



Étude prospective pilote des effets d'une exposition ex vivo de lymphocytes T humains à la pollution atmosphérique particulaire : recherche de biomarqueurs et influence de l'âge

Margueritta Al Zallouha

► To cite this version:

Margueritta Al Zallouha. Étude prospective pilote des effets d'une exposition ex vivo de lymphocytes T humains à la pollution atmosphérique particulaire : recherche de biomarqueurs et influence de l'âge. Toxicologie. Université du Littoral Côte d'Opale, 2017. Français. NNT : 2017DUNK0472 . tel-02145214

HAL Id: tel-02145214

<https://theses.hal.science/tel-02145214>

Submitted on 2 Jun 2019

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.



Université du Littoral Côte d'Opale

UCEiV EA4492, Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant

Ecole Doctorale 104 SMRE, Science de la Matière du Rayonnement et de l'Environnement

THESE

en vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'Université du Littoral Côte d'Opale

Discipline : **Toxicologie**

Etude prospective pilote des effets d'une exposition *ex vivo* de lymphocytes T humains à la pollution atmosphérique particulaire : Recherche de biomarqueurs et influence de l'âge

Présentée par :

Margueritta AL ZALLOUHA

le 7 décembre 2017

COMPOSITION DU JURY :

Lydie SPARFEL

Saadia Kerdine-Romer

Nadira DELHEM

Raphael DELEPEE

Yann LANDKOCZ

Sylvain BILLET

Pierre GOSSET

Jean Charles CAILLIEZ

Dominique COURCOT

Université de Rennes 1

Université Paris-Sud

Institut de Biologie de Lille

Université de Caen-Normandie

Université du Littoral Côte d'Opale

Université du Littoral Côte d'Opale

Groupement des Hôpitaux de l'Institut Catholique de Lille

Université Catholique de Lille

Université du Littoral Côte d'Opale

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Membre invité

Encadrant

Encadrant

Co-directeur

Directeur

A ma famille,

A ma grand-mère,

Remerciements

Arrivant au terme de ce travail, je souhaite remercier toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de cette thèse.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury de thèse, Pr Lydie SPARFEL et Pr Saadia Kerdine-Romer pour avoir accepté d'évaluer mon travail en tant que rapporteurs et Dr Nadira Delhem et Pr Raphael Delepee pour avoir accepté d'être les examinateurs de ma thèse.

J'adresse mes remerciements à mes deux directeurs de thèse, Pr Dominique Courcot et Pr Jean Charles Caillez pour avoir accepté de diriger cette thèse. Pr Courcot, merci pour votre accueil chaleureux au sein de l'équipe dès mon arrivée en stage de Master 2. Vous saviez vous rendre disponible malgré un emploi du temps bien chargé, vous prêtiez une attention particulière à cette thèse et surtout vous vouliez être sûr que tout allait bien et que j'avais toujours le sourire sur le visage. Vous étiez toujours présent pour m'aider et m'encourager. Merci pour le temps passé les soirs et les weekends à corriger mon manuscrit. C'était vraiment un grand plaisir de faire votre connaissance et de travailler avec vous.

Mes remerciements s'adressent aussi à mes deux co-encadrants de thèse. Pr Pierre Gosset merci pour votre aide dans la gestion des prélèvements sanguins et d'avoir assuré le lien entre le laboratoire et l'hôpital. Egalement merci pour les corrections apportées au manuscrit et pour votre participation personnelle (sujet 86). Je tiens à remercier mon deuxième encadrant, Dr Sylvain Billet. Sylvain, merci pour ta confiance en moi dès l'encadrement de mon stage de master 2. Merci pour la correction du manuscrit et les longues réunions surtout en fin de thèse. Merci pour tes remarques et conseils constructives. Au-delà du volet professionnel et scientifique, merci pour ta bonne humeur et de tes jeux de mots !! C'était toujours sympa de discuter avec toi !! Tu m'as fait découvrir les vraies traditions du carnaval dunkerquois et c'était toujours un plaisir de passer cette période de l'année avec toi !

Yann, ou Dr Landkocz, les mots n'exprimeront jamais ma gratitude envers toi. Merci pour ta patience, tu m'a tout appris au laboratoire dès mon arrivé en 2014. Pour moi, tu n'étais pas juste un post-doc, tu étais un encadrant toujours disponible même après avoir eu ton poste de maître de conférence tu trouvais toujours le temps pour m'aider et m'encourager. Merci pour ton aide dans les manipes, les nuits passées à bosser tard au laboratoire sur les prélèvements sanguins. Merci pour ton aide dans le traitement et l'analyse statistique de mes résultats. Merci pour ta disponibilité les

weekends et les jours de vacances. Sans ta présence il aurait été impossible de terminer mon travail à temps ! Je n'oublierai jamais ta réponse à chaque fois que je te remerciais : « Je fais juste mon boulot !! ». Tu es pour moi l'exemple du vrai chercheur et au-delà de ça tu es un ami et un frère !

