisé une approche descriptive et exploratoire, compte-tenu du peu d'information disponible dans ce domaine dans la littérature. Dans ces protocoles, nous pouvons isoler des "invariants" ou paramètres constants, et des "variants", paramètres ayant évolué au cours des expérimentations, en fonction des résultats obtenus au fur et à mesure : la durée d'exposition, le nombre d'expositions, l'intervalle entre deux expositions pour une même semaine, le nombre de semaines d'exposition. Dans la seule étude comparable, les épithéliums d'origine bronchique ont été exposés de façon dynamique à l'aide du même dispositif

d'exposition, le système Vitrocell® durant une heure, cinq fois par semaine à 24 h d'intervalle pendant quatre semaines [180]. De même, les temps de récupération des milieux de culture, après exposition, pour évaluer la réponse inflammatoire ont également varié dans nos protocoles. Lors des premiers travaux sur les cellules hAECN, les milieux de culture ont été récupérés 72 h après la première exposition au formaldéhyde et le même protocole a été envisagé avec le modèle hRNE exposé au formaldéhyde puis aux COV dans un souci de comparabilité. Les résultats observés ainsi que le manque de réponse constaté nous a conduits à effectuer les prélèvements toutes les 24 h, pour tenter d'évaluer au mieux la production en médiateurs de l'inflammation après exposition, non pas sur un temps de production défini mais sur l'ensemble de l'expérimentation. Cette approche nous a semblé la plus convaincante pour parvenir à évaluer l'impact d'expositions répétées sur une longue période de temps.

Dans le cadre de ces travaux, différents marqueurs d'effet ont été employés. Le choix d'évaluer la réponse pro-inflammatoire a été dicté par de nombreux travaux épidémiologiques décrivant une relation entre l'exposition à la pollution environnementale et la survenue et/ou l'aggravation des pathologies respiratoires [16, 21, 135]. Les principaux marqueurs d'effet de la réponse inflammatoire décrits *in vitro* sont essentiellement la modification de production ou d'expression de cytokines [155, 158]. Les cytokines sont des médiateurs cellulaires solubles, produits par différents types cellulaires dont les cellules épithéliales et sont impliquées dans la communication cellulaire agissant principalement *via* une activité paracrine sur les cellules adjacentes. Elles peuvent moduler la prolifération, l'adhésion, le chimiotactisme, et l'activation des cellules [259].

Après une semi-quantification par la technologie multiplex des médiateurs de l'inflammation présents dans les milieux de culture des épithéliums hRNE, seules quelques cytokines ont pu être détectées. Ces résultats ont guidé notre choix de suivre trois cytokines : IL-8, IL-6 et GM-CSF. Pour les cellules hAECN, l'étude des cytokines (IL-8, IL-6, IL-1 α , GM-CSF) a découlé des études antérieures sur les cellules épithéliales immortalisées de localisation plus profonde dans l'arbre respiratoire. Pour valider les résultats produits après exposition aux atmosphères chargées en polluant(s), la réactivité des cellules a été testée, en plaçant les cellules dans des situations de réponse inflammatoire, et donc en s'assurant de leurs capacités à produire des médiateurs de l'inflammation. L'exposition au TNF α des cellules hAECN produit bien une augmentation significative de la production d'IL-8 et IL-6, confirmant à la fois la réactivité des cellules hAECN et le choix pertinent des marqueurs d'effet. Concernant le modèle d'épithélium hRNE, la difficulté était de combiner l'exposition à un composé chimique pouvant être déposé sur la partie apicale des épithéliums tout en respectant l'interface air-liquide. Des essais préliminaires, conduits à l'aide du dépôt de pastilles de dextran, polysaccharide se solubilisant au contact du mucus, et de TNF α seul ou avec de l'IL-1 α sur les épithéliums hRNE, n'ont pas eu d'effet sur la production des médiateurs de l'inflammation dans les milieux de culture. Nous avons finalement choisi d'utiliser la fumée de tabac comme stimulus, notre objectif n'étant pas d'étudier la fumée de tabac en elle-même, mais d'évaluer une réactivité des épithéliums hRNE. Les résultats obtenus montrent que la fumée de tabac conduit à une augmentation, transitoire, de la production de cytokines sans perte d'intégrité tissulaire, lorsque le temps de contact avec la fumée primaire est de 5 min.

Le passage de la monocouche des cellules hAECN aux épithéliums hRNE nous a amenés à proposer de nouveaux marqueurs d'effet. La nature structurale de l'épithélium et la coopération cellulaire, combinées à l'exposition répétée sur une période de plusieurs semaines permet la

recherche de marqueurs reflétant des changements s'inscrivant dans la durée, moins immédiats que la réaction inflammatoire. Nous avons donc mis en place l'observation morphologique et histologique des épithéliums hRNE, sans exposition, puis après exposition à l'air et à la fumée de tabac. L'exposition des épithéliums hRNE à la fumée de tabac a provoqué des modifications histologiques et morphologiques, au niveau cellulaire, mais pas tissulaire. Les épithéliums hRNE sont donc réactifs, aussi bien en matière de réponse inflammatoire que de modifications structurales. Il est à préciser que ces marqueurs d'effet histologiques sont employés depuis quelques années dans le cadre de l'étude de l'impact de particules ou de la fumée de cigarette sur ces épithéliums reconstitués. Ils varient en fonction de l'objectif recherché au sein des études. Pour exemple, la recherche de prolifération cellulaire, de production de mucus, d'une diminution des cils de cellules ciliées [174, 182, 260]. A notre connaissance, dans le cadre de l'étude de la pollution de l'air intérieur, cette approche reste novatrice.

L'application aux modèles *in vitro*, cellules hAECN et épithéliums hRNE, des expositions dynamiques et répétées en interface air-liquide de polluants de l'air intérieur a porté principalement sur l'étude des effets des COV. Si on regarde la littérature en rapport avec l'objectif de cette thèse, peu de travaux ont été rapportés à ce jour et les mécanismes d'action semblent peu connus [261, 262]. Il en est de même pour la problématique des expositions aux COV dans les environnements intérieurs. Dans notre étude, on observe une inhibition de la production des cytokines IL-8, IL-6 et dans une moindre mesure GM-CSF, lors de l'exposition à une atmosphère chargée en COV issue de la peinture à base de solvants. Cette première constatation est confirmée par l'existence d'un effet dose-réponse et par l'observation d'une annulation de cet effet lorsque le nombre d'expositions a été réduit et espacé. A ce stade de nos résultats, il peut s'agir de la concentration d'exposition plus importante pour la peinture ancienne que pour la peinture récente, mais aussi de la composition de la peinture ancienne dont les effets seraient plus délétères que ceux de la peinture récente. Il est intéressant de constater que l'exposition aux COV de la peinture aqueuse (récente) n'induit aucune modification de la production des cytokines, rendant spécifique la réponse aux COV de la peinture à base de solvants organiques (ancienne).

Si on rapproche ces résultats à ceux obtenus lors de l'exposition au formaldéhyde, cette inhibition de production en IL-8 est observée pour les cellules hAECN, après trois expositions. Cet effet semble par hypothèse associé au polluant lui-même. Cependant, cet effet sur la production d'IL-8, variable selon le type de peinture, n'est pas en adéquation avec les effets sanitaires des COV rapportés dans les études épidémiologiques. Celles-ci rapportent une tendance à une modification de la réponse inflammatoire ou l'apparition et/ou exacerbation du risque d'asthme ou de symptômes liés à l'asthme [21, 133-135]. Dans ces études, la composition ou même simplement le type de peinture est rarement ou pas renseignée [133].

Si l'inflammation est l'une des premières lignes de défense pour lutter contre tout agent étranger à l'organisme, il existe parfois des phénomènes suggérant que les systèmes de défense, comme l'inflammation, sont inefficaces. Certaines études ont montré l'implication des voies AMPc/PKA et NF-kB comme ayant la capacité à « verrouiller » l'accès de la région promotrice du gène codant pour l'IL-8 au facteur de transcription [263-265]. Cet effet anti-inflammatoire est relativement bien connu pour la fumée de tabac, effet attribué à la nicotine, et au cadmium ou aux antioxydants comme le sélénium [241, 266, 267].

Nos résultats demandent donc à poursuivre des investigations d'un point de vue mécanistique, afin de comprendre les réactions et les voies de signalisation empreintées par les COV pour induire une inhibition de la production en cytokines des épithéliums hRNE.

Conclusion et perspectives

Ce travail de thèse a permis de proposer une démarche expérimentale adaptée à l'étude de la relation entre la pollution de l'air intérieur et la santé respiratoire, associant modèles *in vitro* proches de la physiologie de l'appareil respiratoire humain et atmosphères représentatives de l'environnement intérieur.

Notre travail a fait ressortir le besoin d'une approche pluridisciplinaire primordiale pour aborder cette problématique, afin d'appréhender à la fois : la génération et le contrôle des atmosphères à tester, mais aussi l'exposition et l'évaluation de l'impact biologique au niveau cellulaire et tissulaire d'un point de vue plus mécanistique. La conception et l'établissement d'une telle démarche/approche tend à se rapprocher des expérimentations *in vivo*, intégrant par la même occasion les contraintes liées à ce type d'étude en matière de temps et de financement.

Nous avons pris conscience, au cours de ce travail, des limites de l'utilisation de monocouches de cellules et de l'intérêt d'utiliser des épithéliums reconstitués, plus robustes et proches de la physiologie de l'épithélium respiratoire humain pour réaliser des expositions répétées sur une longue période de temps. L'utilisation de ces modèles d'épithélium reconstitués, souvent présentés dans la littérature comme une alternative aux expérimentations animales, marque une avancée majeure au sein de problématique cherchant à évaluer l'impact chronique d'atmosphères mono- ou multi-polluants.

Le passage des modèles de monocouches, aux modèles multicouches et multicellulaires entraîne des changements dans l'étude des effets des expositions, du fait même des possibilités d'exposition. En effet, le modèle monocouche est encore en phase de multiplication cellulaire horizontale et demande donc à être renouvelé au bout de plusieurs jours de culture seulement. Le modèle multicellulaire, lui, est utilisé à un stade de maturation tel que le tissu formé n'a qu'un faible renouvellement des cellules basales. Cette différence de statut, vis-à-vis de la croissance, permet de mener des protocoles d'exposition, sur des périodes longues comptées non plus en jours mais en semaines, voire en mois. Cette possibilité va entraîner un enrichissement de la gamme des effets de l'exposition à évaluer : des effets correspondant à la réponse immédiate des cellules, comme la réponse inflammatoire, mais aussi des effets reflétant des changements de structure des cellules ou du tissu, plus long à se mettre en place. L'utilisation de ce modèle multicellulaire nécessite cependant d'adapter et de développer les méthodologies analytiques pour tirer le meilleur parti des informations issues de ces expérimentations.

Ces modèles d'épithéliums reconstitués, constituent une avancée majeure certaine, dans la problématique de l'évaluation des effets de l'exposition à la pollution de l'air à laquelle est soumise la population générale de façon chronique.

Cependant, les modèles actuels ne reflètent pas totalement la complexité et la coopération cellulaire physiologique des épithéliums respiratoires. Le développement de la culture de cellules dans un support bicaméral a permis la mise en place depuis quelques années de co-culture de cellules de différents types ; macrophages, cellules dendritiques, cellules endothéliales, cellules épithéliales [183, 184]. Ce type de co-culture, peut être une alternative pour mimer en partie la complexité de l'épithélium respiratoire humain ainsi que les mécanismes de coopération cellulaire existants entre les cellules lors d'exposition à des agents extérieurs. Ils sont néanmoins encore peu développés car la chronologie des mises en culture des différents types cellulaires, pour le maintien de la co-culture reste difficile et peut compliquer l'interprétation des résultats [183].

De plus, l'utilisation de ces modèles d'épithéliums reconstitués amène à prendre en compte davantage les conditions de culture et d'exposition, comme l'humidité ou la température. Nous avons bien vu que le flux d'air influence les résultats. La température doit être proche de 37°C, mais des travaux complémentaires doivent être menés pour affiner l'effet du taux d'humidité lors des expérimentations, effet sur l'épithélium lui-même mais aussi sur la composition des atmosphères. De même, il faudra aussi étudier les effets de la combinaison du taux d'humidité et de la température, comme on peut les retrouver en conditions climatiques réelles. Ces paramètres sont d'autant plus importants que les expérimentations se doivent d'être encore allongées. Pour mimer au mieux l'exposition humaine environnementale, il faudrait envisager une exposition continue et chronique des épithéliums aux atmosphères chargées en polluants. Cette étape supplémentaire demande, d'adapter encore les conditions d'exposition et les dispositifs d'exposition.

Pour comprendre l'impact de la pollution de l'air intérieur, l'étude d'atmosphères réalistes multi-polluants sur une longue période de temps semble inévitable. L'approche multi-pollution permet d'étudier et de renseigner les effets combinés des substances auxquelles nous sommes quotidiennement exposés. Pour aller plus loin dans cette approche, il serait pertinent d'exposer les épithéliums à des atmosphères multi-polluants différentes (physique, chimique et biologique) afin d'étudier les mécanismes d'actions et les effets de ces polluants (additifs, synergiques). Le choix de ces atmosphères, les séquences d'expositions, les durées d'exposition et les niveaux des polluants sont autant de variables dont l'ajustement doit permettre de se rapprocher des conditions réelles de vie.

Bibliographie

- [1] P Brimblecombe: Air pollution and health history. *Air pollution and health* 1999:5-21.
- [2] ML Bell, DL Davis: Reassessment of the lethal London fog of 1952: novel indicators of acute and chronic consequences of acute exposure to air pollution. *Environmental Health Perspectives* 2001, 109 Suppl 3:389-94.
- [3] ML Bell, DL Davis, T Fletcher: A retrospective assessment of mortality from the London smog episode of 1952: the role of influenza and pollution. *Environmental Health Perspectives* 2004, 112:6-8.
- [4] W Eder, MJ Ege, E von Mutius: The asthma epidemic. *The New England Journal of Medicine* 2006, 355:2226-35.
- [5] J Sundell: On the history of indoor air quality and health. *Indoor Air* 2004, 14:51-58.
- [6] AP Jones: Indoor air quality and health. *Atmospheric Environment* 1999, 33:4535-4564.
- [7] F De Blay: [Respiratory diseases related to the indoor environment]. *Revue des Maladies Respiratoires* 2009, 26:573-4.
- [8] CA Redlich, J Sparer, MR Cullen: Sick-building syndrome. *Lancet* 1997, 349:1013-6.
- [9] MJ Finnegan, CA Pickering, PS Burge: The sick building syndrome: prevalence studies. *British Medical Journal (Clinical Research Ed.)* 1984, 289:1573-5.
- [10] CJ Weschler: Chemistry in indoor environments: 20 years of research. *Indoor Air* 2011, 21:205-18.
- [11] T Salthammer, M Bahadir: Occurrence, dynamics and reactions of organic pollutants in the indoor environment. *CLEAN–Soil, Air, Water* 2009, 37:417-435.
- [12] R Dales, L Liu, AJ Wheeler, NL Gilbert: Quality of indoor residential air and health. *Canadian Medical Association Journal* 2008, 179:147-52.
- [13] MI Asher, S Montefort, B Björkstén, CK Lai, DP Strachan, SK Weiland, H Williams, IPTS Group: Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *The Lancet* 2006, 368:733-743.
- [14] S Agrawal: Effect of indoor air pollution from biomass and solid fuel combustion on prevalence of self-reported asthma among adult men and women in India: findings from a nationwide large-scale cross-sectional survey. *Journal of Asthma* 2012, 49:355-65.
- [15] N Mitha, J Lévy, I Annesi-Maesano, J Lafortune, AM Magnier, G Ibanez: Pollution de l'air intérieur et asthme chez l'adulte. *Revue des Maladies Respiratoires* 2013, 30:374-413.
- [16] BR Barnes: Behavioural change, indoor air pollution and child respiratory health in developing countries: a review. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2014, 11:4607-18.
- [17] NE Klepeis, WC Nelson, WR Ott, JP Robinson, AM Tsang, P Switzer, JV Behar, SC Hern, WH Engelmann: The National Human Activity Pattern Survey (NHAPS): a resource for assessing exposure to environmental pollutants. *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology* 2001, 11:231-52.
- [18] C Schweizer, RD Edwards, L Bayer-Oglesby, WJ Gauderman, V Ilacqua, MJ Jantunen, HK Lai, M Nieuwenhuijsen, N Kunzli: Indoor time-microenvironment-activity patterns in seven regions of Europe. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology* 2007, 17:170-81.
- [19] Y Bruinen de Bruin, P Carrer, M Jantunen, O Hanninen, GS Di Marco, S Kephelopoulos, D Cavallo, M Maroni: Personal carbon monoxide exposure levels: contribution of local sources to exposures and microenvironment concentrations in Milan. *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology* 2004, 14:312-22.
- [20] L Carazo Fernandez, R Fernandez Alvarez, FJ Gonzalez-Barcala, JA Rodriguez Portal: Indoor air contaminants and their impact on respiratory pathologies. *Archivos de Bronconeumología* 2013, 49:22-7.
- [21] P Harrison, R Slack, S Bagga: Indoor air pollution. Book : *Allergy and Allergic Diseases, Volume 1, Second Edition* 2002:1279-1289.

- [22] C Dassonville, C Mandin, S Kirchner: Pollutions à l'intérieur des espaces clos: sources, niveaux et impact sanitaire. Volet 1: contaminants biologiques. *Archives des Maladies Professionnelles et de l'Environnement* 2014, 75:433-441.
- [23] C Dassonville, C Mandin, S Kirchner: Pollutions à l'intérieur des espaces clos: sources, niveaux et impact sanitaire. Volet 2: polluants chimiques. *Archives des Maladies Professionnelles et de l'Environnement* 2014, 75:594-606.
- [24] JA Bernstein, N Alexis, H Bacchus, IL Bernstein, P Fritz, E Horner, N Li, S Mason, A Nel, J Oullette, et al: The health effects of non-industrial indoor air pollution. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2008, 121:585-91.
- [25] YM Kim, S Harrad, RM Harrison: Concentrations and sources of VOCs in urban domestic and public microenvironments. *Environmental Science and Technology* 2001, 35:997-1004.
- [26] J Zhang, KR Smith: Indoor air pollution: a global health concern. *British Medical Bulletin: Oxford Journals* 2003, 68:209-25.
- [27] G Viegi, M Simoni, A Scognamiglio, S Baldacci, F Pistelli, L Carrozzi, I Annesi-Maesano: Indoor air pollution and airway disease. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 2004, 8:1401-15.
- [28] N Mishra, J Bartsch, GA Ayoko, T Salthammer, L Morawska: Volatile organic compounds: characteristics, distribution and sources in urban schools. *Atmospheric Environment* 2015, 106:485-491.
- [29] C Godwin, S Batterman: Indoor air quality in Michigan schools. *Indoor Air* 2007, 17:109-121.
- [30] JL Adgate, TR Church, AD Ryan, G Ramachandran, AL Fredrickson, TH Stock, MT Morandi, K Sexton: Outdoor, indoor, and personal exposure to VOCs in children. *Environmental Health Perspectives* 2004:1386-1392.
- [31] S Willers, S Andersson, R Andersson, J Grantén, C Sverdrup, L Rosell: Sick building syndrome symptoms among the staff in schools and kindergartens: Are the levels of volatile organic compounds and carbon dioxide responsible? *Indoor and Built Environment* 1996, 5:232-235.
- [32] SC Sofuoglu, G Aslan, F Inal, A Sofuoglu: An assessment of indoor air concentrations and health risks of volatile organic compounds in three primary schools. *International journal of hygiene and environmental health* 2011, 214:36-46.
- [33] W Yang, J Sohn, J Kim, B Son, J Park: Indoor air quality investigation according to age of the school buildings in Korea. *Journal of Environmental Management* 2009, 90:348-354.
- [34] G Smedje, D Norbäck, C Edling: Subjective indoor air quality in schools in relation to exposure. *Indoor Air* 1997, 7:143-150.
- [35] R Perez-Padilla, A Schilmann, H Riojas-Rodriguez: Respiratory health effects of indoor air pollution [Review article]. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 2010, 14:1079-1086.
- [36] L Mølhave: Human Responses to Organic Air Pollutants. Book : *Organic Indoor Air Pollutants*: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2009: 327-346.
- [37] M Kampa, E Castanas: Human health effects of air pollution. *Environmental Pollution* 2008, 151:362-367.
- [38] K Fournier, P Glorennec, N Bonvallot: An exposure-based framework for grouping pollutants for a cumulative risk assessment approach: Case study of indoor semi-volatile organic compounds. *Environmental research* 2014, 130:20-28.
- [39] F Dor, C Mandin, S Kirchner: La qualité de l'air intérieur: une thématique en dynamique. *Archives des Maladies Professionnelles et de l'Environnement* 2010, 71:806-812.
- [40] A Cicoella: [Volatile Organic Compounds (VOC): definition, classification and properties]. *Revue des Maladies Respiratoires* 2008, 25:155-63.
- [41] C Boust: Les hydrocarbures aromatiques *INRS* juin 2011 ed4226.
- [42] C Boust: Les solvants pétroliers *INRS* mai 2013 ed4224.