Je souhaite remercier Dr Frédérique LEDOUX, Dr Mireille BOURGIE, Mme Clémence MEAUSOONE et Dr Simone PODDIGHE pour leurs contributions à ce travail. Fred, toujours disponible pour répondre à toutes mes questions sur les particules. Merci pour ta grande pédagogie, ta façon simple et efficace de m'expliquer les choses. C'était vraiment un plaisir de faire ta connaissance et de découvrir la personne franche et pleine de qualités que tu es. Un grand merci à Mireille (MiMi), en plus de l'amitié que l'on partage, j'ai eu la chance de travailler avec une personne perfectionniste, ce qui m'a motivé à avancer surtout en fin de thèse. Merci pour tes conseils et ta motivation, sans ton aide je n'aurais jamais pu finir à temps la partie des miARN. Je remercie aussi Clémence, qui a effectué son stage de master 2 sur mon projet de thèse, et qui est maintenant doctorante au sein de l'équipe. Merci pour ton aide dans les manips, notamment sur les échantillons sanguins, je sais que s'il fallait les refaire tu seras là à mes côtés surtout pour l'étape de la récupération de l'anneau de PBMC, ta partie préférée !! J'ai eu immédiatement confiance en toi et tu es devenue une amie proche. Je remercie également Simone (Simomo) pour tout ce que tu m'as appris en métabolomique. J'ai eu la chance de faire ta connaissance en Sardaigne et de te revoir dans notre laboratoire par la suite. Merci pour ton amitié et ton encouragement au continu ! Et également les quelques mots en italiens que j'ai appris !!

Une pensée spéciale au Pr Maurizio GUALTIERI, ancien directeur au sein de notre équipe. J'ai eu la chance de vous connaître juste pour quelques mois mais cela m'a suffi pour en apprendre beaucoup de vous. Vous m'avez donné la vraie image du chercheur. Perfectionniste et motivé, il suffisait de vous poser une question pour que je reçoive une tonne de publis sur mon bureau. Je n'oublierai pas les soirs que vous avez passés avec Yann et moi au laboratoire pour optimiser la technique de cytométrie en flux. Vous avez laissé une trace indélébile au sein de notre équipe.

Je remercie également Dr Anthony VERDIN (strebezeu), dont sa présence est indispensable au laboratoire. Merci également pour les moments agréables passés en dehors du labo à suivre les matches de foot ! Merci également au Dr Perrine MARTIN pour ses conseils avisés notamment en immunologie.

Je remercie également le Centre Commun de Mesure (CCM) et l'équipe CTEA pour le prélèvement et la caractérisation des particules ainsi que centre de nutrition clinique « Naturalpha » et le Groupement des Hôpitaux de l'Institut Catholique de Lille (GHICL) pour les prélèvements sanguins.

Merci à tous les doctorants, amis-collègues et membres de la MREI 1 et 2 pour l'ambiance agréable partagée pendant ces 4 ans aussi bien dans le laboratoire qu'à l'extérieur. Un merci spécial à Jihane (Jiji), Cyril (Kyrilo), Amélie, Isabelle pour les bons moments et soirées passés ensemble. Cyril, j'ai eu la chance de te rencontrer en master 2 et de partager avec toi le même parcours de thèse ainsi que des moments d'amitié inoubliables (surtout en fin de nos thèses). Merci à Rabih MAAMARY (mon photographe attitré), un frère qui est toujours à mes côtés. Sara HANY, ma grande sœur qui s'est occupée de moi dès le premier jour de mon arrivé à Dunkerque. Merci pour ton soutien illimité, ta disponibilité, merci pour ton amitié tout simplement. Un merci du fond du cœur à Gauthier TREMOLET, pour ton aide dans les manips et surtout au-delà de ça, merci pour ta présence à mes côtés au quotidien, pour ton soutien moral et ton encouragement. Je n'aurais jamais pu arriver à ce jour-là sans ta présence à mes côtés. Je remercie également tous mes amis et proches au Liban bien trop nombreux pour être cités nommément.

Enfin, aucune formule ne serait assez forte pour remercier ma famille, mon père Samir, ma mère Jacqueline et mon frère Anthony. Si je suis là aujourd'hui, c'est grâce à vous ! Merci pour votre encouragement et votre soutien tout au long des années malgré la distance. Une pensée spéciale à ma grand-mère qui me manque énormément !

SOUTIEN FINANCIER

La réalisation de ce travail a été rendue possible grâce au soutien :

- de l'**Université du Littoral Côte d'Opale (ULCO)** et de l'Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur la Vivant (UCEiV, EA4492) et du **Pôle Métropolitain de la Côte d'Opale (PMCO)** qui ont financé mon doctorat



- des partenaires qui ont financé le projet de recherche : L'**Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME)** et la **Région Hauts-de-France**.



VALORISATION SCIENTIFIQUE

1. Publications dans des revues scientifiques internationales

AL ZALLOUHA M., LANDKOCZ Y., BRUNET J., COUSIN R., GENTY E., COURCOT D., SIFFERT S., SHIRALI P., BILLET S., 2016. Usefulness of toxicological validation of VOCs catalytic degradation by air-liquid interface exposure system. *Environmental Research*. IF 2015: 3.088

BRUNET J., GENTY E., LANDKOCZ Y., AL ZALLOUHA M., BILLET S., COURCOT D., SIFFERT S., THOMAS D., DE WEIRELD G., COUSIN R., 2015. Identification of by-products issued from toluene catalytic oxidation by chemical and biological methods. *Comptes Rendus Chimie*, 18 (10) : 1084-1093. IF 2014 : 1,71

2. Communications affichées

2.1. Communications lors de congrès internationaux :

AL ZALLOUHA M., MEAUSOONE C., LANDKOCZ Y., CAZIER F., COURCOT D., CAILLIEZ J.C., GOSSET P., BILLET S., HALKET J., 2016. Air pollution and ageing: development of a metabolomic approach. 2nd metabolomics Sardinian Scientific School “How to bridge metabolomics and genomics”, 12-16 Septembre 2016, Pula, Sardinia, Italy.

BILLET S., AL ZALLOUHA M., LANDKOCZ Y., FOUGERE B., LEPERS C., DELEPEE R., CAZIER F., MARTIN P.J., VERDIN A., LEDOUX F., KELLY F.J., SICHEL F., SHIRALI P., GOSSET P., 2015. Urban air pollution fine particulate matter exposure: Biomarkers of carcinogenesis modulated by people ageing. 51th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX), 13-16 Septembre 2015, Porto, Portugal

2.2. Journées scientifiques nationales :

AL ZALLOUHA M., LANDKOCZ Y., VITAGLIANO J.-J., LEDOUX F., CAZIER F., CAILLIEZ J.-C., GOSSET P., COURCOT D., BILLET S., 2017. Recherche de l'influence de l'âge sur la réponse biologique à la pollution atmosphérique. Journée Interdisciplinaire sur la Qualité de l'Air (JIQA), 2,3 Février 2017, Lille, France.

AL ZALLOUHA M., LANDKOCZ Y., VITAGLIANO J-J., LEDOUX F., CAZIER F., CAILLIEZ J-C., GOSSET P., COURCOT D., BILLET S., 2017. Recherche de biomarqueurs d'exposition des lymphocytes T aux PM2.5, influence de l'âge. 3ème Colloque International Francophone en Environnement et Santé (CES), 23-25 Octobre 2017, Dunkerque, France.

BORGIE M., AL ZALLOUHA M., LANDKOCZ Y., TREMOLET G., VITAGLIANO J.J., CAILLIEZ J.C., LEDOUX F., VERDIN A., MARTIN P.J., GOSSET P., COURCOT D., BILLET S., 2017. miARN : biomarqueurs d'exposition à la pollution atmosphérique particulaire, en fonction de l'âge, dans les lymphocytes humains. 3ème Colloque International Francophone en Environnement et Santé (CES), 23-25 Octobre 2017, Dunkerque, France.

AL ZALLOUHA M., LANDKOCZ Y., BRUNET J., COUSIN R., GENTY E, MARTIN P.J., VERDIN A., COURCOT D., SIFFERT S., SHIRALI P., BILLET S., 2014. Métabolisation de composés issus de la dégradation catalytique du toluène par des cellules épithéliales pulmonaires humaines exposées en interface air/liquide. Congrès annuel de la Société de Pharmac-Toxicologie Cellulaire, 9-10 octobre 2014, Rennes, France.

TABLE DE MATIERES

Liste des figures	i
Liste des tableaux.....	iv
Liste des abréviations	vi
Avant-propos	ix
Chapitre 1 : Analyse bibliographique.....	1
Partie 1 : Les particules atmosphériques	2
1. Définition, classification et élimination de l'atmosphère	2
1.1. Classification et mécanismes de formation des particules	2
1.2. Elimination des particules	8
2. Composition chimique des particules	8
2.1. Les espèces carbonées	9
2.1.1. Le carbone élémentaire (EC).....	9
2.1.2. Le carbone organique (OC)	9
2.2. La fraction minérale.....	10
2.2.1. Les ions inorganiques.....	10
2.2.1.1 Les composés à base de soufre.....	10
2.2.1.2 Les composés à base d'azote	11
2.2.2. D'autres ions majeurs	12
2.3. Les métaux.....	12
2.4. La fraction biologique.....	15
Partie 2 : Pollution de l'air : réglementations et impacts sur la santé	17
1. Pollution de l'air : réglementations relatives aux polluants atmosphériques.....	17
2. Impacts de la pollution atmosphérique sur la santé humaine	22
2.1. Exposition à court terme aux particules atmosphériques.....	23
2.1.1. Morbidité	23
2.1.2. Mortalité	24
2.2. Exposition à long terme aux particules atmosphériques	25
2.2.1. Morbidité	25
2.2.2. Mortalité	26