- [43] C Boust: Les hydrocarbures halogénés In: *Book Les hydrocarbures halogénés* (INRS ed., vol. ed4223. City: INRS juin 2011.
- [44] C Boust: Les alcools *INRS* novembre 2009 ed4225.
- [45] N Bonnard: Aldéhyde formique et solutions aqueuses. In: *Book Aldéhyde formique et solutions aqueuses* (INRS ed., vol. ff7. City: INRS; 2011.
- [46] C Boust: Les cétones *INRS* novembre 2009 ed4221.
- [47] C Boust: Les éthers *INRS* juin 2011 ed4228.
- [48] N Bonnard: Acide acétique *INRS* 2011 ft24.
- [49] D Jargot: Triéthylamine *INRS* 2015 ft115.
- [50] GA Ayoko, H Wang: Volatile organic compounds in indoor environments: Springer-Verlag Heidelberg; 2004.
- [51] DA Sarigiannis, SP Karakitsios, A Gotti, IL Liakos, A Katsoyiannis: Exposure to major volatile organic compounds and carbonyls in European indoor environments and associated health risk. *Environment International* 2011, 37:743-65.
- [52] SK Brown: Building Products as Sources of Indoor Organic Pollutants. In: *Organic Indoor Air Pollutants*: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2009: 373-404.
- [53] J Christianson, JW Yu, I Neretnieks: Emission of VOCs from PVC-flooring-models for predicting the time-dependent emission rate and resulting concentration in indoor air. *Proceedings of Indoor Air* 1993, 93:389-394.
- [54] T Salthammer: Emission of volatile organic compounds from furniture coatings. *Indoor Air* 1997, 7:189-197.
- [55] C Yu, D Crump: VOC Emissions from Building Products: Sources, Testing and Emission Data: CRC Limited; 2002.
- [56] B Clarisse, L Nikasinovic, R Poinard, J Just, I Momas: The Paris prospective birth cohort study: which design and who participates? *European journal of epidemiology* 2007, 22:203-210.
- [57] C Roda: Exposition domestique à des polluants chimiques de l'air intérieur : modélisation et évaluation de l'impact sur la santé respiratoire chez le jeune enfant. Bilan au terme d'une année de suivi de la cohorte de nouveau-nés PARIS. PARIS: Thèse de l'Université Paris Descartes; 2012.
- [58] U Diez, T Kroessner, M Rehwagen, M Richter, H Wetzig, R Schulz, M Borte, G Metzner, P Krumbiegel, O Herbarth: Effects of indoor painting and smoking on airway symptoms in atopy risk children in the first year of life results of the LARS-study. Leipzig Allergy High-Risk Children Study. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 2000, 203:23-8.
- [59] G Wieslander, D Norbäck, C Edling: Airway symptoms among house painters in relation to exposure to volatile organic compounds (VOCS)—a longitudinal study. *Annals of Occupational Hygiene* 1997, 41:155-166.
- [60] U Franck, A Weller, SW Röder, G Herberth, KM Junge, T Kohajda, M von Bergen, U Rolle-Kampczyk, U Diez, M Borte: Prenatal VOC exposure and redecoration are related to wheezing in early infancy. *Environment International* 2014, 73:393-401.
- [61] R Lebreton: Peintures en solvant : composition, risques toxicologiques, mesures de prévention *INRS* novembre 2009 vol. ed971.
- [62] Z Wicks, F Jones, SP Pappas: Organic coatings science and technology Wiley. *New York* 1992.
- [63] SK Brown: Volatile organic pollutant emissions from building materials. Impacts on indoor air quality. Melbourne Royal Melbourne Institute of Technology University; 2000.
- [64] R Lebreton: Peintures en phase aqueuse (ou peinture à l'eau) : composition, risques toxicologiques, mesures de prévention. *INRS* octobre 2006 vol. ed955.
- [65] Y-M Chang, W-H Hu, W-B Fang, S-S Chen, C-T Chang, H-W Ching: A study on dynamic volatile organic compound emission characterization of water-based paints. *Journal of the Air & Waste Management Association* 2011, 61:35-45.

- [66] JC Chang, Z Guo: Emissions of odorous aldehydes from alkyd paint. *Atmospheric Environment* 1998, 32:3581-3586.
- [67] J-A Kim, S Kim, H-J Kim, Y-S Kim: Evaluation of formaldehyde and VOCs emission factors from paints in a small chamber: The effects of preconditioning time and coating weight. *Journal of hazardous materials* 2011, 187:52-57.
- [68] L Sparks, Z Guo, J Chang, B Tichenor: Volatile organic compound emissions from latex paint—part 2. Test house studies and indoor air quality (iaq) modeling. *Indoor Air* 1999, 9:18-25.
- [69] BA Tichenor, IA Branch: Evaluation of emissions from latex paint. 1995.
- [70] C Wilkes, M Koontz, M Ryan, C Cinalli: Estimation of emission profiles for interior latex paints. *Indoor Air* 1996, 96:55-60.
- [71] D Norbäck, G Wieslander, C Edling: Occupational exposure to volatile organic compounds (VOCs), and other air pollutants from the indoor application of water-based paints. *Annals of Occupational Hygiene* 1995, 39:783-794.
- [72] GA Ayoko: Volatile Organic Ingredients in Household and Consumer Products. Book : *Organic Indoor Air Pollutants*: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2009: 347-372.
- [73] TM Sack, DH Steele, K Hammerstrom, J Remmers: A survey of household products for volatile organic compounds. *Atmospheric Environment. Part A. General Topics* 1992, 26:1063-1070.
- [74] P Wolkoff, T Schneider, J Kildesø, R Degerth, M Jaroszewski, H Schunk: Risk in cleaning: chemical and physical exposure. *Science of the total environment* 1998, 215:135-156.
- [75] J Zhu, H Li, M Korchinski, P Fellin: Prediction of initial emission rates of 2-butoxyethanol from consumer products using equilibrium headspace concentrations: An application of the vapor pressure and boundary layer (VB) model. *Environmental science & technology* 2005, 39:8214-8219.
- [76] G Sarwar, DA Olson, RL Corsi, CJ Weschler: Indoor fine particles: the role of terpene emissions from consumer products. *Journal of the Air & Waste Management Association* 2004, 54:367-377.
- [77] D Thorne, J Adamson: A review of in vitro cigarette smoke exposure systems. *Experimental and Toxicologic Pathology* 2013, 65:1183-93.
- [78] I Lehmann, A Thoeleke, M Rehwagen, U Rolle-Kampczyk, U Schlink, R Schulz: The influence of maternal exposure to volatile organic compounds on the cytokine secretion profile of neonatal t cells. *Environmental Toxicology* 2002, 17:203-210.
- [79] G Morrison: Indoor Organic Chemistry. In: *Organic Indoor Air Pollutants*: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2009: 301-325.
- [80] F Rancièrè, C Dassonville, C Roda, A-M Laurent, Y Le Moullec, I Momas: Contribution of ozone to airborne aldehyde formation in Paris homes. *Science of the total environment* 2011, 409:4480-4483.
- [81] J Sundell, H Levin, WW Nazaroff, WS Cain, WJ Fisk, DT Grimsrud, F Gyntelberg, Y Li, A Persily, A Pickering: Ventilation rates and health: multidisciplinary review of the scientific literature. *Indoor Air* 2011, 21:191-204.
- [82] S Marsteau: Adsorption. *INRS* novembre 2006 ed4263.
- [83] D Norbäck: Subjective indoor air quality in schools—the influence of high room temperature, carpeting, fleecy wall materials and volatile organic compounds (VOC). *Indoor Air* 1995, 5:237-246.
- [84] D Norbäck, I Michel, J Widström: Indoor air quality and personal factors related to the sick building syndrome. *Scandinavian journal of work, environment & health* 1990:121-128.
- [85] K Saarela, T Tirkkonen, J Laine-Ylijoki, J Jurvelin, M Nieuwenhuijsen, M Jantunen: Exposure of population and microenvironmental distributions of volatile organic compound concentrations in the EXPOLIS study. *Atmospheric Environment* 2003, 37:5563-5575.
- [86] M Rehwagen, U Schlink, O Herbarth: Seasonal cycle of VOCs in apartments. *Indoor Air* 2003, 13:283-291.
- [87] Y Zhang, X Luo, X Wang, K Qian, R Zhao: Influence of temperature on formaldehyde emission parameters of dry building materials. *Atmospheric Environment* 2007, 41:3203-3216.
- [88] P Fanger: Indoor air quality in the 21st century: search for excellence. *Indoor Air* 2000, 10:68-73.

- [89] L Fang, G Clausen, PO Fanger: Impact of temperature and humidity on the perception of indoor air quality. *Indoor Air* 1998, 8:80-90.
- [90] R Barro, J Regueiro, M Llompart, C Garcia-Jares: Analysis of industrial contaminants in indoor air: Part 1. Volatile organic compounds, carbonyl compounds, polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls. *Journal of Chromatography A* 2009, 1216:540-566.
- [91] K Sexton, JL Adgate, SJ Mongin, GC Pratt, G Ramachandran, TH Stock, MT Morandi: Evaluating differences between measured personal exposures to volatile organic compounds and concentrations in outdoor and indoor air. *Environmental science & technology* 2004, 38:2593-2602.
- [92] JY Chin, C Godwin, E Parker, T Robins, T Lewis, P Harbin, S Batterman: Levels and sources of volatile organic compounds in homes of children with asthma. *Indoor Air* 2014, 24:403-415.
- [93] S Kirchner: Campagne nationale logements: état de la qualité de l'air intérieur dans les logements français, rapport final CSTB novembre 2006.
- [94] RD Edwards, J Jurvelin, K Saarela, M Jantunen: VOC concentrations measured in personal samples and residential indoor, outdoor and workplace microenvironments in EXPOLIS-Helsinki, Finland. *Atmospheric Environment* 2001, 35:4531-4543.
- [95] H Guo, N Kwok, H Cheng, S Lee, W Hung, Y Li: Formaldehyde and volatile organic compounds in Hong Kong homes: concentrations and impact factors. *Indoor Air* 2009, 19:206-217.
- [96] F Pitten, J Bremer, A Kramer: [Air pollution by volatile organic compounds (VOC) and health complaints]. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)* 2000, 125:545-550.
- [97] T Takigawa, T Horike, Y Ohashi, H Kataoka, DH Wang, S Kira: Were volatile organic compounds the inducing factors for subjective symptoms of employees working in newly constructed hospitals? *Environmental toxicology* 2004, 19:280-290.
- [98] L Mølhav: Organic compounds as indicators of air pollution. *Indoor Air* 2003, 13:12-19.
- [99] P Bluysen, Ed Oliveira Fernandes, L Groes, G Clausen, PO Fanger, O Valbjørn, C Bernhard, C Roulet: European indoor air quality audit project in 56 office buildings. *Indoor Air* 1996, 6:221-238.
- [100] J Zhu, B Aikawa: Determination of aniline and related mono-aromatic amines in indoor air in selected Canadian residences by a modified thermal desorption GC/MS method. *Environment International* 2004, 30:135-143.
- [101] E Uhde: Application of Solid Sorbents for the Sampling of Volatile Organic Compounds in Indoor Air. Book : *Organic Indoor Air Pollutants*: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2009: 1-18.
- [102] JA Koziel, I Novak: Sampling and sample-preparation strategies based on solid-phase microextraction for analysis of indoor air. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2002, 21:840-850.
- [103] A Casset, F De Blay: Effets sur la santé des composés organiques volatils de l'habitat. *Revue des Maladies Respiratoires* 2008, 25:475-485.
- [104] M Hulin, D Caillaud, I Annesi-Maesano: Indoor air pollution and childhood asthma: variations between urban and rural areas. *Indoor Air* 2010, 20:502-14.
- [105] G Hwang, C Yoon, J Choi: A case-control study: exposure assessment of VOCs and formaldehyde for asthma in children. *Aerosol and Air Quality Research* 2011, 11:908-914.
- [106] K Rumchev, J Spickett, M Bulsara, M Phillips, S Stick: Association of domestic exposure to volatile organic compounds with asthma in young children. *Thorax* 2004, 59:746-51.
- [107] G Tavernier, G Fletcher, I Gee, A Watson, G Blacklock, H Francis, A Fletcher, T Frank, P Frank, CA Pickering: IPEADAM study: indoor endotoxin exposure, family status, and some housing characteristics in English children. *Journal of allergy and clinical immunology* 2006, 117:656-662.
- [108] C Billionnet, E Gay, S Kirchner, B Leynaert, I Annesi-Maesano: Quantitative assessments of indoor air pollution and respiratory health in a population-based sample of French dwellings. *Environmental research* 2011, 111:425-434.
- [109] E Erdei, J Bobvos, M Brozik, A Paldy: Indoor air pollutants and immune biomarkers among Hungarian asthmatic children. *Archives of Environmental & Occupational Health* 2003, 58:337.

- [110] I Lehmann, M Rehwagen, U Diez, A Seiffart, U Rolle-Kampczyk, M Richter, H Wetzig, M Borte, O Herbarth: Enhanced in vivo IgE production and T cell polarization toward the type 2 phenotype in association with indoor exposure to VOC: results of the LARS study. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 2001, 204:211-21.
- [111] KB Rumchev, JT Spickett, MK Bulsara, MR Phillips, SM Stick: Domestic exposure to formaldehyde significantly increases the risk of asthma in young children. *European Respiratory Journal* 2002, 20:403-8.
- [112] MH Garrett, MA Hooper, BM Hooper, PR Rayment, MJ Abramson: Increased risk of allergy in children due to formaldehyde exposure in homes. *Allergy* 1999, 54:330-7.
- [113] O Raaschou-Nielsen, MN Hermansen, L Loland, F Buchvald, CB Pipper, M Sørensen, S Loft, H Bisgaard: Long-term exposure to indoor air pollution and wheezing symptoms in infants. *Indoor Air* 2010, 20:159-167.
- [114] M Khalequzzaman, M Kamijima, K Sakai, N Chowdhury, N Hamajima, T Nakajima: Indoor air pollution and its impact on children under five years old in Bangladesh. *Indoor Air* 2007, 17:297-304.
- [115] G Emenius, M Svartengen, J Korsgaard, J Nordvall, G Pershagen, M Wickman: Indoor exposures and recurrent wheezing in infants : a study in the BAMSE cohort. *Acta Paediatrica* 2004, 93:899-905.
- [116] Z Zhao, Z Zhang, Z Wang, M Ferm, Y Liang, D Norbäck: Asthmatic symptoms among pupils in relation to winter indoor and outdoor air pollution in schools in Taiyuan, China. *Environmental Health Perspectives* 2008:90-97.
- [117] ME Gordian, AW Stewart, SS Morris: Evaporative gasoline emissions and asthma symptoms. *International journal of environmental research and public health* 2010, 7:3051-3062.
- [118] C Roda, C Guihenneuc-Jouyaux, I Momas: Environmental triggers of nocturnal dry cough in infancy: new insights about chronic domestic exposure to formaldehyde in the PARIS birth cohort. *Environmental Research* 2013, 123:46-51.
- [119] C Roda, I Kousignian, C Guihenneuc-Jouyaux, C Dassonville, I Nicolis, J Just, I Momas: Formaldehyde exposure and lower respiratory infections in infants: findings from the PARIS cohort study. *Environmental Health Perspectives* 2011, 119:1653-8.
- [120] N Baiz, R Slama, M-C Béné, M-A Charles, M-N Kolopp-Sarda, A Magnan, O Thiebaugeorges, G Faure, I Annesi-Maesano: Maternal exposure to air pollution before and during pregnancy related to changes in newborn's cord blood lymphocyte subpopulations. The EDEN study cohort. *BMC pregnancy and childbirth* 2011, 11:87.
- [121] AJ Venn, M Cooper, M Antoniak, C Laughlin, J Britton, SA Lewis: Effects of volatile organic compounds, damp, and other environmental exposures in the home on wheezing illness in children. *Thorax* 2003, 58:955-60.
- [122] U Diez, M Rehwagen, U Rolle-Kampczyk, H Wetzig, R Schulz, M Richter, I Lehmann, M Borte, O Herbarth: Redecoration of apartments promotes obstructive bronchitis in atopy risk infants—results of the LARS Study. *International journal of hygiene and environmental health* 2003, 206:173-179.
- [123] P Franklin, P Dingle, S Stick: Raised exhaled nitric oxide in healthy children is associated with domestic formaldehyde levels. In: *Book Raised exhaled nitric oxide in healthy children is associated with domestic formaldehyde levels*, vol. 161. City; 2000: 1757-1759.
- [124] P Martins, J Valente, AL Papoila, I Caires, J Araújo-Martins, P Mata, M Lopes, S Torres, J Rosado-Pinto, C Borrego: Airways changes related to air pollution exposure in wheezing children. *European Respiratory Journal* 2012, 39:246-253.
- [125] A Araki, A Kanazawa, T Kawai, Y Eitaki, K Morimoto, K Nakayama, E Shibata, M Tanaka, T Takigawa, T Yoshimura: The relationship between exposure to microbial volatile organic compound and allergy prevalence in single-family homes. *Science of the total environment* 2012, 423:18-26.
- [126] AA Arif, SM Shah: Association between personal exposure to volatile organic compounds and asthma among US adult population. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 2007, 80:711-9.

- [127] P Lovreglio, A Carrus, S Iavicoli, I Drago, B Persechino, L Soleo: Indoor formaldehyde and acetaldehyde levels in the province of Bari, South Italy, and estimated health risk. *Journal of Environmental Monitoring* 2009, 11:955-961.
- [128] A Korpi, J Järnberg, A-L Pasanen: Microbial volatile organic compounds. *Critical reviews in toxicology* 2009, 39:139-193.
- [129] G McGwin Jr, J Lienert, JI Kennedy Jr: Formaldehyde exposure and asthma in children: a systematic review. *Environmental health perspectives (Online)* 2010, 118:313.
- [130] G-H Dong, Y-N Ma, H-L Ding, J Jin, Y Cao, Y-D Zhao, Q-C He: Effects of housing characteristics and home environmental factors on respiratory symptoms of 10,784 elementary school children from northeast China. *Respiration* 2008, 76:82-91.
- [131] J Henderson, A Sherriff, A Farrow, JG Ayres: Household chemicals, persistent wheezing and lung function: effect modification by atopy? *European Respiratory Journal* 2008, 31:547-554.
- [132] M Takaoka, D Norback: The home environment of Japanese female university students-association with respiratory health and allergy. *Indoor and Built Environment* 2011, 20:369-376.
- [133] C Canova, D Jarvis, S Walker, P Cullinan: Systematic review of the effects of domestic paints on asthma related symptoms in people with or without asthma. *Journal of Asthma* 2013, 50:1020-1030.
- [134] UB Nurmatov, N Tagiyeva, S Semple, G Devereux, A Sheikh: Volatile organic compounds and risk of asthma and allergy: a systematic review. *European Respiratory Review* 2015, 24:92-101.
- [135] MJ Mendell: Indoor residential chemical emissions as risk factors for respiratory and allergic effects in children: a review. *Indoor Air* 2007, 17:259-77.
- [136] J Heinrich: Influence of indoor factors in dwellings on the development of childhood asthma. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 2011, 214:1-25.
- [137] H Harving, R Dahl, L Møhlhave: Lung function and bronchial reactivity in asthmatics during exposure to volatile organic compounds. *American Review of Respiratory Disease* 1991, 143:751-754.
- [138] GP Pappas, RJ Herbert, W Henderson, J Koenig, B Stover, S Barnhart: The respiratory effects of volatile organic compounds. *International journal of occupational and environmental health* 2000, 6:1-8.
- [139] HS Koren, RB Devlin: Human Upper Respiratory Tract Responses to Inhaled Pollutants with Emphasis on Nasal Lavagea. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1992, 641:215-224.
- [140] A Casset, A Purohit, C Marchand, S Le Calve, C Donnay, B Uring-Lambert, S Bahram, G Pauli, F de Blay: [The bronchial response to inhaled formaldehyde]. *Revue des Maladies Respiratoires* 2006, 23:3S25-34.
- [141] V Ezratty, M Bonay, C Neukirch, G Orset-Guillossou, M Dehoux, S Koscielny, PA Cabanes, J Lambrozo, M Aubier: Effect of formaldehyde on asthmatic response to inhaled allergen challenge. *Environmental Health Perspectives* 2007, 115:210-4.
- [142] I Lang, T Bruckner, G Triebig: Formaldehyde and chemosensory irritation in humans: a controlled human exposure study. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2008, 50:23-36.
- [143] J Raven, C Ingram, M Bailey, D Johns, E Walters, M Abramson: The effects on asthmatics of exposure to a conventional water-based and a volatile organic compound-free paint. *European Respiratory Journal* 1997, 10:563-566.
- [144] L Ernstgård, A Löf, G Wieslander, D Norbäck, G Johanson: Acute effects of some volatile organic compounds emitted from water-based paints. *Journal of occupational and environmental medicine* 2007, 49:880-889.
- [145] G Wieslander, D Norbäck, T Lindgren: Experimental exposure to propylene glycol mist in aviation emergency training: acute ocular and respiratory effects. *Occupational and environmental medicine* 2001, 58:649-655.
- [146] S Bakand, A Hayes: Troubleshooting methods for toxicity testing of airborne chemicals in vitro. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 2010, 61:76-85.

- [147] AO Gamer, E Leibold, K Deckardt, B Kittel, W Kaufmann, HA Tennekes, B van Ravenzwaay: The effects of styrene on lung cells in female mice and rats. *Food and Chemical Toxicology* 2004, 42:1655-67.
- [148] M Ban, I Langonne, N Huguet, E Pepin, G Morel: Inhaled chemicals may enhance allergic airway inflammation in ovalbumin-sensitised mice. *Toxicology* 2006, 226:161-71.
- [149] H Fujimaki, S Tin Tin Win, S Yamamoto, D Nakajima, S Goto: The expression of nerve growth factor in mice lung following low-level toluene exposure. *Toxicology letters* 2009, 191:240-5.
- [150] U Bönisch, A Böhme, T Kohajda, I Mögel, N Schütze, M von Bergen, JC Simon, I Lehmann, T Polte: Volatile organic compounds enhance allergic airway inflammation in an experimental mouse model. *PLoS One* 2012, 7:e39817.
- [151] A Swiecichowski, K Long, M Miller, G Leikauf: Formaldehyde-induced airway hyperreactivity in vivo and ex vivo in guinea pigs. *Environmental research* 1993, 61:185-199.
- [152] T Kita, M Fujimura, S Myou, Y Ishiura, M Abo, N Katayama, M Nishitsuji, Y Yoshimi, S Nomura, Y Oribe: Potentiation of allergic bronchoconstriction by repeated exposure to formaldehyde in guinea-pigs in vivo. *Clinical & Experimental Allergy* 2003, 33:1747-1753.
- [153] K Nandate, T Ishidao, H Hori, Y Morimoto, M Ogata: [The effect of formaldehyde exposure on cytokine production in murine alveolar macrophages]. *Journal of University of Occupational and Environmental Health* 2003, 25:197-205.
- [154] R Ashton, B De Wever, HW Fuchs, M Gaca, E Hill, C Krul, A Poth, EL Roggen: State of the art on alternative methods to animal testing from an industrial point of view: ready for regulation? *Alternatives to Animal Experiments* 2014, 31:357.
- [155] EL Roggen, NK Soni, GR Verheyen: Respiratory immunotoxicity: an in vitro assessment. *Toxicology In Vitro* 2006, 20:1249-64.
- [156] PC Avila, RP Schleimer: Airway Epithelium. In: *Allergy and Allergic Diseases*: Wiley-Blackwell; 2009: 366-397.
- [157] A Carterson, KH zu Bentrup, C Ott, M Clarke, D Pierson, C Vanderburg, K Buchanan, C Nickerson, M Schurr: A549 lung epithelial cells grown as three-dimensional aggregates: alternative tissue culture model for *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Infection and immunity* 2005, 73:1129-1140.
- [158] S Verstraelen, K Bloemen, I Nelissen, H Witters, G Schoeters, R Van Den Heuvel: Cell types involved in allergic asthma and their use in in vitro models to assess respiratory sensitization. *Toxicology In Vitro* 2008, 22:1419-31.
- [159] D-D Kim: In vitro cellular models for nasal drug absorption studies. In: *Drug Absorption Studies*: Springer; 2008: 216-234.
- [160] K BeruBe, M Aufderheide, D Breheny, R Clothier, R Combes, R Duffin, B Forbes, M Gaca, A Gray, I Hall, et al: In vitro models of inhalation toxicity and disease. The report of a FRAME workshop. *Alternatives to Laboratory Animals* 2009, 37:89-141.
- [161] K BéruBé, Z Prytherch, C Job, T Hughes: Human primary bronchial lung cell constructs: the new respiratory models. *Toxicology* 2010, 278:311-318.
- [162] MJ Whitcutt, KB Adler, R Wu: A biphasic chamber system for maintaining polarity of differentiation of cultured respiratory tract epithelial cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 1988, 24:420-8.
- [163] R Wu, GH Sato, MJ Whitcutt: Developing differentiated epithelial cell cultures: airway epithelial cells. *Fundamental and Applied Toxicology* 1986, 6:580-90.
- [164] PM de Jong, MA van Sterkenburg, JA Kempenaar, JH Dijkman, M Ponec: Serial culturing of human bronchial epithelial cells derived from biopsies. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 1993, 29A:379-87.
- [165] TE Gray, K Guzman, CW Davis, LH Abdullah, P Nettesheim: Mucociliary differentiation of serially passaged normal human tracheobronchial epithelial cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 1996, 14:104-12.
- [166] ML Fulcher, SH Randell: Human nasal and tracheo-bronchial respiratory epithelial cell culture. *Methods in Molecular Biology* 2013, 945:109-21.