2.3.	Variation de la réponse à l'exposition aux polluants atmosphériques avec l'âge .	27
2.3.1.	Effets de l'exposition des personnes âgées à court terme aux particules atmosphériques	29
2.3.1.1	Morbidité	29
2.3.1.2	Mortalité	31
2.3.2.	Effets de l'exposition des personnes âgées à long terme aux particules atmosphériques	32
2.3.2.1	Morbidité	32
2.3.2.2	Mortalité	32
Partie 3 :	Système immunitaire, généralité.....	34
1.	La composition du sang total	34
2.	Le système immunitaire	38
2.1.	Production et maturation des lymphocytes.....	38
2.2.	Activation des L _T	41
2.3.	Différenciation des L _T	45
Partie 4 :	Mécanismes cellulaires de toxicité des particules atmosphériques.....	52
1.	Mécanismes non spécifiques au système immunitaire	52
1.1.	Activation métabolique	52
1.1.1.	Description générale	52
1.1.2.	Métabolisation des PM _{2.5}	54
1.1.2.1	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques	54
1.1.2.2	Composés Organiques Volatils.....	55
1.1.2.3	Dioxines et Polychlorobiphényles	56
1.2.	Stress oxydant	56
1.2.1.	Description générale	56
1.2.2.	Stress oxydant et PM _{2.5}	58
1.3.	Génotoxicité	60
1.3.1.	Description générale	60
1.3.2.	Génotoxicité liée aux particules atmosphériques.....	61
1.3.2.1	Formation d'adduits à l'ADN.....	62
1.3.2.2	Cassures double brin de l'ADN.....	63
1.3.3.	Réparation des lésions de l'ADN	65
1.3.3.1	Réparation des adduits	65
1.3.3.2	Réparation des cassures double-brin.....	66
1.4.	Modifications épigénétiques, cas des microARN	67
1.4.1.	Biogenèse et mode d'action des miARN	67
1.4.1.1	Transcription du miARN primaire	67

1.4.1.2	Formation du pré-miARN.....	68
1.4.1.3	Export du pré-miARN vers le cytoplasme	68
1.4.1.4	Clivage du pré-miARN et libération du miARN	68
1.4.1.5	Mécanisme de régulation post-transcriptionnelle	68
1.4.2.	Effets des particules atmosphériques.....	70
2.	Mécanismes spécifiques au système immunitaire	71
2.1.	Le déroulement de la réponse inflammatoire.....	72
2.1.1.	Reconnaissance de l'agent initiateur et déclenchement de la réaction inflammatoire.....	72
2.1.2.	Recrutement des cellules immunocompétentes, le passage relais entre réponse innée et adaptative	72
2.1.3.	Résolution de l'inflammation, retour à l'homéostasie ou passage à la chronicité.....	73
2.2.	L'Ahr régulateur de la réponse immunitaire	74
2.3.	Effet des particules atmosphériques.....	75
3.	Interactions entre les différents mécanismes cellulaires.....	77
3.1.	Epigénétique - inflammation	77
3.2.	Stress oxydant – inflammation.....	78
3.3.	Stress oxydant - activation métabolique – génotoxicité	78
	 Vieillessement et modifications des mécanismes cellulaires	79
1.	Mécanismes non spécifiques au système immunitaire	79
1.1.	Métabolisation	79
1.2.	Stress oxydant	80
1.3.	Génotoxicité	81
1.4.	Epigénétique.....	81
2.	Mécanismes spécifiques au système immunitaire	82
2.1.	Changement au niveau des cellules hématopoïétiques et involution thymique causés par le vieillissement	83
2.2.	Immunité innée et vieillissement	84
2.3.	Immunité adaptative et vieillissement.....	85
2.3.1.	Changement au niveau des L _T	85
2.3.2.	Changement au niveau des L _B	86
3.	Interactions entre les différents mécanismes cellulaires.....	87

Partie 5 : Biomarqueurs suite à l'exposition à la pollution atmosphérique	89
1. Classification des biomarqueurs moléculaires	90
1.1. Approche génomique d'identification des biomarqueurs	90
1.2. Approche protéomiques d'identification des biomarqueurs.....	91
1.3. Approche métabolomiques d'identification des biomarqueurs	91
2. Différents types de biomarqueurs	91
2.1. Biomarqueurs d'exposition	92
2.2. Biomarqueurs d'effet	93
2.3. Biomarqueurs de susceptibilité.....	93
3. La validation des biomarqueurs : une étape critique	94
Problématique et objectifs	96
Chapitre 2 : Matériels et méthodes.....	99
1. Prélèvements des particules.....	100
1.1. Site de prélèvement	100
1.2. Les prélèvements de particules atmosphériques.....	102
1.3. Caractéristiques physico-chimiques.....	104
1.3.1. Caractéristiques physiques	104
1.3.1.1 Granulométrie des particules	104
1.3.1.2 Surface spécifique	105
1.3.2. Caractéristiques chimiques.....	106
1.3.2.1 Identification des phases cristallines	109
1.3.2.2 Taille, morphologie et degré d'agglomération des particules.....	111
1.3.2.3 Dioxines, furanes et polychlorobiphényles.....	114
1.3.2.4 Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques	117
2. Prélèvements sanguins	120
2.1. Recrutement des sujets.....	120
2.2. Caractérisation de la population	122
2.2.1. Numération Formule Sanguine et dosage de la CRP	122
2.2.1.1 Principe	122
2.2.1.2 Protocole.....	123
2.2.1.3 Analyse.....	124
2.2.2. Marquage anti-CD45.....	124
2.2.2.1 Principe	124
2.2.2.2 Protocole.....	124

2.2.2.3	Analyse.....	125
2.3.	Isolement, purification et activation des lymphocytes T	125
2.3.1.	Isolement des lymphocytes	125
2.3.2.	Purification des lymphocytes T	127
2.3.3.	Activation des lymphocytes T	129
2.3.3.1	Test de prolifération cellulaire	130
2.3.3.1.1.	Principe	130
2.3.3.1.2.	Protocole.....	130
2.3.3.1.3.	Analyse	131
2.3.3.2	Détection des marqueurs d'activation.....	132
2.3.3.2.1.	Principe	132
2.3.3.2.2.	Protocole.....	132
2.3.3.2.3.	Analyse	132
2.3.3.3	Analyse du cycle cellulaire	132
2.3.3.3.1.	Principe	132
2.3.3.3.2.	Protocole.....	133
2.3.3.3.3.	Analyse	133
2.3.4.	Exposition des lymphocytes T	133
2.3.4.1	Préparation des particules	133
2.3.4.2	Test de cytotoxicité	134
2.3.4.2.1.	Principe	134
2.3.4.2.2.	Protocole.....	134
2.3.4.2.3.	Analyse	134
2.3.4.3	Exposition aux PF	135
2.3.4.4	Contrôles positifs	135
2.3.4.5	Récupération des cellules et des surnageants.....	135
2.3.5.	Extraction et dosage de l'ADN, de l'ARN et des protéines.....	136
3.	Tests toxicologiques.....	137
3.1.	Expression génique par RT-qPCR.....	137
3.1.1.	Principe.....	137
3.1.2.	Protocole	138
3.1.3.	Analyse	139
3.2.	Quantification des cytokines par le MAGPIX®	140
3.2.1.	Principe.....	140
3.2.2.	Protocole	140
3.2.3.	Analyse	141
3.3.	Etude transcriptomique des miARN	141
3.3.1.	Extraction d'ARN total contenant les miARN.....	141
3.3.2.	Puce à miARN	141
3.3.3.	RT-qPCR (miARN et U6 snRNA)	143
3.3.3.1	RT pour les miARN	143

3.3.3.2	PCR pour les miARN	144
3.3.3.3	RT pour U6 snRNA.....	145
3.3.3.4	PCR pour U6 snRNA.....	145
3.3.4.	Choix des miARN pour l'analyse fonctionnelle	146
3.3.4.1	Analyse fonctionnelle.....	146
3.3.4.2	RT et PCR des ARN cibles	147
Chapitre 3	: Resultats et discussion	148
	Notation des échantillons	149
Partie 1	: Validation du modèle d'étude	149
1.	Vérification de la nécessité et de l'efficacité de l'étape d'activation	150
1.1.	Test de prolifération cellulaire	150
1.2.	Détection des marqueurs d'activation CD25 et CD69.....	153
1.3.	Analyse du cycle cellulaire	156
2.	Etude de la cytotoxicité.....	157
Partie 2	: Caractéristiques des populations étudiées	160
1.	Population totale échantillonnée	160
1.1.	Caractéristiques des Numérations Formules Sanguines et dosage de la protéine C-réactive CRP.....	160
1.2.	Distribution des sous-populations de lymphocytes T en fonction de l'âge	163
2.	Population d'étude	165
2.1.	Caractéristiques des Numérations Formules Sanguines et dosage de la CRP	165
2.2.	Distribution des sous populations de L _T en fonction de l'âge	167
Partie 3	: Effets de l'exposition aux PF, influence de l'âge	170
1.	Expression génique	170
1.1.	Choix du gène de référence.....	170
1.1.1.	Résultats.....	170
1.1.2.	Discussion.....	174
1.2.	Activation métabolique de la fraction organique des PF	175
1.2.1.	Effet de l'exposition des L _T aux PF.....	176
1.2.2.	Effet de l'exposition des L _T aux PF, influence de l'âge	177
1.2.3.	Discussion.....	179
1.3.	Expression des gènes du stress oxydant au niveau des L _T	182

1.3.1.	Effet de l'exposition des L _T aux PF.....	182
1.3.2.	Effet de l'exposition des L _T aux PF, influence de l'âge	183
1.3.3.	Discussion.....	185
2.	Quantification des cytokines	189
2.1.	Effet de l'exposition des L _T aux PF.....	189
2.1.1.	Résultats.....	189
2.1.2.	Discussion.....	194
2.2.	Cytokines et âge	199
3.	Etude transcriptomique des miARN	202
3.1.	Puce à miARN	204
3.1.1.	Puce Affimétrie [®] et analyse statistique	204
3.1.2.	Choix des miARN pour la RT-qPCR	205
3.2.	RT-PCR en temps réel pour les miARN	205
3.2.1.	Détermination du miARN de référence	205
3.2.2.	RT-qPCR en temps réel.....	206
3.2.2.1	Effet de l'exposition des L _T aux PF	207
3.2.2.2	Effet de l'exposition des L _T aux PF, influence de l'âge	207
3.2.2.3	Discussion.....	210
3.3.	Analyse fonctionnelle	214
3.3.1.	Détermination des interactions miARN-gènes cibles par le logiciel IPA [®]	214
3.3.2.	Choix des gènes cibles comme perspective pour l'étude des miARN	215
	Discussion générale.....	218
	Chapitre 4 : Conclusion et perspectives	225
	Références bibliographiques.....	230
	Annexes.....	254
	Annexe 1 : Accord du CPP Nord-Ouest.....	255
	Annexe 2 : Notice d'information	257
	Annexe 3 : Formulaire de consentement éclairé.....	260
	Résumé	260