- [167] MM Choe, AA Tomei, MA Swartz: Physiological 3D tissue model of the airway wall and mucosa. *NATURE PROTOCOLS-ELECTRONIC EDITION*- 2006, 1:357.
- [168] WL Huang Song , Derouette Jean-Paul, Constant Samuel: In vitro organ culture models of asthma. *Drug Discovery Today: Disease Models* 2009, 6.
- [169] F de Borja Callejas, A Martinez-Anton, I Alobid, M Fuentes, J Cortijo, C Picado, J Roca-Ferrer, J Mullol: Reconstituted human upper airway epithelium as 3-d in vitro model for nasal polyposis. *PLoS One* 2014, 9:e100537.
- [170] A Dvorak, AE Tilley, R Shaykhiev, R Wang, RG Crystal: Do airway epithelium air-liquid cultures represent the in vivo airway epithelium transcriptome? *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2011, 44:465-73.
- [171] A Baxter, S Thain, A Banerjee, L Haswell, A Parmar, G Phillips, E Minet: Targeted omics analyses, and metabolic enzyme activity assays demonstrate maintenance of key mucociliary characteristics in long term cultures of reconstituted human airway epithelia. *Toxicology in Vitro* 2015, 29:864-875.
- [172] UG Sauer, S Vogel, A Hess, SN Kolle, L Ma-Hock, B van Ravenzwaay, R Landsiedel: In vivo–in vitro comparison of acute respiratory tract toxicity using human 3D airway epithelial models and human A549 and murine 3T3 monolayer cell systems. *Toxicology in Vitro* 2013, 27:174-190.
- [173] D Balharry, K Sexton, KA BeruBe: An in vitro approach to assess the toxicity of inhaled tobacco smoke components: nicotine, cadmium, formaldehyde and urethane. *Toxicology* 2008, 244:66-76.
- [174] M Talikka, R Kostadinova, Y Xiang, C Mathis, A Sewer, S Majeed, D Kuehn, S Frentzel, C Merg, M Geertz, et al: The Response of Human Nasal and Bronchial Organotypic Tissue Cultures to Repeated Whole Cigarette Smoke Exposure. *International Journal of Toxicology* 2014.
- [175] CF Kuper, M Gröllers-Mulderij, T Maarschalkerweerd, NM Meulendijks, A Reus, F van Acker, EK Zondervan-van den Beuken, ME Wouters, S Bijlsma, IM Kooter: Toxicity assessment of aggregated/agglomerated cerium oxide nanoparticles in an in vitro 3D airway model: the influence of mucociliary clearance. *Toxicology in Vitro* 2015, 29:389-397.
- [176] S Huang, L Wiszniewski, S Constant, E Roggen: Potential of in vitro reconstituted 3D human airway epithelia (MucilAir) to assess respiratory sensitizers. *Toxicology In Vitro* 2013, 27:1151-6.
- [177] FB Mohamed, I Garcia-Verdugo, M Medina, V Balloy, M Chignard, R Ramphal, L Touqui: A crucial role of Flagellin in the induction of airway mucus production by *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* 2012.
- [178] S Crespin, M Bacchetta, J Bou Saab, P Tantilipikorn, J Bellec, T Dudez, TH Nguyen, BR Kwak, JS Lacroix, S Huang, et al: Cx26 regulates proliferation of repairing basal airway epithelial cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2014, 52:152-60.
- [179] S Crespin, M Bacchetta, S Huang, T Dudez, L Wiszniewski, M Chanson: Approaches to study differentiation and repair of human airway epithelial cells. *Methods in Molecular Biology* 2011, 742:173-85.
- [180] SE Anderson, SS Khurshid, BJ Meade, E Lukomska, JR Wells: Toxicological analysis of limonene reaction products using an in vitro exposure system. *Toxicology In Vitro* 2013, 27:721-30.
- [181] AC Schamberger, N Mise, J Jia, E Genoyer, AO Yildirim, S Meiners, O Eickelberg: Cigarette smoke-induced disruption of bronchial epithelial tight junctions is prevented by transforming growth factor-beta. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2014, 50:1040-52.
- [182] L Boubliil, E Assemat, MC Borot, S Boland, L Martinon, J Sciare, A Baeza-Squiban: Development of a repeated exposure protocol of human bronchial epithelium in vitro to study the long-term effects of atmospheric particles. *Toxicology In Vitro* 2013, 27:533-42.
- [183] SG Klein, J Hennen, T Serchi, B Blomeke, AC Gutleb: Potential of coculture in vitro models to study inflammatory and sensitizing effects of particles on the lung. *Toxicology In Vitro* 2011, 25:1516-34.
- [184] BM Rothen-Rutishauser, SG Kiama, P Gehr: A three-dimensional cellular model of the human respiratory tract to study the interaction with particles. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2005, 32:281-9.

- [185] V Paget, S Dekali, T Kortulewski, R Grall, C Gamez, K Blazy, O Aguerre-Chariol, S Chevillard, A Braun, P Rat: Specific Uptake and Genotoxicity Induced by Polystyrene Nanobeads with Distinct Surface Chemistry on Human Lung Epithelial Cells and Macrophages. *PLoS One* 2015, 10.
- [186] BK Tarkington, R Wu, W-M Sun, KJ Nikula, DW Wilson, JA Last: In vitro exposure of tracheobronchial epithelial cells and of tracheal explants to ozone. *Toxicology* 1994, 88:51-68.
- [187] B Wallaert, O Fahy, A Tsicopoulos, P Gosset, A Tonnel: Experimental systems for mechanistic studies of toxicant induced lung inflammation. *Toxicology letters* 2000, 112:157-163.
- [188] RE Rasmussen: In vitro systems for exposure of lung cells to NO₂ and O₃. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues* 1984, 13:397-411.
- [189] C Voisin, C Aerts, E Jakubczk, A Tonnel: [La culture cellulaire en phase gazeuse. Un nouveau modele experimental d'etude in vitro des activites des macrophages alveolaires]. *Bulletin Europeen de Physiopathologie Respiratoire* 1976, 13:69-82.
- [190] C Voisin, C Aerts, E Jakubsczak, J Houdret, A Tonnel: Effects du bioxyde d'azote sur les macrophages alvéolaires en survie en phase gazeuse: un nouveau modèle experimental pour l'étude in vitro de la cytotoxicité des gaz nocifs. *Bulletin Europeen de Physiopathologie Respiratoire* 1977, 13:137-144.
- [191] C Voisin, C Aerts, A Tonnel, L Houdret, P Ramon: Mise en survie en phase gazeuse et reconstitution in vitro du microenvironnement naturel des macrophages alvéolaires. *Pathologie Biologie* 1975, 23:453-459.
- [192] P Zamora, R Gregory, A Li, A Brooks: An in vitro model for the exposure of lung alveolar epithelial cells to toxic gases. *Journal of environmental pathology, toxicology and oncology: official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer* 1985, 7:159-168.
- [193] W Sun, R Wu, JA Last: Effects of exposure to environmental tobacco smoke on a human tracheobronchial epithelial cell line. *Toxicology* 1995, 100:163-174.
- [194] M Aufderheide, U Mohr: CULTEX—a new system and technique for the cultivation and exposure of cells at the air/liquid interface. *Experimental and Toxicologic Pathology* 1999, 51:489-490.
- [195] M Aufderheide: Direct exposure methods for testing native atmospheres. *Experimental and Toxicologic Pathology* 2005, 57 Suppl 1:213-26.
- [196] M Aufderheide: An efficient approach to study the toxicological effects of complex mixtures. *Experimental and Toxicologic Pathology* 2008, 60:163-180.
- [197] M Aufderheide: Direct exposure methods for testing native atmospheres. *Experimental and Toxicologic Pathology* 2005, 57:213-226.
- [198] M Aufderheide, JW Knebel, D Ritter: Novel approaches for studying pulmonary toxicity in vitro. *Toxicology Letters* 2003, 140-141:205-11.
- [199] J Knebel, D Ritter, M Aufderheide: Exposure of human lung cells to native diesel motor exhaust—development of an optimized in vitro test strategy. *Toxicology in Vitro* 2002, 16:185-192.
- [200] D Ritter, JW Knebel, M Aufderheide: In vitro exposure of isolated cells to native gaseous compounds Development and validation of an optimized system for human lung cells. *Experimental and Toxicologic Pathology* 2001, 53:373-386.
- [201] L Wolz, G Krause, G Scherer, M Aufderheide, U Mohr: In vitro genotoxicity assay of sidestream smoke using a human bronchial epithelial cell line. *Food and chemical toxicology* 2002, 40:845-850.
- [202] F Pariselli, MG Sacco, D Rembges: An optimized method for in vitro exposure of human derived lung cells to volatile chemicals. *Experimental and Toxicologic Pathology* 2009, 61:33-9.
- [203] M Loxham, D Davies, C Blume: Epithelial function and dysfunction in asthma. *Clinical & Experimental Allergy* 2014, 44:1299-1313.
- [204] PE Kastner, S Le Calve, W Zheng, A Casset, F Pons: A dynamic system for single and repeated exposure of airway epithelial cells to gaseous pollutants. *Toxicology In Vitro* 2013, 27:632-40.
- [205] C Persoz, S Achard, C Leleu, I Momas, N Seta: An in vitro model to evaluate the inflammatory response after gaseous formaldehyde exposure of lung epithelial cells. *Toxicology Letters* 2010, 195:99-105.

- [206] C Roder-Stolinski, G Fischader, GJ Oostingh, K Eder, A Duschl, I Lehmann: Chlorobenzene induces the NF-kappa B and p38 MAP kinase pathways in lung epithelial cells. *Inhalation Toxicology* 2008, 20:813-20.
- [207] F Pariselli, MG Sacco, J Ponti, D Rembges: Effects of toluene and benzene air mixtures on human lung cells (A549). *Experimental and Toxicologic Pathology* 2009, 61:381-6.
- [208] G Fischader, C Roder-Stolinski, G Wichmann, K Nieber, I Lehmann: Release of MCP-1 and IL-8 from lung epithelial cells exposed to volatile organic compounds. *Toxicology In Vitro* 2008, 22:359-66.
- [209] R Feltens, I Mogel, C Roder-Stolinski, JC Simon, G Herberth, I Lehmann: Chlorobenzene induces oxidative stress in human lung epithelial cells in vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2010, 242:100-8.
- [210] I Lehmann, C Roder-Stolinski, K Nieber, G Fischader: In vitro models for the assessment of inflammatory and immuno-modulatory effects of the volatile organic compound chlorobenzene. *Experimental and Toxicologic Pathology* 2008, 60:185-93.
- [211] BF Cachon, S Firmin, A Verdin, L Ayi-Fanou, S Billet, F Cazier, PJ Martin, F Aissi, D Courcot, A Sanni: Proinflammatory effects and oxidative stress within human bronchial epithelial cells exposed to atmospheric particulate matter (PM 2.5 and PM> 2.5) collected from Cotonou, Benin. *Environmental Pollution* 2014, 185:340-351.
- [212] J Gosepath, N Grebneva, J Brieger, WJ Mann: Evaluation of inflammatory reactions and genotoxic effects after exposure of nasal respiratory epithelia to benzene. *journal for oto-rhino-laryngology and its related specialties*. 2003, 65:348-52.
- [213] FA Wichmann, A Muller, LE Busi, N Cianni, L Massolo, U Schlink, A Porta, PD Sly: Increased asthma and respiratory symptoms in children exposed to petrochemical pollution. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2009, 123:632-8.
- [214] PE Kastner, A Casset, F Pons: Formaldehyde interferes with airway epithelium integrity and functions in a dose- and time-dependent manner. *Toxicology Letters* 2011, 200:109-16.
- [215] S Bakand, C Winder, C Khalil, A Hayes: A novel in vitro exposure technique for toxicity testing of selected volatile organic compounds. *Journal of Environmental Monitoring* 2006, 8:100-5.
- [216] R Gminski, T Tang, V Mersch-Sundermann: Cytotoxicity and genotoxicity in human lung epithelial A549 cells caused by airborne volatile organic compounds emitted from pine wood and oriented strand boards. *Toxicology letters* 2010, 196:33-41.
- [217] C Persoz, S Achard, I Momas, N Seta: Inflammatory response modulation of airway epithelial cells exposed to formaldehyde. *Toxicology letters* 2012, 211:159-63.
- [218] C Persoz, C Leleu, S Achard, M Fasseu, J Menotti, P Meneceur, I Momas, F Derouin, N Seta: Sequential air-liquid exposure of human respiratory cells to chemical and biological pollutants. *Toxicology Letters* 2011, 207:53-9.
- [219] JE Rager, L Smeester, I Jaspers, KG Sexton, RC Fry: Epigenetic changes induced by air toxics: formaldehyde exposure alters miRNA expression profiles in human lung cells. *Environmental Health Perspectives* 2011, 119:494-500.
- [220] C Roder-Stolinski, G Fischader, GJ Oostingh, R Feltens, F Kohse, M von Bergen, N Morbt, K Eder, A Duschl, I Lehmann: Styrene induces an inflammatory response in human lung epithelial cells via oxidative stress and NF-kappaB activation. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2008, 231:241-7.
- [221] BE Saltzman: The occupational environment : its evaluation, control and management - Chapitre 14 - Preparation of known concentrations of air contaminants American Industrial Hygiene association 2003.
- [222] G Bardet, S Achard, T Loret, V Desauziers, I Momas, N Seta: A model of human nasal epithelial cells adapted for direct and repeated exposure to airborne pollutants. *Toxicology Letters* 2014, 229:144-9.
- [223] D Bourdin, V Desauziers: Development of SPME on-fiber derivatization for the sampling of formaldehyde and other carbonyl compounds in indoor air. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2014, 406:317-28.
- [224] DM Comer, JS Elborn, M Ennis: Comparison of nasal and bronchial epithelial cells obtained from patients with COPD. *PLoS One* 2012, 7:e32924.

- [225] J Parker, S Sarlang, S Thavagnanam, G Williamson, D O'Donoghue, R Villenave, U Power, M Shields, L Heaney, G Skibinski: A 3-D well-differentiated model of pediatric bronchial epithelium demonstrates unstimulated morphological differences between asthmatic and nonasthmatic cells. *Pediatric research* 2010, 67:17-22.
- [226] AA Reus, WJ Maas, HT Jansen, S Constant, YC Staal, JJ van Triel, CF Kuper: Feasibility of a 3D human airway epithelial model to study respiratory absorption. *Toxicology In Vitro* 2014, 28:258-64.
- [227] S Constant, S Huang, J-P Derouette, L Wiszniewski: MucilAir: a novel in vitro human 3D airway epithelium model for assessing the potential hazard of nanoparticles and chemical compounds. *Toxicology letters* 2008, 180:S233.
- [228] M Ali, EP Lillehoj, Y Park, Y Kyo, KC Kim: Analysis of the proteome of human airway epithelial secretions. *Proteome Science* 2011, 9.
- [229] C Koehler, C Ginzkey, G Friehs, S Hackenberg, K Froelich, A Scherzed, M Burghartz, M Kessler, N Kleinsasser: Aspects of nitrogen dioxide toxicity in environmental urban concentrations in human nasal epithelium. *Toxicology and applied pharmacology* 2010, 245:219-225.
- [230] C Beisswenger, J Platz, C Seifart, C Vogelmeier, R Bals: Exposure of differentiated airway epithelial cells to volatile smoke in vitro. *Respiration* 2004, 71:402-9.
- [231] NE Davidovich, Y Kloog, M Wolf, D Elad: Mechanophysical stimulations of mucin secretion in cultures of nasal epithelial cells. *Biophysical Journal* 2011, 100:2855-64.
- [232] C Dassonville, C Demattei, AM Laurent, Y Le Moullec, N Seta, I Momas: Assessment and predictor determination of indoor aldehyde levels in Paris newborn babies' homes. *Indoor Air* 2009, 19:314-23.
- [233] G Wichmann, J Mühlenberg, G Fischäder, C Kulla, M Rehwagen, O Herbarth, I Lehmann: An experimental model for the determination of immunomodulating effects by volatile compounds. *Toxicology in Vitro* 2005, 19:685-693.
- [234] GD Nielsen, ST Larsen, P Wolkoff: Recent trend in risk assessment of formaldehyde exposures from indoor air. *Archives of toxicology* 2013, 87:73-98.
- [235] AB Hill: The environment and disease : association or causation? *Journal of the Royal Society of Medicine* 1965, 58:295-300.
- [236] S Bakand, C Winder, C Khalil, A Hayes: An experimental in vitro model for dynamic direct exposure of human cells to airborne contaminants. *Toxicology letters* 2006, 165:1-10.
- [237] T Salthammer: Environmental Test Chambers and Cells. Book *Organic Indoor Air Pollutants: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*; 2009: 101-115.
- [238] S Kim, Y-K Choi, K-W Park, JT Kim: Test methods and reduction of organic pollutant compound emissions from wood-based building and furniture materials. *Bioresource Technology* 2010, 101:6562-6568.
- [239] A Rodgman, CJ Smith, TA Perfetti: The composition of cigarette smoke: a retrospective, with emphasis on polycyclic components. *Human and Experimental Toxicology* 2000, 19:573-95.
- [240] J Phillips, B Kluss, A Richter, E Massey: Exposure of bronchial epithelial cells to whole cigarette smoke: assessment of cellular responses. *Alternatives to Laboratory Animals* 2005, 33:239-48.
- [241] DM Comer, JS Elborn, M Ennis: Inflammatory and cytotoxic effects of acrolein, nicotine, acetaldehyde and cigarette smoke extract on human nasal epithelial cells. *BMC Pulmonary Medicine* 2014, 14:32.
- [242] MH Hudy, D Proud: Cigarette smoke enhances human rhinovirus-induced CXCL8 production via HuR-mediated mRNA stabilization in human airway epithelial cells. *Respiratory Research* 2013, 14:88.
- [243] A Kode, SR Yang, I Rahman: Differential effects of cigarette smoke on oxidative stress and proinflammatory cytokine release in primary human airway epithelial cells and in a variety of transformed alveolar epithelial cells. *Respiratory Research* 2006, 7:132.
- [244] H van der Vaart, DS Postma, W Timens, NH ten Hacken: Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review. *Thorax* 2004, 59:713-21.

- [245] AE Pouli, DG Hatzinikolaou, C Piperi, A Stavridou, MC Psallidopoulos, JC Stavrides: The cytotoxic effect of volatile organic compounds of the gas phase of cigarette smoke on lung epithelial cells. *Free Radical Biology and Medicine* 2003, 34:345-55.
- [246] GR Hellermann, SB Nagy, X Kong, RF Lockey, SS Mohapatra: Mechanism of cigarette smoke condensate-induced acute inflammatory response in human bronchial epithelial cells. *Respiratory Research* 2002, 3:22.
- [247] A Richter, RA O'Donnell, RM Powell, MW Sanders, ST Holgate, R Djukanovic, DE Davies: Autocrine ligands for the epidermal growth factor receptor mediate interleukin-8 release from bronchial epithelial cells in response to cigarette smoke. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2002, 27:85-90.
- [248] H Wang, X Liu, T Umino, CM Skold, Y Zhu, T Kohyama, JR Spurzem, DJ Romberger, SI Rennard: Cigarette smoke inhibits human bronchial epithelial cell repair processes. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2001, 25:772-9.
- [249] AL Innes, PG Woodruff, RE Ferrando, S Donnelly, GM Dolganov, SC Lazarus, JV Fahy: Epithelial mucin stores are increased in the large airways of smokers with airflow obstruction. *Chest* 2006, 130:1102-8.
- [250] N Pearce, N Ait-Khaled, R Beasley, J Mallol, U Keil, E Mitchell, C Robertson: Worldwide trends in the prevalence of asthma symptoms: phase III of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Thorax* 2007, 62:758-766.
- [251] H-R Paur, FR Cassee, J Teeguarden, H Fissan, S Diabate, M Aufderheide, WG Kreyling, O Hänninen, G Kasper, M Riediker: In-vitro cell exposure studies for the assessment of nanoparticle toxicity in the lung—a dialog between aerosol science and biology. *Journal of Aerosol Science* 2011, 42:668-692.
- [252] S Mülhopt, S Diabate, T Krebs, C Weiss, H Paur: Lung toxicity determination by in vitro exposure at the air liquid interface with an integrated online dose measurement. In: *Journal of Physics: Conference Series*; 2009. 012008.
- [253] D Azzopardi, LE Haswell, G Foss-Smith, K Hewitt, N Asquith, S Corke, G Phillips: Evaluation of an air-liquid interface cell culture model for studies on the inflammatory and cytotoxic responses to tobacco smoke aerosols. *Toxicology in Vitro* 2015, 29:1720-1728.
- [254] S Bakand, A Hayes, C Winder: An integrated in vitro approach for toxicity testing of airborne contaminants. *Journal of Toxicology and Environmental Health A* 2007, 70:1604-12.
- [255] JL Sporty, L Horáková, C Ehrhardt: In vitro cell culture models for the assessment of pulmonary drug disposition. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology* 2008.
- [256] A Druilhe, J-M Zahm, L Benayoun, D El Mehdi, M Grandsaigne, M-C Dombret, I Mosnier, B Feger, J Depondt, M Aubier, et al: Epithelium Expression and Function of Retinoid Receptors in Asthma. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2008, 38:276-282.
- [257] M Aufderheide, U Mohr: CULTEX—an alternative technique for cultivation and exposure of cells of the respiratory tract to airborne pollutants at the air/liquid interface. *Experimental and Toxicologic Pathology* 2000, 52:265-270.
- [258] D Elad, S Naftali, M Rosenfeld, M Wolf: Physical stresses at the air-wall interface of the human nasal cavity during breathing. *Journal of Applied Physiology* 2006, 100:1003-1010.
- [259] KF Chung: Chapter 27 - Cytokines. In: *Asthma and COPD (Second Edition)* Edited by PJBMDIRC Thomson. Oxford: Academic Press; 2009: 327-341.
- [260] AC Schamberger, CA Staab-Weijnitz, N Mise-Racek, O Eickelberg: Cigarette smoke alters primary human bronchial epithelial cell differentiation at the air-liquid interface. *Scientific reports* 2015, 5.
- [261] SA Cochrane, JH Arts, C Ehnes, S Hindle, HM Hollnagel, A Poole, H Suto, I Kimber: Thresholds in chemical respiratory sensitisation. *Toxicology* 2015, 333:179-194.
- [262] I Kimber, RJ Dearman, DA Basketter, DR Boverhof: Chemical respiratory allergy: reverse engineering an adverse outcome pathway. *Toxicology* 2014, 318:32-39.