LISTE DES FIGURES

Chapitre 1 : Analyse bibliographique

Figure I.1 : Mécanisme de formation des aérosols.....	4
Figure I.2 : Schéma de l'appareil circulatoire humain.....	35
Figure I.3 : Composition du sang total	36
Figure I.4 : Les étapes de la lymphopoïèse	40
Figure I.5 : Structure du récepteur hétérodimérique TCR formé de deux polypeptides transmembranaires α et β	42
Figure I.6 : Stabilisation de l'interaction L_T /CPA par les corécepteurs CD4 CD8 fixés aux CMH.....	43
Figure I.7 : Les différentes isoformes du CD45 exprimées selon le stade d'activation des L_T	44
Figure I.8 : Synapse immunologique, modèle simplifié de l'activation d'un L_T suite à la rencontre d'une CPA	45
Figure I.9 : Les différents profils de différenciation des $CD4^+$	50
Figure I.10 : Les trois phases de la biotransformation des xénobiotiques.	53
Figure I.11 : Production, élimination, effets ainsi que rôle des ERO.	58
Figure I.12 : Les dommages à l'ADN causés par des sources endogènes et exogènes et les différentes voies de réparations.....	62
Figure I.13 : Biogenèse et mode d'action des miARN.....	69
Figure I.14 : AhR au cours de la différenciation des L_T en Th17 (a) et en Treg (b).....	75
Figure I.15 : Synthèse des changements liés à l'âge au niveau de l'immunité innée	85
Figure I.16 : Synthèse des changements liés à l'âge au niveau de l'immunité adaptative.....	87
Figure I.17 : Méthodologie générale de l'étude	98

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

Figure II.1 : Localisation du site de prélèvement des particules atmosphériques	100
Figure II.2 : Les sites industriels classés SEVESO dans l'agglomération de Dunkerque	101
Figure II.3 : Emissions de $PM_{2.5}$ en 2010 sur (a) le territoire de la CUD et (b) comparées avec la région Nord-Pas-de-Calais par secteur et en t/an.....	102
Figure II.4 : Schéma du principe d'impaction en cascade pour le prélèvement de particules atmosphériques	103

Figure II.5 : Distribution en taille de l'échantillon de PF collecté à Dunkerque de Mars 2014 à Mars 2015.....	105
Figure II.6 : Diffractogramme de rayons X de l'échantillon de PF collecté à Dunkerque entre mars 2014 et mars 2015.....	109
Figure II.7 : Images de microscopie électronique à balayage des PF collectées à Dunkerque entre mars 2014 et mars 2015.....	113
Figure II.8 : Les différentes populations cellulaires identifiées par cytométrie en flux (a) dans un échantillon de sang total hémolysé (b) dans un échantillon de culture cellulaire suite à la sélection négative	129
Figure II.9 : Temps de mesure utilisés lors du test de prolifération cellulaire.....	131
Figure II.10 : Protocole développé dans cette étude (a) ensemble des conditions testées avec en rouge les étapes optimisées (b) le protocole final optimisé	136
Figure II.11 : Extrait des résultats générés par la puce à miARN	142
Figure II.12 : Extrait de l'analyse statistique des résultats générés par la puce	143

Chapitre 3 : Résultats et discussion

Figure III.1 : Test de prolifération cellulaire suivi par cytométrie en flux révélant la réponse des L_T après 96h : en absence d'une activation par les billes anti-CD3/CD28 (a) ; suite à l'activation par les billes anti-CD3/CD28 (b) déterminé par le marquage Violet CellTrace™	151
Figure III.2 : Variation du ratio CD25/CD69 en fonction du temps chez les L_T non activés et exposés ou non aux PF pendant 96h	153
Figure III.3 : Variation du ratio CD25/CD69 en fonction des heures d'activation chez des L_T exposés aux PF après 96h d'activation et chez les L_T témoins non exposés. L'astérisque (*) représente l'activation. Les courbes en gris représentant les ratios chez les L_T non activés ont été ajoutées au graphique afin de faciliter la comparaison.....	154
Figure III.4 : Pourcentage de L_T dans les différentes phases du cycle cellulaire (G_0/G_1 , S et G_2/M) en présence et en absence d'une étape d'activation. L'astérisque (*) fait référence à une activation.....	156
Figure III.5 : Pourcentage des L_T ($CD3^+$) exprimant le marqueur CD45RA (a) et CD45RO (b) dans chacune des trois catégories d'âge de la population totale échantillonnée (n=91). L'astérisque (*) indique une différence significative ($p<0.05$) entre les catégories.....	163
Figure III.6 : Pourcentage des L_T ($CD3^+$) exprimant le marqueur CD45RA (a) et CD45RO (b) dans chacune des trois catégories d'âge de la population d'étude (n=30). L'astérisque (*) indique une différence significative ($p<0.05$) entre les catégories	168