- [263] MJ Randall, SF Kostin, EJ Burgess, LR Hoyt, JL Ather, LK Lundblad, ME Poynter: Anti-inflammatory effects of levalbuterol-induced 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity in airway epithelial cells. *Frontiers in endocrinology* 2014, 5.
- [264] J Lovén, N Svitacheva, A Jerre, A Miller-Larsson, S Korn: Anti-inflammatory activity of β 2-agonists in primary lung epithelial cells is independent of glucocorticoid receptor. *European Respiratory Journal* 2007, 30:848-856.
- [265] O Eickelberg, M Roth, R Lörx, V Bruce, J Rüdiger, M Johnson, L-H Block: Ligand-independent activation of the glucocorticoid receptor by β 2-adrenergic receptor agonists in primary human lung fibroblasts and vascular smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry* 1999, 274:1005-1010.
- [266] WK Lee, M Ramanathan, EW Spannhake, AP Lane: The cigarette smoke component acrolein inhibits expression of the innate immune components IL-8 and human beta-defensin 2 by sinonasal epithelial cells. *American journal of rhinology* 2007, 21:658-663.
- [267] M-Y Lan, C-Y Ho, T-C Lee, A-H Yang: Cigarette smoke extract induces cytotoxicity on human nasal epithelial cells. *American journal of rhinology* 2007, 21:218-223.

Annexes

Liste des annexes

A Certificat d'analyse hAECN	161
B Certificats d'analyse des Epithéliums hRNE	162
C Dispositif de génération d'atmosphère de COV (Dépôt de peinture et surface à peindre)	166
D Chromatogrammes	167
E Immunomarquage de l'antigène Ki67	169
F Article 1	171
G Article 2	179

Annexe A

CERTIFICAT D'ANALYSE DES CELLULES hAECN

Certificate of analysis

Epithelix

Certificate of Analysis

Batch Number: AB014801

Product Code: EP07

Product Name: human Airway Epithelial Cells of Nasal origin

Donor Information

Age	18
Sex	Male
Origin	Not known
Smoker	Not known
Pathology	No pathology reported

Cell Information

Cell Type	hAEC/Nasal
Date of cryo-preservation	May 2010

Quality Control

TEST	Results	
Sterility	Yes	***
Mycoplasma ⁽¹⁾	Negative	***
Number of cells per vial	10 ⁶ cells	***
Viability	> 80%	(≥ 80%)
Passage	1	(≤ 2)
Virus Testing:		
HIV-1 and HIV-2 ⁽²⁾	Negative	***
Hepatitis B ⁽³⁾	Negative	***
Hepatitis C ⁽⁴⁾	Negative	***

Notice: This product should be handled with all due care because of its human origin.

CSO Song Huang
Signature



(1) Plasmid™, based on activation of TLR-2; (2) Anti-HIV-1 and -2 antibodies; (3) HBs antigen, anti HBc antibody; (4) Anti HCV antibody

Epithelix Sàrl

14, Chemin des Aulx – CH-1228 Plan-les-Ouates – Genève
+41 (0) 22 794 65 15 / Fax : +41 (0) 22 794 65 17
epithelix@epithelix.com – www.epithelix.com

Annexe B

CERTIFICATS D'ANALYSE DES EPITHELIUMS hRNE

Numéro de lot : MP0006 correspond aux épithéliums MD (Multi-donneurs)

Numéro de lot : HF-MP0006 correspond aux épithéliums HF-MD (Multi-donneurs avec fibroblastes humains)

MD Certificate of Analysis **Epithelix**

Certificate of Analysis

Product Code: EP01
Product Name: MucilAir

Batch Number: **MP0006**

Donor Information

Donor	14 donors
Sex	Not known
Origin	Not known
Smoker	Not known
Pathology	No pathology reported

Cell Information

Cell Type	hAEC/Nasal
Date of seeding	February 28 th 2013
Date of Airliquid Interface	March 04 th 2013

Quality Control

TEST	Results	
Sterility	Yes	***
Mycoplasma ⁽¹⁾	Negative	***
Tissue Integrity TEER ($\Omega \cdot \text{cm}^2$) [*]	296 +/- 6	(> 200)
Cilia beating frequency (Hz) [*]	8.8 +/- 0.2	(5-12)
Morphology	Normal	***
Mucus	Present	(Refringent)
Virus Testing: HIV-1 and HIV-2 ⁽²⁾	Negative	***
Hepatitis B ⁽³⁾	Negative	***
Hepatitis C ⁽⁴⁾	Negative	***

* 12 MucilAir[®] average value

Notice: This product should be handled with all due care because of its human origin.

CSO Song Huang
Signature



(1) Mycoplasma detection with MycoAer[®] (Lorain); (2) Anti-HIV-1 and -2 antibodies; (3) HBs antigen, anti HBc antibody; (4) Anti HCV antibody

Epithelix Sarl
14, Chemin des Auls - CH-1228 Plan-les-Ouates - Genève
+41 (0) 22 794 65 15 / Fax : +41 (0) 22 794 65 17
epithelix@epithelix.com - www.epithelix.com

HF-MD Certificate of Analysis **Epithelix**

Certificate of Analysis

Product Code: EP20
Product Name: Nasal-MucilAir-HF (Co-culture with fibroblasts)

Batch Number: **HF-MP0006**

Donor Information

Pool of Donor	14 donors
---------------	-----------

Cell Information

Cell Type	hAEC/Nasal
Date of seeding	September 8 th 2014
Date of Airliquid Interface	September 12 th 2014
Date of fibroblasts co-cultured	September 29 th 2014

Quality Control

TEST	Results	
Sterility	Yes	***
Mycoplasma ⁽¹⁾	Negative	***
Tissue Integrity TEER ($\Omega \cdot \text{cm}^2$) [*]	364 +/- 7	(> 200)
Cilia beating frequency (Hz) [*]	7.9 +/- 0.4	(5-12)
Morphology	Normal	***
Mucus	Present	(Refringent)
Virus Testing: HIV-1 and HIV-2 ⁽²⁾	Negative	***
Hepatitis B ⁽³⁾	Negative	***
Hepatitis C ⁽⁴⁾	Negative	***

* 12 MucilAir[®] average value

Notice: This product should be handled with all due care because of its human origin.

CSO Song Huang
Signature



(1) Mycoplasma detection with MycoAer[®] (Lorain); (2) Anti-HIV-1 and -2 antibodies; (3) HBs antigen, anti HBc antibody; (4) Anti HCV antibody

Epithelix Sarl
14, Chemin des Auls - CH-1228 Plan-les-Ouates - Genève
+41 (0) 22 794 65 15 / Fax : +41 (0) 22 794 65 17
epithelix@epithelix.com - www.epithelix.com

Numéro de lot : MD 009102 correspond au D1 (Epithélium reconstitué à partir des cellules d'un seul donneur)

Numéro de lot : MD 025701 correspond au D2 (Epithélium reconstitué à partir des cellules d'un seul donneur)

D1 Epithelix

Certificate of Analysis

Product Code: EP01 Batch Number: MD009102
Product Name: MucilAir

Test	Results
Donor Information	
Age	63
Sex	Female
Pathology	No pathology reported
Cell Type	hAEC/Naasi
Date of seeding	30 th of November 2011
Sterility	Negative
Virus Testing	
HIV-1 PCR Test	Negative
HBV DNA PCR test	Negative
HCV RNA PCR test	Negative
Tissue Integrity (TEER)	Normal

CSO Song Huang
Signature



D2 Epithelix

Certificate of Analysis

Product Code: EP01 Batch Number: MD025701
Product Name: MucilAir

Test	Results
Donor Information	
Age	27
Sex	Female
Pathology	No pathology reported
Cell Type	hAEC/Naasi
Date of seeding	26 th October 2011
Sterility	Negative
Virus Testing	
HIV-1 PCR Test	Negative
HBV DNA PCR test	Negative
HCV RNA PCR test	Negative
Tissue Integrity (TEER)	Normal

CSO Song Huang
Signature



Numéro de lot : MD029900 correspond au D3 (Epithélium reconstitué à partir des cellules d'un seul donneur)

Numéro de lot : MD029600 correspond au D4 (Epithélium reconstitué à partir des cellules d'un seul donneur)

D3 Epithelix

Certificate of Analysis

Product Code: EP01 Batch Number: MD030200
 Product Name: MucilAir

Donor Information

Age	41
Sex	Male
Origin	Not Known
Smoker	Not Known
Pathology	No pathology reported

Cell Information

Cell Type	hAEC/Nasal
Date of seeding	17 th February 2012
Date of Airliquid Interface	21 st February 2012

Quality Control

TEST	Results	
Sterility	Yes	***
Mycoplasma ⁽¹⁾	Negative	***
Tissue Integrity TEER ($\Omega \text{ cm}^2$) ⁽²⁾	430 +/- 21	(> 200)
Cilia beating frequency (Hz) ⁽³⁾	8.2 +/- 0.2	(5-12)
Morphology	Normal	***
Mucus	Present	(Refringent)
Virus Testing:		
HIV-1 and HIV-2 ⁽⁴⁾	Negative	***
Hepatitis B ⁽⁵⁾	Negative	***
Hepatitis C ⁽⁶⁾	Negative	***

* 12 MucilAirTM average value

Notice: This product should be handled with all due care because of its human origin.

CSO Song Huang
Signature



D4 Epithelix

Certificate of Analysis

Product Code: EP01 Batch Number: MD029600
 Product Name: MucilAir

Donor Information

Age	58
Sex	Male
Origin	Caucasian
Smoker	No
Pathology	No pathology reported

Cell Information

Cell Type	hAEC/Nasal
Date of seeding	27 th January 2012
Date of Airliquid Interface	01 st February 2012

Quality Control

TEST	Results	
Sterility	Yes	***
Mycoplasma ⁽¹⁾	Negative	***
Tissue Integrity TEER ($\Omega \text{ cm}^2$) ⁽²⁾	285 +/- 5	(> 200)
Cilia beating frequency (Hz) ⁽³⁾	7.9 +/- 0.2	(5-12)
Morphology	Normal	***
Mucus	Present	(Refringent)
Virus Testing:		
HIV-1 and HIV-2 ⁽⁴⁾	Negative	***
Hepatitis B ⁽⁵⁾	Negative	***
Hepatitis C ⁽⁶⁾	Negative	***

* 12 MucilAirTM average value

Notice: This product should be handled with all due care because of its human origin.

CSO Song Huang
Signature



(1) Plasmid TestTM, based on activation of TLR-2, (2) Anti-HIV-1 and -2 antibodies, (3) HBs antigen, anti HBs antibody; (4) Anti HIV antibody; (5) Hepatitis B antibody; (6) Anti HCV antibody

Epithelix Sarl
 14, Chemin des Aulx - CH-1228 Plan-les-Ouates - Genève
 +41 (0) 22 794 65 15 / Fax : +41 (0) 22 794 65 17
 epithelix@epithelix.com - www.epithelix.com

Numéro de lot : MD030200 correspond au D5 (Epithélium reconstitué à partir des cellules d'un seul donneur)

D5	Epithelix	
Certificate of Analysis		
Product Code: EP01	Batch Number: MD030200	
Product Name: MucilAir		
Donor Information		
Age	41	
Sex	Male	
Origin	Not Known	
Smoker	Not Known	
Pathology	No pathology reported	
Cell Information		
Cell Type	hAEC/Nasal	
Date of seeding	17 th February 2012	
Date of Airliquid Interface	21 st February 2012	
Quality Control		
TEST	Results	
Sterility	Yes	***
Mycoplasma ⁽¹⁾	Negative	***
Tissue Integrity TEER (Ω cm ²) [*]	430 ± 21	(> 200)
Cilia beating frequency (Hz) [*]	8.2 ± 0.2	(5-12)
Morphology	Normal	***
Matrix	Present	(Refringent)
Virus Testing:		
HIV-1 and HIV-2 ⁽²⁾	Negative	***
Hepatitis B ⁽³⁾	Negative	***
Hepatitis C ⁽⁴⁾	Negative	***
<small>* 12 MucilAirTM average value</small>		
<i>Notice: This product should be handled with all due care because of its human origin.</i>		
		CSO Song Huang Signature
		

Annexe C

GENERATION D'ATMOSPHERES DE COV PAR LES PEINTURES

Dispositif de génération d'atmosphère de COV (Dépôt de peinture et surface à peindre)

Les atmosphères de COV ont été générées à l'aide des paramètres des normes NF EN ISO 16000-9 et NF EN ISO 16000-11.

- **Calcul de la surface à peindre**

Nous avons choisi d'utiliser comme référence pour calculer la surface à peindre les paramètres de la pièce modèle décrite dans la norme NF EN ISO 16000-9. Celle-ci a un volume de 17,4 m³ et une surface des murs de 24 m². La surface de peinture à peindre a été calculée proportionnellement à la chambre en verre de 11 L (0,011 m³). Le calcul suivant a été appliqué : $(24 \cdot 0,011) / 17,4 = 0,0151 \text{ m}^2$ (150 cm²).

Pour réaliser les expérimentations nous avons utilisé une plaque en verre de 15x10 cm.

- **Calcul de la quantité de peinture à déposer**

Pour calculer la quantité de peinture humide à appliquer sur la plaque en verre, nous avons appliqué la formule permettant le calcul de la quantité de produit humide à appliquer sur une surface pour mesurer les émissions de COV. Cette formule figure dans la norme NF EN ISO 16000-11 et se présente sous la forme de :

$$m = (\delta_c \cdot A \cdot \rho) / (\phi \cdot 100)$$

m est la quantité de produit humide à appliquer, en grammes,

δ_c est l'épaisseur du feuil sec choisie pour l'essai, en micromètres (μm),

A est la surface à peindre, en centimètres carrés,

ρ est la masse volumique du produit humide en g/cm³,

ϕ est le contenu solide du produit, exprimé en fraction volumique (%)

Pour les deux peintures (aqueuse et à base de solvants organiques), nous avons déterminé les masses volumiques. La fraction volumique, le feuil sec ont été choisis en prenant les valeurs existantes moyennes.

Sur la base du calcul existant, nous avons appliqué un facteur 10 000 afin de pouvoir déposer de façon homogène la peinture sur la surface à peindre.

Le calcul de la quantité de dépôt de la **peinture aqueuse** est le suivant :

$$m = (40 \cdot 150 \cdot 1,16) / (45 \cdot 100) = 1,55 \text{ g}$$

(Pour une épaisseur de feuil sec de 40 μm , une masse volumique de 1,16 g/cm³, une fraction volumique de 45 %).

Le calcul de la quantité de dépôt de la **peinture à base de solvants organiques** est le suivant :

$$m = (40 \cdot 150 \cdot 2,61) / (45 \cdot 100) = 1,16 \text{ g}$$

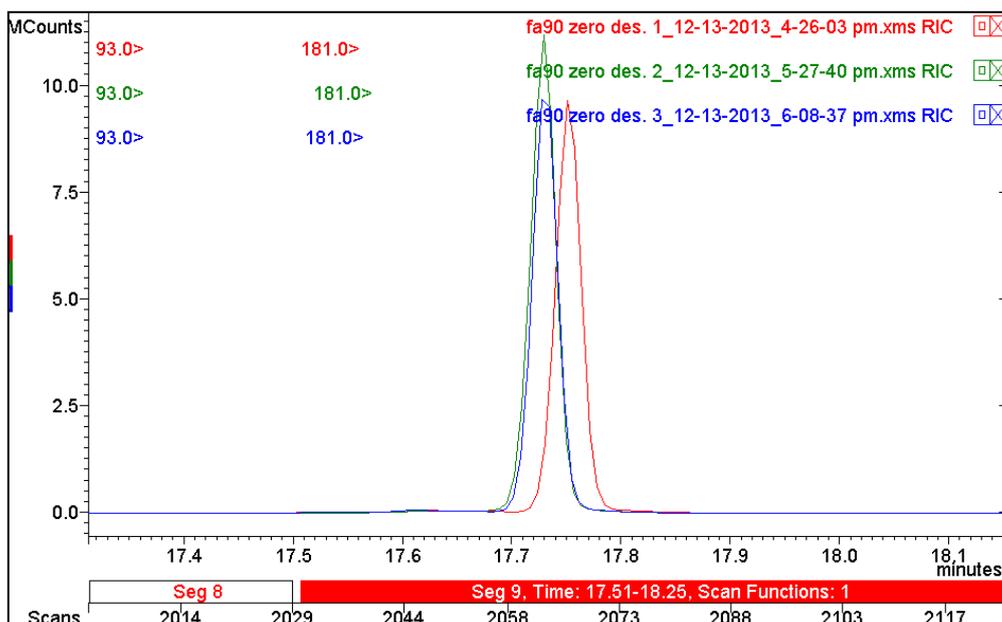
(Pour une épaisseur de feuil sec de 40 μm , une masse volumique de 2,61 g/cm³, une fraction volumique de 45 %).

Annexe D

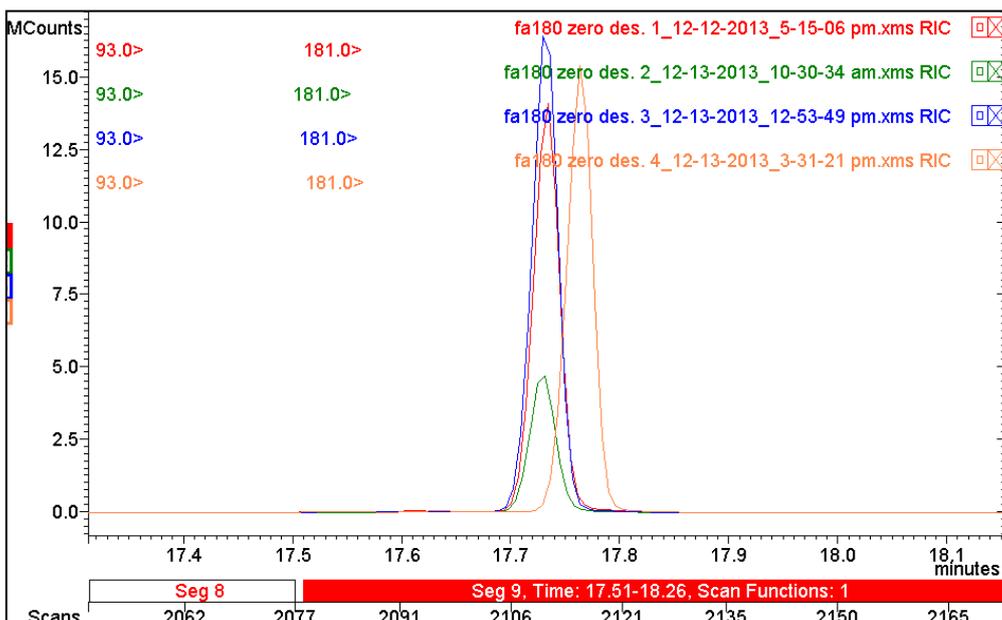
CHROMATOGRAMMES

Chromatographes des dosages de formaldéhyde gazeux généré à l'aide du dispositif statique mise en place au laboratoire. Les dosages réalisés par échantillonnage de l'atmosphère générée à l'aide d'un flacon en verre préalablement mis sous vide. L'extraction a été réalisée pendant 15 minutes à l'aide de la fibre SPME préalablement imprégnée de PFBHA (l'o-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamine hydrochloride).

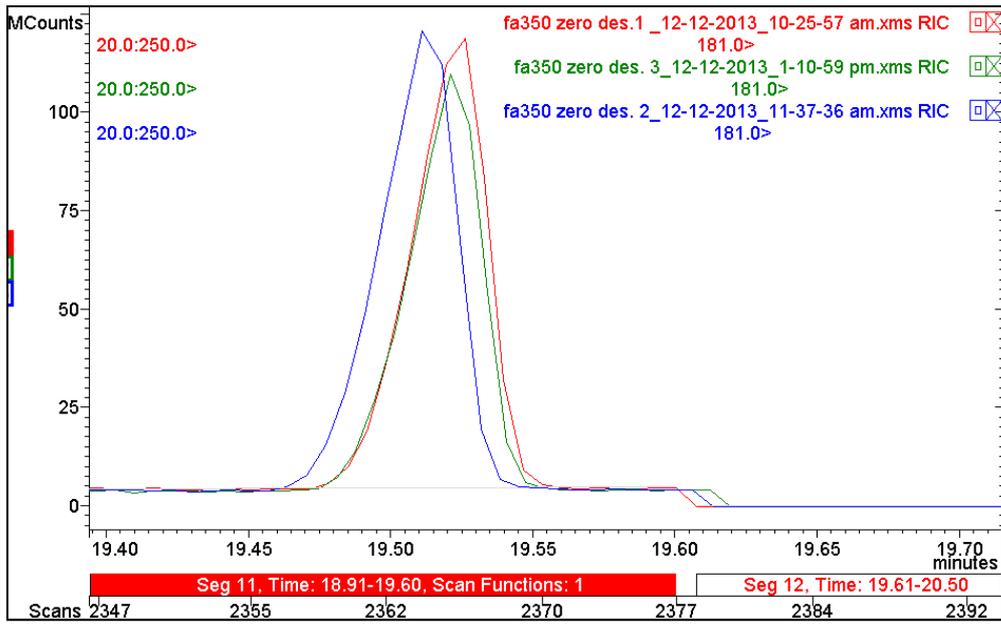
Génération d'une concentration théorique de 90 µg/m³ de formaldéhyde gazeux



Génération d'une concentration théorique de 180 µg/m³ de formaldéhyde gazeux



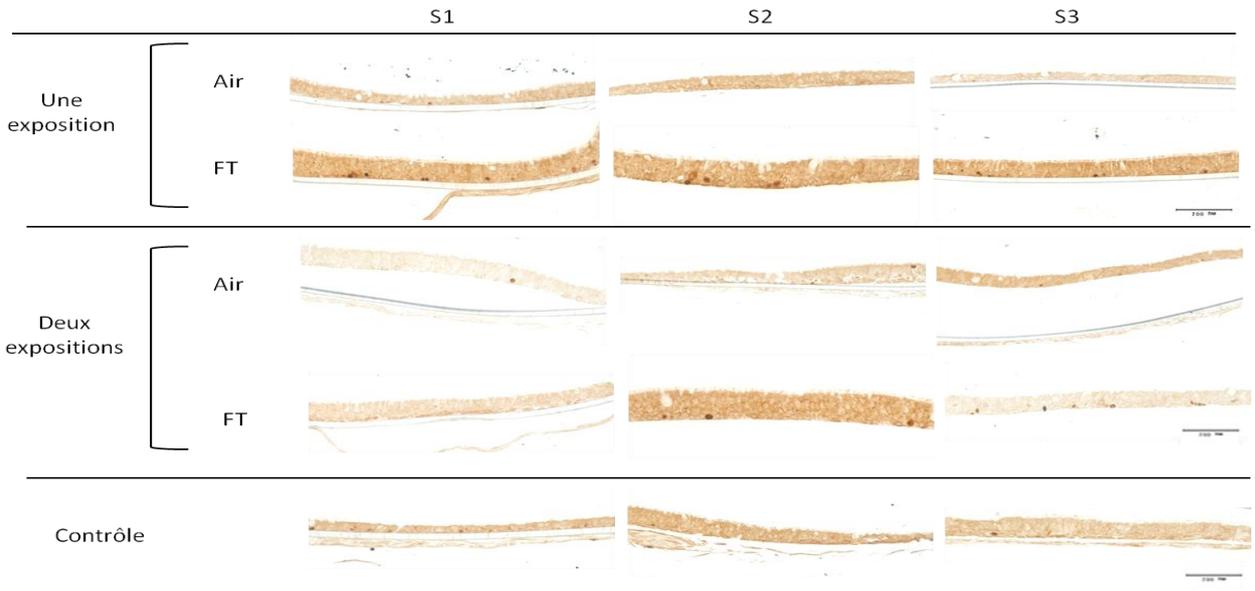
Génération d'une concentration théorique de 360 µg/m³ de formaldéhyde gazeux



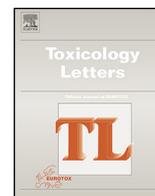
Annexe E

IMMUNOMARQUAGE KI67

Immunomarquage de l'antigène Ki67 de coupes transversales des épithéliums reconstitués (hRNE) une semaine après la première exposition à la fumée primaire de tabac (FT) pour chaque semaine d'exposition (S1, S2, S3). Barre d'échelle : 100 µm acquisition. Grossissement X 200 (N=1).



Annexe F – Article 1



A model of human nasal epithelial cells adapted for direct and repeated exposure to airborne pollutants



Gaëlle Bardet^{a,b}, Sophie Achard^{a,*}, Thomas Loret^a, Valérie Desauziers^c,
Isabelle Momas^a, Nathalie Seta^{a,d}

^a Université Paris Descartes, EA 4064, Laboratoire de Santé Publique et Environnement, 4, Avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France

^b Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie, Angers, France

^c Centre des Matériaux des Mines d'Alès, Ecole des Mines d'Alès, Pau, France

^d AP-HP, Hôpital Bichat, Biochimie, Paris, France

HIGHLIGHTS

- Our model assesses the effect of gaseous pollutants on the respiratory tract over a set period of time.
- The *in vitro* model of human epithelial nasal cells gets closer to physiologically relevant conditions.
- The model enables repeated exposure to gaseous pollutants at the air–liquid interface.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 February 2014

Received in revised form 4 May 2014

Accepted 27 May 2014

Available online 21 June 2014

Keywords:

In vitro

Air–liquid interface

hAECN (human Airway Epithelial Cells of Nasal origin)

Repeated exposures

ABSTRACT

Airway epithelium lining the nasal cavity plays a pivotal role in respiratory tract defense and protection mechanisms. Air pollution induces alterations linked to airway diseases such as asthma. Only very few *in vitro* studies to date have succeeded in reproducing physiological conditions relevant to cellular type and chronic atmospheric pollution exposure. We therefore, set up an *in vitro* model of human Airway Epithelial Cells of Nasal origin (hAECN) close to real human cell functionality, specifically adapted to study the biological effects of exposure to indoor gaseous pollution at the environmental level. hAECN were exposed under air–liquid interface, one, two, or three-times at 24 h intervals for 1 h, to air or formaldehyde (200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$), an indoor air gaseous pollutant. All experiments were ended at day 4, when both cellular viability and cytokine production were assessed. Optimal adherence and confluence of cells were obtained 96 h after cell seeding onto collagen IV-precoated insert. Direct and repeated exposure to formaldehyde did not produce any cellular damage or IL-6 production change, although weak lower IL-8 production was observed only after the third exposure. Our model is significantly better than previous ones due to cell type and the repeated exposure protocol.

© 2014 Published by Elsevier Ireland Ltd.

1. Introduction

Today's population, mainly in developed countries, spends most of its time in enclosed environments. The onset of specific

diseases, such as sick building syndrome, together with a significant increase in airway diseases worldwide since the second half of the twentieth century, have prompted concerns about indoor air pollution and its effects on human health, which is now considered a major public health problem (Bernstein et al., 2008; Bruce et al., 2000; Finnegan et al., 1984). There is currently evidence that highlights associations between indoor chemical exposure at environmental concentrations and the occurrence of airway disorders, especially in children and young adults due to their undeveloped immune and respiratory systems (Delfino, 2002; Diez et al., 2000; Mendell, 2007; Roda et al., 2011; Rumchev et al., 2002, 2004; Saxon and Diaz-Sanchez, 2005; Venn et al.,

Abbreviation: hAECN, human Airway Epithelial Cells of Nasal origin.

* Corresponding author. Tel.: +33 1 53 73 97 28; fax: +33 1 43 25 38 76.

E-mail addresses: gaelle.bardet@etu.parisdescartes.fr (G. Bardet),

sophie.achard@parisdescartes.fr (S. Achard), t_loret@orange.fr (T. Loret),

valerie.desauziers@mines-ales.fr (V. Desauziers),

isabelle.momas@parisdescartes.fr (I. Momas), nathalie.seta@parisdescartes.fr

(N. Seta).

2003). Among airway diseases, allergic rhinitis and asthma are the most common chronic diseases which affect children and young adults (Buckland, 2011; Greiner et al., 2011).

Airway epithelium lining the nasal cavity enables the humidification, heating and filtration of inhaled air. It plays a pivotal role in respiratory tract defense and protection mechanisms. Some recent evidence has highlighted that physical or functional alterations of these cells *in vivo* are linked to the first step in the onset of airway diseases such as asthma (Lambrecht and Hammad, 2012). However, considering the lack of present knowledge, further information is needed to understand epithelial cellular impact and mechanisms resulting from air pollutant exposure (Hallstrand et al., 2012; Muller and Jaspers, 2012; Proud and Leigh, 2011). Epidemiological and clinical data provided by the literature must be completed and confirmed by biological proofs to demonstrate a causality relation between indoor air pollution and the onset of airway disorders (Hill, 1965). As far as biological proofs are concerned, apart from *in vivo* and *ex vivo* toxicological and biological studies, there has been an increase in the number of *in vitro* studies over the past ten years. The current tendency is to replace animal laboratory studies with *in vitro* alternatives that adhere to the 3R principle (reduce, refine, replace). The new EU chemical policy REACH (Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals directive) supports this approach, promoting the implementation of a variety of *in vitro* tools to approximate physiological exposure conditions.

Various scenarios have been already designed in which cells, seeded on inserts or not, are directly exposed to a liquid or gaseous chemical pollutant at different levels (Anderson et al., 2013; Fischader et al., 2008; Gosepath et al., 2003; Kastner et al., 2011; Pariselli et al., 2009a,b; Persoz et al., 2010). It is, therefore, now considered more appropriate to study the biological impact of these pollutants on airway epithelial cells using devices that enable direct dynamic exposure to gaseous pollutants. Such devices have previously been successfully used in our laboratory for single exposure of firstly the alveolar A549 cell line, and secondly the bronchial BEAS-2B cell line, to formaldehyde at environmental levels. Indoor environments contain a wide range of pollutants, formaldehyde being one of the most ubiquitous (Dassonville et al., 2009). No significant inflammatory response was however observed, unless the cells were presensitized with biological mediators (Persoz et al., 2012). We attributed this modest effect to two factors that did not accurately reflect the low level chronic exposure conditions of a non-occupational population: the origin of the cells at lung level, and the fact that there was only a single exposure. Only very few *in vitro* studies to date have succeeded in reproducing physiological relevant conditions in relation to cellular type and chronic gaseous pollution exposure (Boublil et al., 2013; Kastner et al., 2013).

The objective of our work was thus to set up a human nasal epithelial cells *in vitro* model that was closer to real human cell functionality, adapted to study the biological effects of direct and repeated exposure to an indoor gaseous pollutant at environmental level.

2. Material and methods

2.1. Chemicals and reagents

Formaldehyde (FA) (HCHO, 37% in water with 10–15% of methanol), collagen type IV from human placenta, and tumor necrosis factor α (TNF α), were purchased from Sigma–Aldrich (MO, USA). Human airway epithelial culture medium (hAEC) was obtained from Epithelix (Geneva, Switzerland). Penicillin–streptomycin and trypsin (TrypLETM Express) from Invitrogen (WI, USA). The cell proliferation kit II for XTT test was produced by Roche

Diagnostics (Germany), the cytokine DuoSet kits for ELISA assay by R&D Systems (MN, USA), and the LDH assay kit (K2054) by Siemens.

2.2. Cell type and culture conditions

Human Airway Epithelial Cells of Nasal origin (hAECN) were obtained from Epithelix (Geneva, Switzerland). The donor of these primary cells was an 18-year-old young man without smoking habits and no known present or past pathology. Nasal primary cells were cultured under standard conditions (humidified atmosphere of 5% CO₂) in hAEC culture medium supplemented with 1% penicillin–streptomycin mixture (100 U/mL and 100 μ g/mL, respectively). The cells were grown in vented culture flasks (Dutscher, France) under submerged conditions until passage 3. At confluence, cells were trypsinated, counted and seeded at 2.10⁵ cells/mL onto polyester membrane inserts, a membrane permeable to culture medium (0.4 μ m pore, 1.12 cm² growth area (Costar, France)) precoated with collagen IV. The culture medium was added on both sides (500 μ L on apical and 1 mL on basolateral). For all experiments, the cells were used at passage 4. To control the reactivity to an inflammatory stimulus, hAECN cells were treated with 50 ng/mL of TNF α for 72 h under submerged conditions (TNF α treated cells) and compared to cells without TNF α treatment (TNF α untreated cells).

2.3. Generation and control of atmosphere

Air and FA (200 μ g/m³) atmospheres were generated as previously described (Persoz et al., 2010) and controlled by SPME on-fiber derivatization methodology as described elsewhere (Bourdin and Desauziers, 2014). Briefly, a calibration curve was performed using different controlled concentrations of gaseous formaldehyde generated with a permeation device and swept with clean and dry air.

FA atmospheres at different concentrations generated in our generation chamber were repeatedly measured using this assay. The results confirmed a good linearity ($R^2=0.98$), a coefficient of variation near 10% and a yield percentage reaching 60% ($n=3$).

2.4. Cell exposure

The cell exposure occurred 96 h after seeding when the confluence was close to 70–80%. Just before exposure, culture medium at the apical side was removed allowing a direct contact between the cells and the tested-atmosphere. The generated atmosphere was delivered on the apical side of cells at a flow rate of 2 ± 0.1 mL/min/module. The Vitrocell[®] device (Vitrocell Systems, GmbH, Waldkirch, Germany) used for exposure has been previously described (Persoz et al., 2010). Briefly, this device consists of three exposure chambers which can hold one separate insert each. The module is equipped with a heated water jacket to keep cells and culture medium at a steady temperature of 37 °C.

The cells were exposed under air–liquid interface for 1 h to either air or FA, one (day 1), two (day 2) or three (day 3)-times at 24 h intervals. After each exposure, inserts were placed in a 12-well culture plate, each well containing 1 mL of fresh hAEC medium. 500 μ L of fresh hAEC medium were added on apical side, and inserts were incubated at 37 °C. The mediums of both compartments were removed and placed apart at the incubator during the exposure periods and then put back onto inserts after exposures. For each insert, the same medium was kept for 3 days in order to cumulate the cytokine production.

All experiments were ended at day 4, and biological activity was assessed. The culture medium was removed and stored at –20 °C for cytokine evaluation and at 4 °C for LDH assay; cellular

Table 1
Experimental design.

	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4
1 Exposure	x			Biological activity
2 Exposures	x	x		Biological activity
3 Exposures	x	x	x	Biological activity

Cells were exposed at air–liquid interface (x), for 1 h one (day 1), two (day 2) or three (day 3)-times at 24 h intervals, to either air or FA (200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$). All experiments were performed in triplicate and ended on day 4. At this point, biological activity was assessed (XTT assay on cells; LDH and cytokines measurements in supernatant).

functionality was assessed using the XTT test. All experiments were performed in triplicate. Table 1 summarizes the experimental protocol.

Air atmosphere was named “Air-Control” and compared to FA in a same dynamic exposure state. Another control condition named “Incubator-Control” was performed directly in incubator following this experimental protocol. This condition was set up to compare the impact of air flow on cells in dynamic (Air-Control) and static (Incubator-Control) states.

2.5. Biological activity assessment

2.5.1. Cellular morphology

Cellular confluence and attachment were observed directly on insert before and after exposure using a light inverted microscope (100 \times magnification, Nikon Eclipse Ts100).

2.5.2. Cellular functionality: XTT assay

Colorimetric XTT (sodium-2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium inner salt) assay relies on activity of succinate dehydrogenase measurement in mitochondria. This test is based on the ability of viable cells to convert a soluble tetrazolium salt to a formazan product and was performed as described previously (Persoz et al., 2010). Cellular functionality was evaluated by the quantification of the amount of formazan formed by the viable cells versus the absorbance data.

2.5.3. Cellular viability: LDH assay

Membrane integrity was determined by measuring the release of intracellular lactate dehydrogenase (LDH) into the supernatant medium. LDH activity was measured using an *in vitro* assay kit in which LDH oxidizes the substrate L-lactate buffered at a pH of 9.4 in the presence of NAD⁺ to yield pyruvate and NADH, H⁺, as previously described (Persoz et al., 2011). Concentrations were initially expressed as unit of consumed substrate per liter (U/L). Cellular viability was expressed as a percentage (%), calculated with maximal LDH activity obtained by cell lysis after 3 successive deep freezing (–80 °C) and thawing of 15 min each. The submerged sample cell LDH concentration was 25 \pm 9 U/L (n = 12) and maximal LDH activity was 753 \pm 166 U/L (n = 9).

2.5.4. Cytokine production: ELISA assay

Cellular inflammatory response was assessed by quantification of four cytokines: interleukin 8 (IL-8), interleukin 6 (IL-6), interleukin-1 alpha (IL-1 α) and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in mixed apical and basal supernatant using ELISA assay according to the manufacturer's instructions. Absorbance was determined using with an ELISA-reader (Multiskan-EX, Thermo Scientific, MA, USA). The calibration curves were calculated using Ascent Software[®] (Thermo Scientific, MA, USA). Cytokines concentrations were expressed as pg/mL, and the limits of quantification were 31.26, 9.37, 7.81, 15.62 pg/mL for IL-8, IL-6, IL-1 α and GM-CSF, respectively.

2.6. Statistical analysis

The results were expressed as arithmetic means \pm standard deviation (SD) of five independent experiments performed in triplicate. Statistical analyses were performed using R computer software (version 2.11.1). Statistical difference between two arithmetic means was analyzed by Student's *t*-test and confirmed with Mann–Whitney–Wilcoxon test. The data were considered as statistically different when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Setting up the hAECN culture on insert

With the objective of approximating conditions of real exposure to indoor gaseous pollutants in the human respiratory tract, especially at the nasal level, we adapted the culture of primary nasal epithelial cells in order to expose them repeatedly to a gaseous pollutant under air–liquid interface conditions with an optimal contact between cells and tested-atmosphere.

To improve cell adherence onto the inserts and control cellular confluence, various experimental conditions such as collagen IV-precoating of insert, cellular seeding density, and period of growing before exposure were considered. The conditions resulting in an optimal adherence of cells and a confluence close to 70–80% were obtained 96 h after seeding of cells at 2.10⁵ cells/mL onto collagen IV-precoated insert compared with uncoated inserts. Fig. 1 shows the level of confluence of growing hAECN cells after two different times (24 h or 96 h) of culture on collagen-coated inserts. The cells reached confluence at day 4, the end of the experiment.

3.2. Repeated exposures under air–liquid interface conditions

In order to perform repeated exposures, hAECN were exposed during 1 h, one, two or three-times at 24 h intervals. In order for each condition to have a similar time of cellular secretion and growth, we chose to assess biological activity at the end of the 72 h period after performing the first exposure whatever the exposure

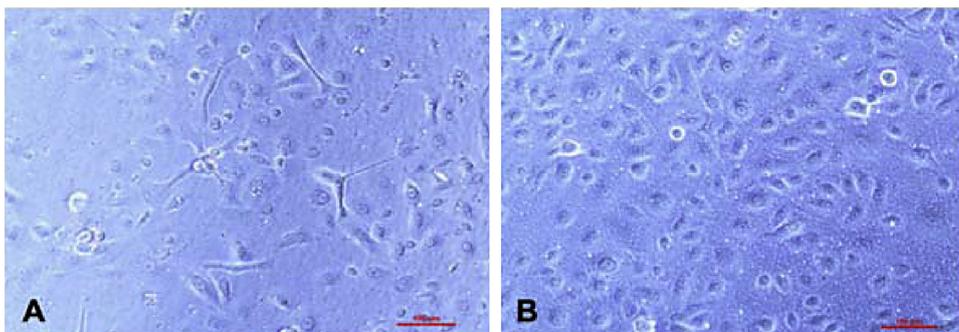


Fig. 1. Cell growth onto collagen IV-precoated insert, 24 h (A) and 96 h (B) after seeding of 2.10⁵ hAECN cells per mL (100 \times).

Table 2

Cytokine productions (IL-8, IL-6) at day 4 after dynamic (Air-Control) or static (Incubator-Control) exposure during 1 h to air after one, two or three exposures at 24 h intervals ($n = 5$). Mean \pm SD.

	1 Exposure		2 Exposures		3 Exposures	
	Air-Control	Incubator-Control	Air-Control	Incubator-Control	Air-Control	Incubator-Control
IL-8 (pg/mL)	674 \pm 129	664 \pm 194	592 \pm 169	578 \pm 103	593 \pm 191	639 \pm 194
IL-6 (pg/mL)	111 \pm 56	76 \pm 34	119 \pm 60	94 \pm 51	116 \pm 45	107 \pm 31

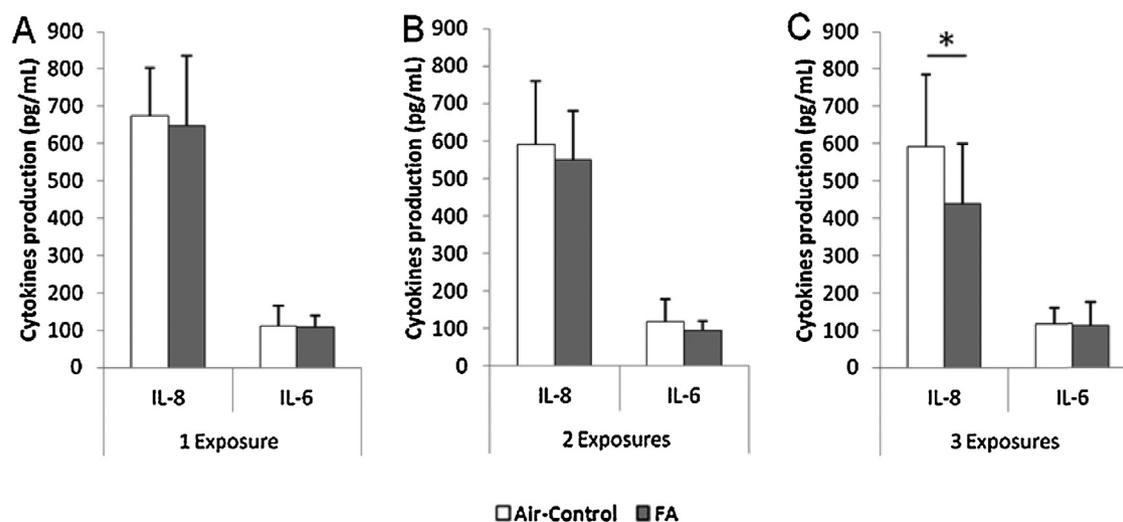


Fig. 2. IL-8 and IL6 production after FA 200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ exposure compared to air.

Cytokine production in the culture medium at day 4, 72 h after performing first exposure, after 1 (A), 2 (B) or 3 (C) exposures to FA (gray bars) or air (white bars). Student *t*-test ($n = 5$): * $p < 0.05$ air versus FA.

condition and number. To confirm the lack of damage related to dynamic state exposure, we compared the functionality of both Air-Control and Incubator-Control after one, two or three exposures. Whatever the exposure condition and number cellular functionality remained stable (data not shown).