Figure III.7 : Ct médiane des 4 gènes de références testés (IPO8, B2M, 18S et RPL13A) avec l'étendu	
(a). Ct médiane et espace interquartile des 3 gènes de références (IPO8, B2M et RPL13A)	
(b).	172
Figure III.8 : Expression génique relative du récepteur AhR et des enzymes de métabolisation des xénobiotiques (CYP1A1, CYP2S1, CYP2E1 et NQO1) dans les L _T de la population d'étude « ABC » (n=91) exposés pendant 72h à 45 µg/mL de PF.....	176
Figure III.9 : Expression génique relative du récepteur AhR et des enzymes de métabolisation des xénobiotiques (CYP1A1, CYP2S1, CYP2E1 et NQO1) dans les L _T de chacune des trois catégories d'âge (« A », « B » et « C ») exposés pendant 72h à 45 µg/mL de PF	178
Figure III.10 : Expression génique relative des enzymes du stress oxydant (SOD2, CAT et HMOX1) dans les L _T de la population d'étude « ABC » (n=91) exposés pendant 72h à 45 µg/mL de PF.	183
Figure III.11 : Expression génique relative des enzymes du stress oxydant (SOD2, CAT et HMOX1) dans les L _T de chacune des trois catégories d'âge (« A », « B » et « C ») exposés pendant 72h à 45 µg/mL de PF.....	184
Figure III.12 : Concentration (pg/mL) de l'IL-4 libérée par les L _T de la catégorie « A » exposés ou non aux PF pendant 24, 48 et 72h.....	190
Figure III.13 : Concentration (pg/mL) de l'IL-4 libérée par les L _T de la catégorie « C » exposés ou non aux PF pendant 24, 48 et 72h.....	191
Figure III.14 : Concentration (pg/mL) de l'IL-4 libérée par les L _T de chacune des 3 catégories d'âge « A », « B » et « C » exposés ou non aux PF pendant 24h.	192
Figure III.15 : Concentration (pg/mL) de l'IL-13 libérée par les L _T de la catégorie « B » exposés ou non aux PF pendant 24, 48 et 72h.....	193
Figure III.16 : Concentration (pg/mL) de l'IL-13 libérée par les L _T de chacune des 3 catégories d'âge « A », « B » et « C » exposés ou non aux PF pendant 24h..	194
Figure III.17 : Schéma des étapes de l'analyse transcriptomique des miARN	203
Figure III.18 : Niveau relatif d'expression des miARN (miR-124-3p, miR-1246, miR-1290, miR-132-3p, miR-16-5p, miR-212-3p, miR-324-5p, miR-3613-5p, miR-378a-3p, et miR-99b-5p) dans les L _T exposés pendant 72 h aux PF pour la population d'étude « ABC »	207
Figure III.19 : Niveau relatif d'expression des miARN (miR-124-3p, miR-1246, miR-1290, miR-132-3p, miR-16-5p, miR-212-3p, miR-324-5p, miR-3613-5p, miR-378a-3p, et miR-99b-5p) dans les L _T de chacune des trois catégories d'âge (« A », « B » et « C ») exposés pendant 72 h aux PF.....	209

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre 1 : Analyse bibliographique

Tableau I.1 : Caractéristiques physiques des différentes catégories de particules atmosphériques.....	7
Tableau I.2 : Sources des différents métaux présents dans la composition des aérosols.....	14
Tableau I.3 : Valeurs cibles, limites et objectifs de qualité concernant les concentrations de différents polluants imposées par l'Union Européenne et fixées par le Décret n°2010-1250 du 21 octobre 2010 relatif à la qualité de l'air	21
Tableau I.4 : Morphologie, rôle, pourcentage et nombre des constituants du sang	37
Tableau I.5 : Les profils lymphocytaires avec leurs cytokines inductrices et sécrétées	49

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

Tableau II.1 : Teneurs en éléments majeurs, traces métalliques et espèces ioniques dans la fraction totale de l'échantillon de PF collecté à Dunkerque de Mars 2014 à Mars 2015 et dans la fraction hydrosoluble.....	108
Tableau II.2 : Teneurs en dioxines, furanes et polychlorobiphényles de l'échantillon de PF collecté à Dunkerque de Mars 2014 à Mars 2015.....	116
Tableau II.3: Teneurs en Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (µg/g) de l'échantillon de PF collecté à Dunkerque de Mars 2014 à Mars 2015.	119
Tableau II.4 : Critères d'inclusion et d'exclusion des sujets.....	121
Tableau II.5 : Concentration des cellules rapportée au millilitre de sang total suite aux étapes d'isolement et de purification. Les valeurs de concentration cellulaire pour les cinq sujets étant très proche, la moyenne a été représentée dans ce tableau	128
Tableau II.6 : Conditions du test de prolifération cellulaire	131
Tableau II.7 : Amorces des gènes de référence et des gènes cibles utilisées pour la RT-qPCR.....	139
Tableau II.8: Amorces des miARN quantifiés par PCR	145
Tableau II.9 : Amorces des gènes cibles testés et des deux gènes de référence mesurés par RT-qPCR	147