3.3. Cytokine production

In order to establish the dose–response curve leading to the highest IL-8 release without any cytotoxicity, we first tested different concentrations of TNF α (2, 5, 10, 20, 50, 100 ng/mL) in the culture medium of the cells for 72 h of TNF α under submerged conditions. TNF α treatment up to 50 ng/mL did not induce any cytotoxicity when compared to TNF α untreated cells. hAECN were able to react to a biological mediator, TNF α 50 ng/mL, by increasing cytokine production in supernatants, such as significant 2- and 5-fold increases, respectively, for IL-8 (1468 pg/mL \pm 283 versus 799 \pm 353) and IL-6 (386 pg/mL \pm 45 versus 77 \pm 26). GM-CSF and IL-1 α were also tested where a very low cellular production was noted under the limit of quantification (data not shown).

Considering the exposure modes, dynamic or static, no cellular damage or significant difference between Air-Control and Incubator-Control was observed regarding the cytokines production (IL-6, IL-8), whatever the exposure number (Table 2).

3.4. Repeated FA exposures under air–liquid interface

In order to mimic breathing with regards to the exposure pathway of airborne pollutants on airway epithelium, we only applied the dynamic exposure mode to hAECN culture and exposed them to air or FA up to three times.

After one, two or three exposures to air or FA, no cellular damage was observed, and viability was near 100% at day 4 for both

XTT and LDH release at the end of the experiment (data not shown).

IL-6 production was unchanged after repeated FA exposures compared to repeated exposures with air.

A significantly lower but weak IL-8 production was only observed after the third exposure of FA compared to Air-Control under the same conditions (Fig. 2).

4. Discussion

Through this work, we have been able to set up an *in vitro* model designed to approximate real human exposure as closely as possible by directly and repeatedly exposing human nasal primary cell culture to chemicals. The successful design of this model represents a further step in studying the cellular impact of gaseous pollutants at environmental levels. When applied to gaseous FA exposure, the absence of change in cellular functionality and viability was associated to a discrete modulation in inflammatory mediator production observed after a series of three exposures at 24 h intervals compared to air.

Given the need to replace animal studies, new *in vitro* methods that approach real *in vivo* conditions have been developed. New devices have been set up to specifically study the effect of *in vitro* gaseous pollutant exposure on the respiratory tract. The most relevant and accurate of these are systems that directly dynamically expose cells to pollutants in gaseous phase (Aufderheide et al., 2003; Aufderheide, 2005; Bakand and Hayes, 2010; Lehmann et al., 2008).

Using such devices, as described in previous studies, we tested the effect of gaseous pollutants on epithelial cells originating from the deep lung (alveolar type II, pneumocytes, A549 cell line) and the bronchus (BEAS-2B cell line) (Persoz et al., 2010, 2011, 2012). The cellular effect of a single gaseous FA exposure at low levels was

weak as we failed at that time to perform repeated exposures (Persoz et al., 2010, 2011, 2012).

We therefore, changed our approach in two ways: firstly we opted to go up the respiratory tract to the nose, and secondly we chose to work on a primary culture of human epithelial nasal cells from human nasal biopsy instead of immortalized cell lines to better reflect the physiological status.

The nasal epithelial cells are the first physical barrier in contact with inhaled environmental air pollutants, and play a well-known role in the modulation of airway inflammatory status by controlling (inhibition/degradation or generation) a wide range of mediators (Avila and Schleimer, 2009). Up to now, human nasal primary culture cells have been widely used to study toxicity, drug delivery, histological and morphological comparisons and the evolution of cell culture conditions (Dimova et al., 2005). It should be noted that the *in vitro* effects of gaseous chemicals at low levels on nasal cells have been seldom investigated (Gosepath et al., 2003; Roggen et al., 2006).

To establish this *in vitro* model, we set up cell culture conditions and parameters that took into account previously published studies (BeruBe et al., 2009; Comer et al., 2012; Persoz et al., 2010). With the aim of studying chronic exposures, we decided to adjust exposure conditions by reducing the air flow and making the exposure time twice as long as with A549 and BEAS-2B cell lines (Persoz et al., 2010, 2012). Finally we ascertained the capacity of our model to react to an inflammatory stimulus, TNF α , allowing us to use it to test an inflammatory response.

Among the chemical pollutants present in the air that we breathe, FA is a frequently encountered gaseous indoor air pollutant. Regarding its high solubility in water and chemical reactivity, most of inhaled FA deposits on nasal mucosa and only a small part reaches the lower airways (Wolkoff and Nielsen, 2010). FA is known as a carcinogenic substance for human nasopharyngeal cancer (IARC, 2006). At the moment therefore, studies involving FA and nasal *in vitro* cells mostly concern genotoxic and mutagenic effects (Neuss et al., 2010a,b; Speit et al., 2008; Zhong and Que Hee, 2004). Speit et al. showed that exposure of human nasal epithelial cells to liquid FA (50–300 μ M) was related to induction of DNA-protein crosslinks formation, and to dose and time-dependent changes in gene expression. In the same way, (Zhong and Que Hee, 2004) demonstrated that hydroxymethylnucleosides were present in human nasal epithelial cells after exposure to high concentrations of liquid FA (30–3000 μ M). These experiments were however designed with cellular exposure for a short period to FA in liquid phase and at high concentrations, thus not reflecting the actual environmental exposure to gaseous chemical pollutants. Given the omnipresence of FA in indoor air and its health effects, we considered FA as a relevant gaseous chemical to test our model.

In our study, exposure to air or gaseous FA was performed up to three times during 1 h each day during 3 days. We chose to apply a concentration of gaseous formaldehyde (200 μ g/m³) reflecting the upper usual limit values observed in indoor residential environments (Dassonville et al., 2009). This concentration was higher than the one we used formerly (50 μ g/m³), since no effect was observed at the former levels when tested on cells from deeper in the lung, and FA concentrations in inhaled air are far higher at the nasal level than in the bronchus or the alveolar space. At the dynamic state, air exposure did not have any effect on cellular viability. Similarly, cellular viability and the functionality of cells exposed to FA did not vary compared to the control whatever the number of exposures. This is the first time in the literature that repeated exposures in an air-liquid interface did not cause any cellular damage on monolayer cells cultured on inserts (Kastner et al., 2013; Pariselli et al., 2009b; Persoz et al., 2010). Recently Kastner et al. performed repeated exposures of the bronchial epithelial cell line Calu-3 during 30 min four times at 24 h intervals

to a mixed gaseous compounds atmosphere (FA 200 μ g/m³ and NO₂ 800 μ g/m³) using a static incubator chamber. They observed that in their conditions air-liquid interface exposure performed on cells cultured on insert was too stressful to handle long and repeated exposures, so they decided to repeat exposures on cells covered by a medium layer on the top, thereby changing the exposure conditions (Kastner et al., 2013).

In our study conditions, at a low level of FA, we were able to observe only a weak and late impact of repeated gaseous FA exposure, with a weak decrease of IL-8 production compared to control, and no change in cellular and functional viability and IL-6 production. These results show that our model is adapted to direct and repeated gaseous pollutant exposure, without any cellular damage. The single pollutant atmosphere that we tested does not reflect the real indoor pollution. It should be replaced by more complex atmosphere closer to real life, in further studies on effect of pollutant exposure on airway inflammatory mediators' modulation of human epithelial nasal cells.

Our model is significantly improved compared with former ones due to cell type and the repeated exposure protocol. It does however still have some limits: cell culture conditions did not allow us to further increase the period and the number of exposures to mimic real chronic exposure, and primary cell culture passages are limited. Indeed, experimental reproducibility using primary cell culture is restricted compared to cell lines. Tissue availability to provide these cell cultures and potential inter-donor variability can be a real issue: as an example, it would be necessary to test the culture conditions for each new cell donor.

In conclusion, a robust air-liquid dynamic exposure model is needed that is specifically adapted to long period and repeated condition exposures. Three dimension structures (Anderson et al., 2013) and co-culture of major inflammatory cell structures could be relevant alternatives to achieve this goal (Klein et al., 2011).

These new models and combinations could help us to get close to human exposure conditions, and possibly herald the introduction of new design approaches capable of bridging the gap between *in vivo* and *in vitro* assays.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Transparency document

The [Transparency document](#) associated with this article can be found in the online version.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, l'Environnement et le Travail – ANSES (EST-09-103, EST-12-087). Gaëlle BARDET is recipient of a joint PhD grant from ADEME (Agence de l'Environnement et de la Maitrise de l'Energie) and IRIS (Institut de Recherche International Servier).

References

- Anderson, S.E., Khurshid, S.S., Meade, B.J., Lukomska, E., Wells, J.R., 2013. Toxicological analysis of limonene reaction products using an *in vitro* exposure system. *Toxicol. In Vitro* 27, 721–730.
- Aufderheide, M., 2005. Direct exposure methods for testing native atmospheres. *Exp. Toxicol. Pathol.* 57 (Suppl. 1), 213–226.
- Aufderheide, M., Knebel, J.W., Ritter, D., 2003. Novel approaches for studying pulmonary toxicity *in vitro*. *Toxicol. Lett.* 140–141, 205–211.
- Avila, P.C., Schleimer, R.P., 2009. Airway epithelium. *Allergy and Allergic Diseases*. Wiley-Blackwell, pp. 366–397.
- Bakand, S., Hayes, A., 2010. Troubleshooting methods for toxicity testing of airborne chemicals *in vitro*. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 61, 76–85.

- Bernstein, J.A., Alexis, N., Bacchus, H., Bernstein, I.L., Fritz, P., Horner, E., Li, N., Mason, S., Nel, A., Oullette, J., Reijula, K., Reponen, T., Seltzer, J., Smith, A., Tarlo, S.M., 2008. The health effects of non-industrial indoor air pollution. *J. Allergy Clin. Immunol.* 121, 585–591.
- BeruBe, K., Aufderheide, M., Breheny, D., Clothier, R., Combes, R., Duffin, R., Forbes, B., Gaca, M., Gray, A., Hall, I., Kelly, M., Lethem, M., Liebsch, M., Merolla, L., Morin, J.P., Seagrave, J., Swartz, M.A., Tetley, T.D., Umachandran, M., 2009. In vitro models of inhalation toxicity and disease. The report of a FRAME workshop. *Altern. Lab Anim.* 37, 89–141.
- Boublil, L., Assemat, E., Borot, M.C., Boland, S., Martinon, L., Sciare, J., Baeza-Squiban, A., 2013. Development of a repeated exposure protocol of human bronchial epithelium in vitro to study the long-term effects of atmospheric particles. *Toxicol. In Vitro* 27, 533–542.
- Bourdin, D., Desauziers, V., 2014. Development of SPME on-fiber derivatization for the sampling of formaldehyde and other carbonyl compounds in indoor air. *Anal. Bioanal. Chem.* 406, 317–328.
- Bruce, N., Perez-Padilla, R., Albalak, R., 2000. Indoor air pollution in developing countries: a major environmental and public health challenge. *Bull. World Health Organ.* 78, 1078–1092.
- Buckland, G.L., 2011. Harnessing opportunities in non-animal asthma research for a 21st-century science. *Drug Discov. Today* 16, 914–927.
- Comer, D.M., Elborn, J.S., Ennis, M., 2012. Comparison of nasal and bronchial epithelial cells obtained from patients with COPD. *PLoS One* 7, e32924.
- Dassonville, C., Demattei, C., Laurent, A.M., Le Moullec, Y., Seta, N., Momas, I., 2009. Assessment and predictor determination of indoor aldehyde levels in Paris newborn babies' homes. *Indoor Air* 19, 314–323.
- Delfino, R.J., 2002. Epidemiologic evidence for asthma and exposure to air toxics: linkages between occupational, indoor, and community air pollution research. *Environ. Health Perspect.* 110 (Suppl. 4), 573–589.
- Diez, U., Kroessner, T., Rehwagen, M., Richter, M., Wetzig, H., Schulz, R., Borte, M., Metzner, G., Krumbiegel, P., Herbarth, O., 2000. Effects of indoor painting and smoking on airway symptoms in atopy risk children in the first year of life results of the LARS-study. Leipzig Allergy High-Risk Children Study. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 203, 23–28.
- Dimova, S., Brewster, M.E., Noppe, M., Jorissen, M., Augustijns, P., 2005. The use of human nasal in vitro cell systems during drug discovery and development. *Toxicol. In Vitro* 19, 107–122.
- Finnegan, M.J., Pickering, C.A., Burge, P.S., 1984. The sick building syndrome: prevalence studies. *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)* 289, 1573–1575.
- Fischader, G., Roder-Stolinski, C., Wichmann, G., Nieber, K., Lehmann, I., 2008. Release of MCP-1 and IL-8 from lung epithelial cells exposed to volatile organic compounds. *Toxicol. In Vitro* 22, 359–366.
- Gosepath, J., Grebneva, N., Brieger, J., Mann, W.J., 2003. Evaluation of inflammatory reactions and genotoxic effects after exposure of nasal respiratory epithelia to benzene. *ORL J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec.* 65, 348–352.
- Greiner, A.N., Hellings, P.W., Rotiroli, G., Scadding, G.K., 2011. Allergic rhinitis. *Lancet* 378, 2112–2122.
- Hallstrand, T.S., Woodruff, P.G., Holgate, S.T., Knight, D.A., 2012. Function of the airway epithelium in asthma. *J. Allergy (Cairo)* 160586.
- Hill, A.B., 1965. The environment and disease: association or causation? *Proc. R. Soc. Med.* 58, 295–300.
- IARC, 2006. Formaldehyde, 2-butoxyethanol and 1-tert-butoxypropan-2-ol. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. 88, .
- Kastner, P.E., Casset, A., Pons, F., 2011. Formaldehyde interferes with airway epithelium integrity and functions in a dose- and time-dependent manner. *Toxicol. Lett.* 200, 109–116.
- Kastner, P.E., Le Calve, S., Zheng, W., Casset, A., Pons, F., 2013. A dynamic system for single and repeated exposure of airway epithelial cells to gaseous pollutants. *Toxicol. In Vitro* 27, 632–640.
- Klein, S.G., Hennen, J., Serchi, T., Blomeke, B., Gutleb, A.C., 2011. Potential of coculture in vitro models to study inflammatory and sensitizing effects of particles on the lung. *Toxicol. In Vitro* 25, 1516–1534.
- Lambrecht, B.N., Hammad, H., 2012. The airway epithelium in asthma. *Nat. Med.* 18, 684–692.
- Lehmann, I., Roder-Stolinski, C., Nieber, K., Fischader, G., 2008. In vitro models for the assessment of inflammatory and immuno-modulatory effects of the volatile organic compound chlorobenzene. *Exp. Toxicol. Pathol.* 60, 185–193.
- Mendell, M.J., 2007. Indoor residential chemical emissions as risk factors for respiratory and allergic effects in children: a review. *Indoor Air* 17, 259–277.
- Muller, L., Jaspers, I., 2012. Epithelial cells, the “switchboard” of respiratory immune defense responses: effects of air pollutants. *Swiss Med. Wkly.* 142, w13653.
- Neuss, S., Holzmann, K., Speit, G., 2010a. Gene expression changes in primary human nasal epithelial cells exposed to formaldehyde in vitro. *Toxicol. Lett.* 198, 289–295.
- Neuss, S., Moepps, B., Speit, G., 2010b. Exposure of human nasal epithelial cells to formaldehyde does not lead to DNA damage in lymphocytes after co-cultivation. *Mutagenesis* 25, 359–364.
- Pariselli, F., Sacco, M.G., Ponti, J., Rembges, D., 2009a. Effects of toluene and benzene air mixtures on human lung cells (A549). *Exp. Toxicol. Pathol.* 61, 381–386.
- Pariselli, F., Sacco, M.G., Rembges, D., 2009b. An optimized method for in vitro exposure of human derived lung cells to volatile chemicals. *Exp. Toxicol. Pathol.* 61, 33–39.
- Persoz, C., Achard, S., Leleu, C., Momas, I., Seta, N., 2010. An in vitro model to evaluate the inflammatory response after gaseous formaldehyde exposure of lung epithelial cells. *Toxicol. Lett.* 195, 99–105.
- Persoz, C., Leleu, C., Achard, S., Fasseu, M., Menotti, J., Meneceur, P., Momas, I., Derouin, F., Seta, N., 2011. Sequential air-liquid exposure of human respiratory cells to chemical and biological pollutants. *Toxicol. Lett.* 207, 53–59.
- Persoz, C., Achard, S., Momas, I., Seta, N., 2012. Inflammatory response modulation of airway epithelial cells exposed to formaldehyde. *Toxicol. Lett.* 211, 159–163.
- Proud, D., Leigh, R., 2011. Epithelial cells and airway diseases. *Immunol. Rev.* 242, 186–204.
- Roda, C., Kousignian, I., Guihenneuc-Jouyau, C., Dassonville, C., Nicolis, I., Just, J., Momas, I., 2011. Formaldehyde exposure and lower respiratory infections in infants: findings from the PARIS cohort study. *Environ. Health Perspect.* 119, 1653–1658.
- Roggen, E.L., Soni, N.K., Verheyen, G.R., 2006. Respiratory immunotoxicity: an in vitro assessment. *Toxicol. In Vitro* 20, 1249–1264.
- Rumchev, K.B., Spickett, J.T., Bulsara, M.K., Phillips, M.R., Stick, S.M., 2002. Domestic exposure to formaldehyde significantly increases the risk of asthma in young children. *Eur. Respir. J.* 20, 403–408.
- Rumchev, K., Spickett, J., Bulsara, M., Phillips, M., Stick, S., 2004. Association of domestic exposure to volatile organic compounds with asthma in young children. *Thorax* 59, 746–751.
- Saxon, A., Diaz-Sanchez, D., 2005. Air pollution and allergy: you are what you breathe. *Nat. Immunol.* 6, 223–226.
- Speit, G., Schmid, O., Neuss, S., Schutz, P., 2008. Genotoxic effects of formaldehyde in the human lung cell line A549 and in primary human nasal epithelial cells. *Environ. Mol. Mutagen.* 49, 300–307.
- Venn, A.J., Cooper, M., Antoniak, M., Laughlin, C., Britton, J., Lewis, S.A., 2003. Effects of volatile organic compounds, damp, and other environmental exposures in the home on wheezing illness in children. *Thorax* 58, 955–960.
- Wolkoff, P., Nielsen, G.D., 2010. Non-cancer effects of formaldehyde and relevance for setting an indoor air guideline. *Environ. Int.* 36, 788–799.
- Zhong, W., Que Hee, S.S., 2004. Formaldehyde-induced DNA adducts as biomarkers of in vitro human nasal epithelial cell exposure to formaldehyde. *Mutat. Res.* 563, 13–24.

Annexe G – Article 2

Human Reconstituted Nasal Epithelium, a promising *in vitro* model to assess impacts of environmental complex mixtures

Gaëlle Bardet ^{a,b}, Virginie Mignon ^c, Isabelle Momas ^a, Sophie Achard ^{a,1,*}, Nathalie Seta ^{a,d,1}

^a **Université Paris Descartes, Faculté de Pharmacie de Paris, EA 4064, Laboratoire de Santé Publique et Environnement, Paris, France**

^b Agence de l'environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME), Angers, France

^c Université Paris Descartes, Faculté de Pharmacie de Paris, Cellular and Molecular Imaging Platform, UMS 3612 CNRS, US25 INSERM, Paris, France

^d **AP-HP, Hôpital Bichat, Biochimie, Paris, France**

E-mail address:

gaelle.bardet@laposte.net

virginie.mignon@parisdescartes.fr

isabelle.momas@parisdescartes.fr

sophie.achard@parisdescartes.fr

nathalie.seta@parisdescartes.fr

Corresponding author:

*Sophie ACHARD

Université Paris Descartes, Faculté de Pharmacie de Paris, Laboratoire de Santé Publique et Environnement – EA4064, 4, avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France.

Tel.: +33 1 53 73 97 28

Fax: +33 1 43 25 38 76

E-mail address: sophie.achard@parisdescartes.fr

¹ Last two authors contributed equally to this article.

Abbreviations list

ECM: Environmental complex mixture

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

FOV: Field of view

hRNE: human reconstituted nasal epithelium

LDH: Lactate dehydrogenase

PBS: Phosphate buffered saline

SSS: Sterile Saline Solution

TEER: Trans epithelial electrical resistance

WGA: Wheat germ agglutinin

Abstract

Considering the impact of respiratory diseases around the world, appropriate experimental tools to help understand the mechanisms involved in such diseases are becoming essential. Our aim was to investigate the cellular and morphological reactivity of a human Reconstituted Nasal Epithelium (hRNE) to evaluate the impact of environmental complex mixture (ECM), with tobacco smoke as a model, after three weeks of repeated exposures.

Staining of hRNE showed a multilayered ciliated epithelium, with a regular cilia beats, and a mucus production. When hRNE was exposed to ECM for 5 min once or twice a week, during 3 weeks, significant changes occurred: IL-8 production significantly increased 24h after the first exposure compared with Air-exposure and only during the first week, without any loss of tissue integrity. Immunostaining of F-actin cytoskeleton showed a modification in cellular morphology (number and diameter).

Taken together our results indicate that hRNE is well suited to study the cellular and morphological effects of repeated exposures to an environmental complex mixture. Human reconstituted epithelium models are currently the best *in vitro* representation of human respiratory tract physiology, and also the most robust for performing repeated exposures to atmospheric pollutants.

Keywords

Environmental complex mixture

3D- *in vitro* model

Human reconstituted nasal epithelium

Repeated exposures, Air-Liquid exposure

Highlights

1. Human reconstituted epithelium tolerates repeated exposures during several weeks.
2. A repeated exposure design close to the realistic human exposure conditions.
3. Human reconstituted epithelium, a relevant model to assess the effect of environmental complex mixture.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, l'Environnement et le Travail - ANSES (EST-2012/2/087) and the Cellular and Molecular Imaging Platform, University Paris Descartes for respectively the financial and technical supports. Gaëlle BARDET is recipient of a joint PhD grant from ADEME (Agence de l'Environnement et de la Maitrise de l'Energie and IRIS (Institut de Recherche International Servier).

1. INTRODUCTION

Concerns about the expansion of atmospheric pollution worldwide and its impact on human health have increased over the past few years. Recent evidence has revealed associations between atmospheric pollution and the emergence or exacerbation of airway diseases such as asthma and chronic obstructive pulmonary disease (Annesi-Maesano et al., 2006; Guarnieri et al., 2014). Humans are constantly in contact with inhaled outdoor and indoor pollutants, and airway epithelium is a strong barrier which protects the human respiratory tract against this pollution during the respiratory process (Ganesan et al., 2013). Current findings highlight the pivotal role that airway epithelial cells play in the onset of airway diseases (Kumar et al., 2011; Proud 2011).

Considering the impact of airway respiratory diseases around the world, appropriate experimental tools to help understand the mechanisms involved in such diseases are becoming essential. Modern experimental policy and the 3Rs principle (Reduce, Refine, Replace) advocate using *in vitro* studies rather than animals. EU chemical policy REACH (Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals directive) supports this trend by promoting *in vitro* tools able to mimic physiological conditions (BeruBe et al., 2009; Buckland 2011).

Over the past twenty years the design of airway epithelial cell culture has evolved, and new realistic *in vitro* models have emerged. These have progressed from cell monolayers, immortalized cell lines, and primary cells grown in submerged conditions, to multilayered reconstituted epithelium maintained in air-liquid interface that mimics the *in vitro* respiratory tract physiological barrier (Pampaloni et al., 2007; Fulcher et al., 2013). These three-dimensional models have many of the characteristics of human epithelium, such as different epithelial cell types: ciliated, goblet and basal cells, and operational tight junctions (Whitcutt et al., 1988; Rothen-Rutishauser et al., 2005; BeruBe et al., 2009).

Up until to now the airway reconstituted epithelium model is considered to be one of the best *in vitro* representations of the human respiratory tract. Whilst it has been used over the past decade in different research areas, such as drug delivery, impact of biological contaminants, and airway repair and remodeling after injury (Huang et al., 2013; Crespin et al., 2014), only a few teams have used it to investigate the effect of atmospheric pollutant exposure. Furthermore, most studies have used experimental procedures that last less than one week after reaching full differentiation, and only very few studies have used procedures lasting several weeks, even several months (Anderson et al., 2013; Boubilil et al., 2013).

The aim of the present work was to investigate the cellular and morphological reactivity of a human Reconstituted Nasal Epithelium (hRNE) to evaluate the impact of atmospheric pollutants after several weeks of repeated exposures. For this purpose, we tested the feasibility of repeated hRNE tissue exposures to an environmental complex mixture. Tobacco smoke was used as a model of environmental complex mixture because of its well-known respiratory health effects.

2. EXPERIMENTAL PROCEDURES

2.1. Chemicals and reagents

Calcium chloride, goat serum, glycine, bovine serum albumin, glycerol, eosin, sodium azide, Eukitt®, sodium cacodylate, glutaraldehyde, hexamethyldisilazane, osmium tetroxide, hydrochloric acid, and propylene oxide were purchased from Sigma-Aldrich (MO, USA) ; Hepes and Penicillin-Streptomycin, from Invitrogen (WI, USA). Acetic acid, Hemalun and Triton X100, from Merck (Darmstadt, Germany) ; paraffin and ethanol, from VWR International (PA, USA) ; xylene and paraformaldehyde (32%), from Euromedex (France) and sodium chloride, from Minisol (France). Alcian blue 8GX was obtained from RAL diagnostics, VWR (France). Phosphate buffered saline (PBS) was provided by Biosolve Chimie (France). The cytokine DuoSet kits was produced by R&D Systems (MN, USA), and the LDH assay kit (K2054), by Siemens (France).

2.2. hRNE tissue : origin and culture conditions

The study was conducted with a hRNE tissue, known commercially as HF-MucilAir™ and purchased from Epithelix SARL (Geneva, Switzerland). This three-dimensional model is based on primary culture of human nasal epithelial cells differentiated at the air-liquid interface (MucilAir™) and co-cultured with Human airway Fibroblasts (HF) on Costar Transwell insert (0.33 cm², pore size of 0.4 μm, Corning, NY, USA). Nasal epithelial cells were obtained from a pool of donors, nonsmokers and without respiratory pathologies. Signed informed consent and ethical approval were obtained by the supplier. All batches of hRNE tissue were determined to be negative by the supplier for mycoplasma, Human immunodeficiency virus 1 (HIV-1), Human immunodeficiency virus 2 (HIV-2), hepatitis B and C.

hRNE tissues were maintained at the air-liquid interface in an incubator at 37°C (5% CO₂ and 95% constant relative humidity) with 700 μL of MucilAir™ culture medium (Epithelix, Geneva, Switzerland) in the basal side. To preserve tissue homeostasis, the culture medium was changed every two days and the apical side was washed with sterile saline solution (SSS) (NaCl 0.9%, CaCl₂ 1.25 mM, Hepes 10 mM), to remove mucus and surface dead cells, once a week according to the supplier's instructions.

Morphology of hRNE tissue was observed directly using a light inverted microscope (magnification 100X, Nikon Eclipse Ts100) on the insert before and after exposure throughout the experiment period.

2.3. Exposure protocol

All experiments started one week after hRNE delivery. Environmental complex mixture (ECM) was generated from smoking of a French brand cigarette, and was delivered on the apical face of hRNE tissue using a static system adapted from the Vitrocell Cloud chamber. Briefly, before exposure an uncovered culture plate containing hRNE tissues, with 700 μL of medium on the basal side, was placed on the bottom of the exposure chamber, a 3 L tightly closable glass container. 250 mL of ECM, composed by gas and particulate matter (PM), was introduced into the exposure chamber using a syringe. To cover hRNE tissue in a homogeneous manner, ECM was delivered progressively in 10 samples of 25 mL (corresponding to 10 puffs, as an equivalent of one smoked cigarette) in less than 5 minutes. Then the entire device was placed at 37°C for 5 minutes.

During tobacco smoke generation, on average 200 μg/cm² of particulate matter (PM) was deposited on each insert. Deposition did not vary from one generation to another as shown by repeatability and reproducibility experiments.

PM levels deposited on the apical side of the tissues have been estimated as follows. Pre weighed filters were placed at the bottom of the wells of a 24 wells culture plate and exposed to 250 mL of ECM as described above. After 5 and 15 minutes at 37° C, filters were weighed again and the PM levels estimated. The results were respectively, 203 and 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ with a coefficient of variation close to 10% (n = 4). The deposition time of 5 minutes was chosen because it was not accompanied of a cytotoxic effect as observed after 15 minutes.

After the exposure time, the culture medium was removed and replaced with fresh medium, and hRNE tissues were returned to the incubator.

hRNE tissues were exposed to ECM for 5 minutes once or twice a week at 48 hour intervals over three weeks as described in the exposure protocol design (Fig. 1). At the same time, two controls were considered: Air-exposure performed in the same conditions but without ECM, and an Incubator Control corresponding to hRNE tissues not leaving the incubator.

Twenty four hours after the first exposure (Air-exposure or ECM-exposure) and every day over three weeks, culture medium was collected to assess LDH release and cytokine production. Each week, four days after the first exposure, the apical side was washed with SSS to remove mucus, and trans epithelial electrical resistance (TEER) was measured. Histological assessment was performed every week, one week after the first exposure (Fig. 1, day 7).

2.4. Biological activity assessment

2.4.1 Trans Epithelial Electrical Resistance (TEER) measurement

In order to assess the tissue integrity (tight junctions and ionic fluxes), TEER measurement (Ω/cm^2) was performed on tissue with 700 μL of SSS on the basal side and 200 μL on the apical side using electrodes connected to the EVOM² epithelial Voltohmmeter (World Precision Instruments, England). Values between 250 and 700 Ω/cm^2 corresponded to an undamaged tissue.

TEER was calculated as following: $\text{TEER} = (\text{TEER}_{\text{hRNE}} - \text{TEER}_0) * A$, with $\text{TEER}_{\text{hRNE}}$ for the experimental value measured of hRNE tissue, TEER_0 for the background value of the porous membrane of the insert without tissue (100 Ω/cm^2), A: Surface area of the porous membrane of the insert (0.33 cm^2).

2.4.2 Lactate dehydrogenase (LDH) assay

Membrane integrity was determined by measuring the release of intracellular LDH into the basal culture medium. LDH activity was measured using an *in vitro* assay kit in which LDH oxidizes the substrate L-lactate buffered at a pH of 9.4 in the presence of NAD^+ to yield pyruvate and NADH , H^+ , as previously described (Bardet et al., 2014). Concentrations were initially expressed as unit of consumed substrate per liter (U/L). LDH values were compared with maximal LDH activity obtained by cell lysis after three successive deep freezing (-80°C) and thawing of 15 minutes each (> 1000 U/L). Incubator control LDH activity was less than 50 U/L.

2.4.3 Cytokine production

Inflammatory response was assessed by quantification of three cytokines: interleukin 8 (IL-8), interleukin 6 (IL-6), granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) in basal culture medium, 24 h after exposure and all 24 hours until the end of the experiment using ELISA assay according to the manufacturer's instructions.

Absorbance was determined using with an ELISA-reader (Multiskan-EX, Thermo Scientific, MA, USA). Calibration curves were calculated using Ascent Software® (Thermo Scientific, MA, USA). Cytokine

concentrations were expressed as pg/mL and the lower limits of quantification were 31.26, 9.37, 15.62 pg/mL for IL-8, IL-6 and GM-CSF, respectively.

2.5. Histological assessment

2.5.1 Histological and immuno-histological assessments were performed at the end of each week after the first exposure.

a. *Histological analysis*

The hRNE tissues were fixed in 4% paraformaldehyde for 4 h prior to paraffin embedding. 4 μ m cross-sections of the tissue were stained with Hemalun, Eosin and Alcian Blue and observed using an inverted light microscope (Leica DM4000 B LED).

b. *Immunofluorescence staining and confocal analysis*

hRNE tissues, after scrapping away the fibroblasts under the insert, were stained for F-actin, Wheat Germ Agglutinin (WGA) and β -tubulin with specific fluorescent probes or antibodies (Table 1).

All incubations were done at room temperature. After hRNE tissue fixation in 4% paraformaldehyde for 30 min, the tissue was washed three times in PBS and incubated in PBS containing 100 mM Glycine for 20 min before staining with AlexaFluor[®]633-conjugated WGA for 20 min. The tissue was then incubated in a blocking solution (PBS, 5% Goat serum, 1% Bovine Serum Albumin, 0.2% Triton X100) for 30 min and labelled with mouse anti- β -tubulin antibody for 2 h, followed by AlexaFluor[®]488-conjugated goat anti-mouse secondary antibody for 90 min. Actin cytoskeleton was finally stained by incubating the tissue in AlexaFluor[®]555-conjugated Phalloidin for 20 min. Between each step, the tissue was carefully washed in PBS.

For each tissue, three fields-of-views (FOV) located close to the center of the tissue were imaged. In each FOV, a z-stack covering the whole apical side (13 optical planes, total thickness 8.4 μ m) was recorded on a Leica TCS SP2 confocal microscope (Leica Microsystems) equipped with a x40 oil-immersion objective (NA=1.00). The three channels were acquired sequentially and the resulting images were color-coded yellow (β -tubulin), magenta (F-actin) and cyan (WGA) respectively. All images were denoised and maximum intensity projections were performed using Image J 1.48v software (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). The quantification of staining in each FOV was performed by summing the integrated density of each individual image (n=13) of the corresponding β -tubulin z-stack for example, then by dividing the resulting value by the number of ciliated cells in the same FOV determined. Results are expressed as units of fluorescence intensity per cell.

c. *Electron microscopy*

hRNE tissues were washed three times with 0.9% NaCl containing 1.25 mM CaCl₂ and 10 mM Hepes, and then fixed by immersion in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2, containing 2% paraformaldehyde, 2.5% glutaraldehyde and 2 mM CaCl₂ for 45 min. After washing in cacodylate buffer, the tissue was post-fixed in 1% osmium tetroxide in distilled water for 45 min at 4°C then dehydrated using a sequential baths of ethanol and finally propylene oxide before immersion in hexamethyldisilazane and air drying. At this point the tissue situated on the insert membrane was separated from the plastic insert and sputter-coated with gold/palladium. Images were acquired in a scanning electron microscope JEOL JSM-6510LV (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) operating in high vacuum.

d. Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm standard deviation (at least $n=2$ by condition). Depending on the weeks the number of samples analyzed (n) was variable because some tissues were sacrificed at the end of each week to perform histological observations. Thus “at least $n=2$ by condition” corresponds to: week 1, $n=6$, week 2, $n=4$ and week 3, $n=2$.

R computer software (version 2.11.1) was used to compare cytokine production with a non-parametric test (Wilcoxon-Mann-Whitney test). $p < 0.05$ was considered significant.

4. RESULTS

4.1 Histological characterization of hRNE tissue

hRNE tissue were maintained in the air-liquid interface culture over two months taking care by changing every two days the culture medium and, by washing once a week the apical side of tissue to eliminate the mucus produced and the surface dead cells.

No visual structural changes and no variation of TEER values ($317 \pm 67 \Omega/\text{cm}^2$) were observed over these two months, indicating good tissue integrity and stability overtime. Daily microscopic observations of hRNE tissue revealed permanent and regular cilia beats, as well as a constant mucus production during all the experiment time (Fig. 2a).

The staining of hRNE tissue with Hemalun, Eosin and Alcian Blue showed a pseudo-stratified ciliated epithelium of $30 \mu\text{m}$ thickness on average and composed of several cell layers. Basal cells were located close to the insert membrane with fibroblasts in the opposite side (Fig. 2b). Immunostaining pictures with both WGA (mucus) and β -tubulin revealed that goblet cells were a minor part of hRNE tissue compared with both the other cell types, ciliated and basal (Fig. 2c). On every z-stack at the apical side, the total number of cells was determined according to F-actin immunostaining, while goblet cells were counted according to WGA immunostaining. The number of ciliated cells was deduced by subtracting the number of goblet cells from the total number of cells. Goblet:ciliated cells *ratio* was between 1:4 and 1:3. Examinations by electron microscopy of the apical side confirmed the presence of cilia (Fig. 2d).

All these morphological characteristics demonstrated that hRNE tissue was a relevant model for *in vivo* human airway epithelium from a structural point of view.

4.2 Repeated Air-exposures of hRNE tissue

To test repeated exposure, using the exposure protocol described previously, hRNE tissues were exposed to Air at the air-liquid interface, one or two times a week during three weeks. The impact of Air on the epithelium “Air-exposure” was compared to hRNE tissues which stayed in the incubator, “Incubator Control”.

No significant difference in TEER values was observed between Incubator Control: $301 \pm 71 \Omega/\text{cm}^2$ and one or two Air-exposure: $309 \pm 51 \Omega/\text{cm}^2$ and $326 \pm 41 \Omega/\text{cm}^2$ respectively. No LDH release into the basal culture medium was observed, indicating good tissue integrity.

Considering the three inflammatory mediators IL-8, IL-6, and GM-CSF, assessed by ELISA, a daily cytokine production into the basal culture medium was observed. No significant difference between Air-exposure and Incubator Control during the three weeks of experiment was shown, whatever the number of exposure (Table 2).

To assess the effects of repeated Air-exposure, histological characterization of hRNE tissues was performed, looking for potential structural modifications. hRNE tissue stained with Hemalun, Eosin and Alcian Blue did not show any morphological changes after three weeks of exposure. These results were confirmed by daily microscopy observations and the immunostaining of ciliated cells, with β -tubulin, goblet cells, with WGA and

cytoskeleton, with F-actin: no difference between Air-exposure and Incubator Control was observed whatever the week and the number of exposures by week (data not shown).

Finally, variability of cytokines production and TEER during 3 weeks from hRNE tissues delivered at different times was assessed and no significant variation was observed.

Since hRNE tissue characteristics did not vary when the cells were submitted to our exposure protocol using Air as exposure atmosphere, we decided to test an environmental complex mixture (ECM) in order to assess the reactivity of the hRNE model in our experimental conditions. Tobacco smoke was used as the ECM.

4.3 Environmental Complex Mixture (ECM) exposure of hRNE tissue

The exposure protocol previously described was applied to the ECM atmosphere (ECM-exposure), and the results were compared with the ones obtained with the atmosphere without ECM (Air-exposure).

No LDH release in basal culture medium was observed. Concerning TEER measurements, no significant difference after one and two ECM-exposure per week during three weeks was observed: $321 \pm 46 \Omega/\text{cm}^2$ and $296 \pm 17 \Omega/\text{cm}^2$ respectively, compared to the corresponding Air-exposure control. These results indicated good tissue integrity after three weeks of ECM-exposures.

Regarding the levels of inflammatory mediators production in the culture medium collected on the basal side, a significant increase of IL-8 (** $p < 0.01$, $n=6$) was observed, 24 hours after the first exposure of ECM-exposure compared with Air-exposure and only during the first week. Afterwards the IL-8 levels did not significantly vary whatever the atmosphere, the number of weekly exposure or the number of weeks of exposure (Fig. 3). No modulation of both IL-6 and GM-CSF productions was observed regardless of the experimental conditions applied.

With respect to the impact of repeated ECM-exposure on the morphological parameters, the observation of hRNE tissues sections stained with Hemalun, Eosin and Alcian Blue did not reveal significant changes, except a 1.5-fold increase in the thickness of the section. Immunostaining of F-actin cytoskeleton showed a decreased number of the cells located on the apical side (mainly ciliated and goblet cells), consecutive to an increase in cellular diameter, after ECM-exposure compared to Air-exposure (Fig. 4.). This modified morphology was accompanied by a decrease in F-actin immunostaining after two weeks when twice exposed, and three weeks when once exposed (Fig. 5a).

Immunostaining of cilia of the ciliated cells by β -tubulin followed by quantification indicated a decrease of β -tubulin at the third week whatever the number of ECM-exposure by week compared with Air-exposure (Fig. 5b). No significant change was observed for goblet cells number, considered by the mucus quantification using WGA.

Finally, in our conditions, repeated-exposure of hRNE tissue to tobacco smoke led to a temporary increase in IL-8 production, solely, and morphological variations including its thickening, increased diameter of the cells, and alteration of cilia. However, the integrity of the epithelium and the cellular organization remained unchanged.

Taken together our results indicate that hRNE tissue is adapted to the study of the cellular and morphological effects of repeated exposure to an environmental complex mixture.

5. DISCUSSION

Considering the recent increase in atmospheric pollution and the impact of airway diseases worldwide, there is a need for additional research to improve knowledge about the emergence or exacerbation of such diseases (Annesi-Maesano et al., 2006; Guarnieri et al., 2014). In order to investigate the effects of repeated exposures to environmental pollutants on the epithelial barrier of the respiratory tract, we tested the functional

and structural properties of a three-dimensional *in vitro* model, the human Reconstituted Nasal Epithelium (hRNE). We then applied this hRNE tissue to a well-known and harmful environmental complex mixture (ECM), tobacco smoke, as a test, to assess the reactivity of the model.

The originality of our work lies in both optimally managing maintenance of an *in vitro* model so that it mimics the human upper respiratory tract, and in defining an exposure design that permits modeling of a standardized toxicant at the air-liquid interface such that insights into responses relevant to the *in vivo* state can be determined.

Until recently, the cultured airway cells used to study atmospheric pollutants were commonly immortalized cell lines or primary cells mainly derived from the lower parts of the respiratory tract. Depending on the cell type, cells are usually seeded on a culture plate or insert, and grown until reaching confluence in submerged conditions, in order to create a cellular monolayer (Roggen 2006; Verstraelen et al., 2008). These culture conditions were often used due to the benefits that they can provide. The culture time required to reconstitute a cellular monolayer is short; immortalized cell lines are commercially available and experiments can be replicated enough times to confirm observations. But in such culture conditions related to respiratory exposure, cells do not tolerate repeated and long-term exposures as previously shown (Persoz et al., 2010; Persoz et al., 2011; Persoz et al., 2012; Bardet et al., 2014).

For this study, we chose to work with a human airway epithelium model of nasal origin, hRNE tissue, reconstituted at the air-liquid interface from human primary epithelial cells and co-cultured with human airways fibroblasts. The advent of reconstituted epithelium almost two decades ago led to the present availability of “ready to use” models (Epithelix, MatTek) (Gray et al., 1996; BeruBe et al., 2009). The major advantage of hRNE tissue is that it mimics the air-liquid interface barrier. It presents a pseudo stratified scaffold with in between cellular tight junctions and active ionic transport and a multilayer structure fully differentiated in three cell types: ciliated, goblet and basal cells (Huang et al., 2013). In addition hRNE tissue possesses a rich and varied metabolic activity, as it produces a wide range of mediators (inflammatory, mucus, etc) released on apical and basal side (Baxter et al., 2015).

We chose to use a human nasal epithelium model because the nose is the first line of defense against atmospheric pollutants. It should also be noted that the upper and lower respiratory tract form a *continuum* and have similar anatomical, histological and functional properties. Nasal epithelial cells are thus often used to represent airway cells, facilitating the study of biological responses of certain cellular populations which are difficult to obtain such as bronchial epitheliums (McDougall et al., 2008).

Histological and microscopy analysis were used to assess the structure of hRNE tissue. This proved to be very useful as it provided information on its multilayer structure, and evidence of its mucociliary function capacity. Similarly, goblet:ciliated cells *ratio* at the apical side estimated using differential cellular immunostaining was close to 1:4 - 1:3. This *ratio* has been reported in the same order of magnitude as found in *in vivo* human airway epithelia (1:5) (Rogers 2003; Ganesan et al., 2013)

Another unique characteristic of hRNE tissue is its lifetime: we were able to maintain this three-dimensional model in defined culture conditions for at least 2 months without morphological changes. Renewal of this reconstituted epithelium was very low, just as with real epithelial cells in the respiratory tract. All these observations confirmed data about the similarity of this model with *in situ* epithelium, from recent publications which seemed relevant for the study of the cellular effects of chronic exposure to air pollutants (Crespin et al., 2014; Luettich et al., 2014; Frieke Kuper et al., 2015).

In order to test the absence of impact of repeated exposures over a period of several weeks, we compared hRNE tissues that stayed in the incubator with hRNE tissues exposed to Air outside the incubator. The impact of ambient air exposure on airway epithelial cells in *in vitro* models has been previously reported demonstrating that temperature and humidity variations could modulate inflammatory response or mucus production (Beisswenger et al., 2004; Davidovich et al., 2011). In our conditions, temperature and humidity parameters were constant and we did not note any significant differences for IL-8, IL-6 and GM-CSF daily release in culture medium, loss of TEER and cellular functionality. Histological assessments did not show any difference in mucociliary function either. Finally our exposure conditions over several weeks did not show any radical impairment of the hRNE tissue. These observations could be related to the short Air-exposure time, and the length of recovery time between exposures. The design that we used, adapted for short time exposure, should be tested for longer exposure times.

Finally, we applied this exposure design to an environmental complex mixture (ECM), tobacco smoke, to test its robustness. The choice of the static exposure protocol versus dynamic was based on our intention to expose the epithelium to tobacco smoke, as representative of an environmental complex mixture, without any intermediate treatment between generation and exposure to the deposited particulate matters. The majority of studies using tobacco smoke as a source of environmental pollutants have been performed on cell cultures instead of reconstituted epitheliums. Their exposure protocol was usually dynamic using a smoking machine, their aim being testing the toxicity of whole tobacco smoke (Azzopardi et al., 2015; Iskandar et al., 2015). These reported an increase in inflammatory mediators after exposure associated with a loss of cellular viability (St-Laurent et al., 2009; Comer et al., 2014). Only a few studies have examined the impact of tobacco smoke on a three-dimensional model (Iskandar et al., 2013; Luetlich et al., 2014; Iskandar et al., 2015; Kuehn et al., 2015). Iskandar et al tested the effect of a single tobacco smoke exposure during 28 min on bronchial 3D-epitheliums, which led to tissue damage (Iskandar et al., 2015). According to Talikka et al., when hRNE tissues were exposed four times over 6-7 minutes to cigarette smoke in between recovery periods of one hour, for one day only, an increase in the secretion of different cytokines was observed twenty-four hours after the last exposure, with a small impairment of tissue integrity (Luetlich et al., 2014). Kuehn et al (Kuehn et al., 2015) using the same exposure protocol showed that gene expression profiling from the nasal 3-D model could demonstrate an impact of tobacco smoke on xenobiotic metabolism. However the epitheliums were repeatedly exposed to tobacco smoke but not more than during one day, which limited the use of potential biomarkers to short-term effect biomarkers, contrarily to our protocol.

In our conditions, when a significant increase of IL-8 secretion twenty-four hours only after the first ECM-exposure was observed, no effect on cellular viability or TEER occurred, indicating apparent mild exposure conditions. Interestingly even then, repeatedly ECM-exposure for only a short time several times a week during several weeks produced morphological changes observed on the apical side, changes that could be related to the response of the PM deposited on the tissue. As the mucus is removed only once a week, the PM deposited on the mucus have a higher likelihood to interact with the underlying cells. (Leopold et al., 2009; Haswell et al., 2010; Anderson et al., 2013; Ganesan et al., 2013).

Immunostaining of F-actin showed an increase in cellular diameter compared to cells exposed to Air. These results could be related to hyperplasia already noted in other *in vitro* studies (Rogers 2003; Balharry et al., 2008; Haswell et al., 2010; Adam et al., 2014). At the same time, we noticed a decrease of β -tubulin immunostaining in accordance with the number of ECM-exposure. These morphological changes appeared as early as at the end of the first week of exposure, and involved both mucociliary function and cytoskeleton.

In the lung, the mucociliary escalator acts as a primary innate defense mechanism, in which motile ciliated epithelial cells eliminate particles and pathogens trapped in mucus from the airways. Disruption of airway epithelial cell function after exposure to airborne pollutants such as tobacco smoke results in impaired mucociliary clearance, but the mechanisms by which this occurs remain unclear. Some authors have attributed this effect to a decrease in the number of ciliated cells (Ganesan et al., 2013), changes in cilia structure and/or beat frequency (Leopold et al., 2009; Anderson et al., 2013) or a re-epithelialization dominated by goblet cells, resulting in excess mucus production (Haswell et al., 2010). In our conditions, the proportion of the different types of cells at the apical side of the hRNE tissue was unchanged. We thus hypothesize that this decrease in β -tubulin immunostaining intensity is related to the cilia themselves.

The presence of mucus on the apical side of the tissue is limited to these three-dimensional epithelium models, contrary to the monolayer models, whatever the cell type. Its presence changes the exposure design, and could help understand the delayed impact of ECM-exposure. Indeed pollutants, gaseous or particulate matter, can be captured or dissolved in mucus matrix and impact latter and longer the hRNE tissue. The interaction of environmental pollutants with biological matrices like mucus seems to play important role in tissue response (Fricke Kuper et al., 2015).

Morphological impairments after ECM-exposures compared to Air-exposures or Incubator Control need further investigation, and confirmation with a greater number of experiments. Nevertheless, histological assessment can be a reliable approach to study mucociliary function. These markers can also help study mechanisms during the different steps (impairment, migration, proliferation, differentiation) that lead to airway remodeling of airway diseases (Crespin et al., 2014).

Our results demonstrate that the hRNE *in vitro* model can be used to evaluate the effects of repeated exposures to the atmospheric pollutants which we are daily exposed to throughout our lives. It is easy to setup in any laboratory with a cell culture room, since the hRNE epithelium is commercially available, for teams willing to assess impacts of environmental complex mixtures. It does however have certain limits: a corollary of its complexity is that the use of such a model involves an experimental burden that should not be underestimated. Reconstituted tissue preparation is a relatively long process, and consequently tissue culture difficulties can have more impact in terms of cost and delay than the relatively shorter time required to grow useable monolayer cultures of immortalized cell lines.

Finally for this study we opted for a multi-donor model to reduce inter donor variability: previous use of single donor batches led to qualitatively similar cytokine production, but levels varied from one donor to another donor (personal data). The multi-donor epitheliums tested did not shown significant changes on tissue integrity (TEER), IL-8 production or even in the visual structure occurred during the long periods of culture. Thus, this multi-donor reconstitution was stable with no interaction of cells from different donors.

This model allowed the implementation process of combined use of tridimensional tissue and exposure at the air-liquid interface. Exposure effects should be confirmed by using mono-donor epithelia in order to consider inter-individual reactivity.

Modern experimental European Union policy advocates finding *in vitro* alternatives to replace animal testing (Buckland 2011). Human reconstituted epithelium models are currently the best representation of human respiratory tract physiology, and also the most robust for performing repeated exposures to atmospheric pollutants. They will help bridge the gap between *in vivo* and *in vitro* studies and bring new research perspectives.

References

- Annesi-Maesano, I., Dab W. 2006. [Air pollution and the lung: epidemiological approach]. *Med Sci (Paris)* 22(6-7), 589-594.
- Guarnieri, M., Balmes J.R. 2014. Outdoor air pollution and asthma. *Lancet* 383(9928), 1581-1592.
- Ganesan, S., Comstock A.T., Sajjan U.S. 2013. Barrier function of airway tract epithelium. *Tissue Barriers* 1(4), e24997.
- Kumar, R.K., Siegle J.S., Kaiko G.E., Herbert C., Mattes J.E., Foster P.S. 2011. Responses of airway epithelium to environmental injury: role in the induction phase of childhood asthma. *J Allergy (Cairo)* 2011, 257017.
- Proud, D. 2011. Role of rhinovirus infections in asthma. *Asian Pac J Allergy Immunol* 29(3), 201-208.
- BeruBe, K., Aufderheide M., Breheny D., Clothier R., Combes R., Duffin R., Forbes B., Gaca M., Gray A., Hall I., Kelly M., Lethem M., Liebsch M., Merolla L., Morin J.P., *et al.* 2009. In vitro models of inhalation toxicity and disease. The report of a FRAME workshop. *Altern Lab Anim* 37(1), 89-141.
- Buckland, G.L. 2011. Harnessing opportunities in non-animal asthma research for a 21st-century science. *Drug Discov Today* 16(21-22), 914-927.
- Pampaloni, F., Reynaud E.G., Stelzer E.H. 2007. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(10), 839-845.
- Fulcher, M.L., Randell S.H. 2013. Human nasal and tracheo-bronchial respiratory epithelial cell culture. *Methods Mol Biol* 945, 109-121.
- Whitcutt, M.J., Adler K.B., Wu R. 1988. A biphasic chamber system for maintaining polarity of differentiation of cultured respiratory tract epithelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 24(5), 420-428.
- Rothen-Rutishauser, B.M., Kiama S.G., Gehr P. 2005. A three-dimensional cellular model of the human respiratory tract to study the interaction with particles. *Am J Respir Cell Mol Biol* 32(4), 281-289.
- Huang, S., Wiszniewski L., Constant S., Roggen E. 2013. Potential of in vitro reconstituted 3D human airway epithelia (MucilAir) to assess respiratory sensitizers. *Toxicol In Vitro* 27(3), 1151-1156.
- Crespin, S., Bacchetta M., Bou Saab J., Tantilipikorn P., Bellec J., Dudez T., Nguyen T.H., Kwak B.R., Lacroix J.S., Huang S., Wiszniewski L., Chanson M. 2014. Cx26 regulates proliferation of repairing basal airway epithelial cells. *Int J Biochem Cell Biol* 52, 152-160.
- Anderson, S.E., Khurshid S.S., Meade B.J., Lukomska E., Wells J.R. 2013. Toxicological analysis of limonene reaction products using an in vitro exposure system. *Toxicol In Vitro* 27(2), 721-730.
- Boublil, L., Assemat E., Borot M.C., Boland S., Martinon L., Sciare J., Baeza-Squiban A. 2013. Development of a repeated exposure protocol of human bronchial epithelium in vitro to study the long-term effects of atmospheric particles. *Toxicol In Vitro* 27(2), 533-542.
- Bardet, G., Achard S., Loret T., Desauziers V., Momas I., Seta N. 2014. A model of human nasal epithelial cells adapted for direct and repeated exposure to airborne pollutants. *Toxicol Lett* 229(1), 144-149.
- Roggen, E.L. 2006. Recent developments with B-cell epitope identification for predictive studies. *J Immunotoxicol* 3(3), 137-149.
- Verstraelen, S., Bloemen K., Nelissen I., Witters H., Schoeters G., Van Den Heuvel R. 2008. Cell types involved in allergic asthma and their use in in vitro models to assess respiratory sensitization. *Toxicol In Vitro* 22(6), 1419-1431.
- Persoz, C., Achard S., Leleu C., Momas I., Seta N. 2010. An in vitro model to evaluate the inflammatory response after gaseous formaldehyde exposure of lung epithelial cells. *Toxicol Lett* 195(2-3), 99-105.
- Persoz, C., Leleu C., Achard S., Fasseu M., Menotti J., Meneceur P., Momas I., Derouin F., Seta N. 2011. Sequential air-liquid exposure of human respiratory cells to chemical and biological pollutants. *Toxicol Lett* 207(1), 53-59.
- Persoz, C., Achard S., Momas I., Seta N. 2012. Inflammatory response modulation of airway epithelial cells exposed to formaldehyde. *Toxicol Lett* 211(2), 159-163.
- Gray, T.E., Guzman K., Davis C.W., Abdullah L.H., Nettesheim P. 1996. Mucociliary differentiation of serially passaged normal human tracheobronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 14(1), 104-112.
- Baxter, A., Thain S., Banerjee A., Haswell L., Parmar A., Phillips G., Minet E. 2015. Targeted omics analyses, and metabolic enzyme activity assays demonstrate maintenance of key mucociliary characteristics in long term cultures of reconstituted human airway epithelia. *Toxicol In Vitro* 29(5), 864-875.
- McDougall, C.M., Blaylock M.G., Douglas J.G., Brooker R.J., Helms P.J., Walsh G.M. 2008. Nasal epithelial cells as surrogates for bronchial epithelial cells in airway inflammation studies. *Am J Respir Cell Mol Biol* 39(5), 560-568.
- Rogers, D.F. 2003. Pulmonary mucus: Pediatric perspective. *Pediatr Pulmonol* 36(3), 178-188.
- Luettich, K., Xiang Y., Iskandar A., Sewer A., Martin F., Talikka M., Vanscheeuwijck P., Berges A., Veljkovic E., Gonzalez-Suarez I., Schlage W., Hoeng J., Peitsch M. 2014. Systems toxicology approaches enable mechanistic comparison of spontaneous and cigarette smoke-related lung tumor development in the A/J mouse model. *Interdisciplinary toxicology* 7(2), 73-84.

- Frieke Kuper, C., Grollers-Mulderij M., Maarschalkerweerd T., Meulendijks N.M., Reus A., van Acker F., Zondervan-van den Beuken E.K., Wouters M.E., Bijlsma S., Kooter I.M. 2015. Toxicity assessment of aggregated/agglomerated cerium oxide nanoparticles in an in vitro 3D airway model: the influence of mucociliary clearance. *Toxicol In Vitro* 29(2), 389-397.
- Beisswenger, C., Platz J., Seifart C., Vogelmeier C., Bals R. 2004. Exposure of differentiated airway epithelial cells to volatile smoke in vitro. *Respiration* 71(4), 402-409.
- Davidovich, N.E., Kloog Y., Wolf M., Elad D. 2011. Mechanophysical stimulations of mucin secretion in cultures of nasal epithelial cells. *Biophys J* 100(12), 2855-2864.
- St-Laurent, J., Boulet L.P., Bissonnette E. 2009. Cigarette smoke differently alters normal and ovalbumin-sensitized bronchial epithelial cells from rat. *J Asthma* 46(6), 577-581.
- Comer, D.M., Elborn J.S., Ennis M. 2014. Inflammatory and cytotoxic effects of acrolein, nicotine, acetaldehyde and cigarette smoke extract on human nasal epithelial cells. *BMC Pulm Med* 14, 32.
- Iskandar, A.R., Martin F., Talikka M., Schlage W.K., Kostadinova R., Mathis C., Hoeng J., Peitsch M.C. 2013. Systems approaches evaluating the perturbation of xenobiotic metabolism in response to cigarette smoke exposure in nasal and bronchial tissues. *Biomed Res Int* 2013, 512086.
- Iskandar, A.R., Xiang Y., Frentzel S., Talikka M., Leroy P., Kuehn D., Guedj E., Martin F., Mathis C., Ivanov N.V., Peitsch M.C., Hoeng J. 2015. Impact Assessment of Cigarette Smoke Exposure on Organotypic Bronchial Epithelial Tissue Cultures: A Comparison of Mono-Culture and Coculture Model Containing Fibroblasts. *Toxicol Sci* 147(1), 207-221.
- Kuehn, D., Majeed S., Guedj E., Dulize R., Baumer K., Iskandar A., Boue S., Martin F., Kostadinova R., Mathis C., Ivanov N.V., Frentzel S., Hoeng J., Peitsch M.C. 2015. Impact assessment of repeated exposure of organotypic 3D bronchial and nasal tissue culture models to whole cigarette smoke. *J Vis Exp* (96).
- Leopold, P.L., O'Mahony M.J., Lian X.J., Tilley A.E., Harvey B.G., Crystal R.G. 2009. Smoking Is Associated with Shortened Airway Cilia. *PLoS One* 4(12).
- Haswell, L.E., Hewitt K., Thorne D., Richter A., Gaca M.D. 2010. Cigarette smoke total particulate matter increases mucous secreting cell numbers in vitro: a potential model of goblet cell hyperplasia. *Toxicol In Vitro* 24(3), 981-987.
- Balharry, D., Sexton K., BeruBe K.A. 2008. An in vitro approach to assess the toxicity of inhaled tobacco smoke components: nicotine, cadmium, formaldehyde and urethane. *Toxicology* 244(1), 66-76.
- Adam, D., Perotin J.M., Lebagry F., Birembaut P., Deslee G., Coraux C. 2014. [Regeneration of airway epithelium]. *Rev Mal Respir* 31(4), 300-311.

Figures and legends

Fig. 1.

Days	0	1	2	3	4	5	6	7
One exposure	X	+	+	+	O+	+	+	H+
Two exposures	X	+	X+	+	O+	+	+	H+

Fig.1. Weekly exposure protocol.

hRNE tissue was exposed at air-liquid interface (**X**) to Air (Air-exposure) or Environmental Complex Mixture (ECM-exposure) during 5 min once or twice a week at 48 hour intervals during three weeks. Culture medium was harvested every day (**+**) to perform cytokine measurements and LDH activity. Four days after the first exposure of the week, TEER was evaluated (**O**). Histological observations (**H**) were performed one week after the first exposure of the week.

Tables

Table 1 Immunostaining reagents for hRNE tissue examinations.

	Immunostaining reagents	Dilutions
β-tubulin	<i>Primary antibody:</i> Monoclonal anti-β-tubulin antibody produced in mouse, T4026, Sigma-Aldrich, (MO, USA)	1:200
	<i>Secondary antibody:</i> Goat anti-Mouse IgG1 secondary antibody, AlexaFluor® 488 conjugate, A-21121, Invitrogen, (WI, USA)	1:300
F-actin	Phalloidin (Alexa Fluor® 555 Phalloidin, A34055, Invitrogen, (WI, USA))	1:50
Mucus	WGA (Wheat Germ Agglutinin, Alexa Fluor® 633 conjugate, W21404, Invitrogen,(WI, USA))	1:200

Table 2 Daily productions of IL-8, IL-6 and GM-CSF (pg/mL) after exposures of human Reconstituted Nasal Epithelium (hRNE) to Air compared with the Incubator Control, over three weeks. One Air-exposure corresponds to five minutes exposure by per week over three weeks, Two Air-exposures, to two five minutes exposures per week at 48 h intervals during three weeks. Incubator control represents hRNE tissue control remaining in incubator during the experiment. Comparisons between Incubator Control and one Air-exposure or two Air-exposures, or one Air-exposure and two Air-exposure of daily IL-8, IL-6 or GM-CSF released in culture medium were performed with Wilcoxon-Mann-Whitney non-parametric test and shown no significant difference (mean ± standard deviation, at least n=2 by condition).

	IL-8 (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	GM-CSF (pg/mL)
One Air-exposure	1228 ± 216	105 ± 39	42 ± 27
Two Air-exposures	1530 ± 596	113 ± 43	38 ± 26
Incubator Control	1240 ± 258	74 ± 26	35 ± 19

Résumé

L'augmentation de la prévalence mondiale des pathologies respiratoires et allergiques depuis la seconde moitié du 20^{ème} siècle ainsi que l'émergence de symptômes spécifiques liés à des environnements clos dans les années soixante-dix, ont contribué à incriminer l'exposition à la pollution de l'air intérieur, en particulier aux composés organiques volatils (COV), comme facteur de risque dans l'apparition de ces pathologies. Les différentes approches épidémiologiques et expérimentales existantes ont permis de renseigner la composition, les sources, les déterminants et les effets de cette pollution en particulier sur l'appareil respiratoire humain, première voie d'exposition. A l'heure actuelle, les politiques expérimentales visent à substituer les expérimentations animales par le développement de méthodes alternatives, dont les méthodes *in vitro*, pour des raisons économiques et éthiques. Cependant, les modèles *in vitro* permettant l'étude des polluants environnementaux sur les cellules de l'arbre respiratoire sont encore peu développés.

L'objectif de cette thèse est donc de proposer une approche expérimentale *in vitro* adaptée à l'étude d'impact des expositions de cellules épithéliales nasales humaines à des polluants environnementaux, en particulier les COV. La force de ce travail est d'avoir mis en place des méthodologies approchant les conditions réelles d'exposition, et de les avoir appliquées à des atmosphères d'environnement intérieur. Au terme de ces travaux, les acquis méthodologiques ont porté sur le **modèle** de cellules épithéliales nasales évoluant de la culture primaire à l'épithélium reconstitué, constitué de plusieurs types cellulaires, proche de l'épithélium respiratoire humain ; la **génération** d'atmosphère chargée en mono (formaldéhyde) ou multi-polluants (COV issus de peinture du commerce), et surtout son **contrôle** analytique, étape essentielle pour valider notre démarche expérimentale ; **l'exposition répétée** (jusqu'à 3 par semaine, de durée allant jusqu'à 2 heures, sur une période totale d'au moins un mois) en interface air-liquide, sans perte d'intégrité cellulaire, dynamique (sous flux d'air) pour les polluants gazeux, ou statique (sans flux) pour dépôt des particules ; l'étude **morphologique et histologique** de l'épithélium, développée comme marqueur d'effet complétant l'approche biologique centrée sur la réponse inflammatoire. L'exposition au formaldéhyde gazeux à une concentration proche des niveaux environnementaux intérieur, n'a pas eu d'effet sur les marqueurs de l'inflammation. Lors de l'exposition de l'épithélium reconstitué choisi (MucilAirTM, Société Epithelix) aux COV, une inhibition de la production spécifique d'IL-8 dépendant de la dose et du nombre d'exposition est observée, alors que l'intégrité tissulaire de l'épithélium n'est pas altérée. Le mécanisme de cette inhibition demande à être exploré plus avant. Pour autant, la réactivité du modèle, en matière de réaction inflammatoire et de changement de structure de l'épithélium a été validée lors d'expositions à un mélange environnemental complexe (particules de fumée de tabac). Notre approche *in vitro* innovante peut être élargie à l'étude d'autres atmosphères multi-polluants (chimiques, physiques et biologiques) afin d'être au plus proche des conditions réelles d'expositions, mais à d'autres organes cibles.

Mots clés : Epithélium respiratoire reconstitué, atmosphères mono ou multi-polluants, contrôle analytique, expositions répétées, interface air-liquide

Abstract

Increase of respiratory diseases since the second half of the 20th century and emergence of specific symptoms related to closed environments contributed to suspect indoor air pollution, in particular volatile organic compounds (VOC), as a risk factor in the onset of these diseases. Epidemiological and experimental approaches are useful to determine its sources, determinants and effects on the human respiratory tract. Current experimental policies favor replacing animal experiments by alternative methods like *in vitro* methodologies, for economic and ethical reasons. Until now, *in vitro* models have been poorly developed to study environmental pollutants on respiratory cells. The objective of our work was to propose an experimental approach adapted to the study of the impact of environmental pollutants, particularly VOC, on human nasal epithelial cells. The strength of this work is to set up a methodology close to actual conditions of exposure, and apply them to indoor environment atmospheres. The methodology developed aimed to study **reconstituted epithelium** coming from primary culture of nasal cells, composed of several cell types, close to human respiratory epithelium; **generate** atmosphere charged with mono (formaldehyde) or multi-pollutant (VOC paint), and especially its analytical **control** (an essential step to validate our experimental approach); and **repeated exposure** (3 per week, until to two hours, over a total period of one month) at air-liquid interface without loss of cellular integrity, in dynamic conditions (under airflow) for gaseous pollutants, or static (without airflow) for particles. The setup of a **morphological and histological** approach allowed to complete biological effect (inflammatory response). Gaseous formaldehyde exposure at low concentration had no effect on inflammatory markers. VOC exposures on selected reconstituted epithelium (MucilAirTM, Epithelix Company) showed a decreased release of IL-8 depending on the dose and the number of exposure, without tissue damage. The mechanism of this effect needs to be further investigated. Responsiveness of the model, in terms of inflammation and structural changes of the epithelium was validated by assessing complex environmental mixture (tobacco smoke particles). Our innovative *in vitro* approach can be extended to the study of other multi-pollutant atmospheres (chemical, physical and biological) in order to get close to the actual conditions of exposure, but also by using other target organs.

Key words: human airway reconstituted epithelium, atmosphere mono or multi-pollutant, analytical control, repeated exposure, air-liquid interface