Chapitre 3 : Résultats et discussion

Tableau III.1 : Notation des échantillons de L _T	149
---	-----

Tableau III.2 : Pourcentage de viabilité des L _T exposés pendant 24, 48 et 72h à des concentrations croissantes de PF en utilisant le test LDH.....	158
Tableau III.3: Numération Formule Sanguine de la population totale échantillonnée et des trois catégories d'âge	161
Tableau III.4 : Numération Formule Sanguine de la population d'étude et des trois catégories d'âge.....	166
Tableau III.5 : Résultats de l'analyse BestKeeper, Normfinder et GeNorm chez les L _T stimulé par anti-CD3/CD28	173
Tableau III.6 : Variation de la concentration des cytokines chez les témoins et les exposés en fonction du temps d'exposition (24, 48, 72h) et de l'âge.....	195
Tableau III.7 : Nombre de miARN totaux et matures obtenus par la puce à miARN et ayant un p<0.05 pour les différentes types de comparaisons étudiées.	204

LISTE DES ABREVIATIONS

A :

ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADNc : ADN complémentaire
AhR : Aryl hydrocarbon Receptor
AOS : Aérosols Organiques Secondaires
ARE : Antioxidant Response Element
ARN : Acide RiboNucléique
ARNm : Acide RiboNucléique messenger
ARNT : Aryl Receptor Nuclear Translocator
AVC : Accident Vasculaire Cérébral

B :

B[a]P : Benzo[a]pyrène
BPCO : Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive
BPDE : B[a]P -7,8-dihydro-9,10-diolepoxide

C :

CAT : Catalase
CD- : Cluster de Différenciation-
CFSE : Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester
CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CO : monoxyde de carbone

COV : Composé Organique Volatil

CPA : Cellule Présentatrice de l'Antigène
CPP : Comité de Protection des Personnes
CRP : C-Reactive Protein
CSH : Cellule Souche Hématopoïétique
CuO : Oxyde de Cuivre
CYP : CYtochrome P450

D :

Dae : Diamètre aérodynamique équivalent
DAMP : Danger-Associated Molecular Patterns
DL-PCB : Dioxine-Like PCB
DMSO : diméthylsulfoxyde
DSB : Double Strand DNA Breaks

E :

EDTA : EthyleneDiamine TetraAcetic Acid
EMX : Enzymes de Métabolisation des Xénobiotiques
EPFR : Environmentally Persistent Free Radicals
ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène

F :

FOXP3 : Forkhead box P3

G :

GPx : Glutathion Peroxydase
GSH : Glutathion réduit
GSSG : Glutathion oxydé

GST : Glutathion-S-Transférase

H :

H₂SO₄ : Acide Sulfurique

HAP : Hydrocarbure Aromatique Polycyclique

HMOX1 : Hème Oxygénase 1

HR : Homologous Recombination

I :

IFN- γ : Interferon- γ

IL- : InterLeukine-

IPA : Ingenuity Pathway Analysis

K :

Keap1 : Kelch-like ECH associated protein

L :

LAT : Linfer for Activation of T cells

L_B : Lymphocytes B

LDH : Lactate DésHydrogénase

L_T : Lymphocytes T

M :

MFI : Median Fluorescence Intensity

miRNA : micro-ARN

N :

NAD(P)H : Nicotinamide Adénine Dinucléotide (Phosphate)

NFS : Numération Formule Sanguine

NHEJ : Non-Homologous End Junction

NK : Natural Killer

NO₂ : Dioxyde d'azote

NO₃⁻ : Ions nitrates

NO_x : Oxydes d'Azote

NQO1 : NADPH-Quinone-Oxydoreductase 1

Nrf2 : Nuclear NF-E2-related factor 2

O :

O₃ : Ozone

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

P :

PAF : Platelet Activation Factor

PAMP : Pathogen-Associated Molecular Patterns

PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cells

PBS : Phosphate-Buffered Saline

PCB : PolyCholoroBiphényle

PCBi : PolyCholoroBiphényle indicateurs

PCDD : PolyChloroDibenzo-*p*-Dioxine

PF : Particules Fines

PM : Particulate Matter

pré-miARN : précurseur du miARN

pri-miARN : primary-miRNA

PRR : Pattern Recognition Receptors

Q :

qPCR : PCR quantitative en temps réel

[Q1;Q3] : [1^{er} quartile ; 3^{ème} quartile]

R :

RORyt : Retinoic acid receptor-related
Orphan nuclear Receptor gamma

RQ : Relative Quantification

RT : Rétrotranscription

S :

SLC : SoLute Carrier

SLCO : SoLute Carrier Organic anion

snRNA : small nuclear RNA

SO₂ : Dioxyde de soufre

SO₄²⁻ : Ions Sulfates

SOD : SuperOxyde Dismutase

SOx : Oxydes de soufre

STAT : Signal transducer and activator of
transcription

SULT : SulfoTransférase

T :

Tbx21 : T-box 21

TCR : T Cell Receptor

Th : lymphocytes T helper

TNF- α : Tumor Necrosis Factor-alpha

TP53 : Tumor Protein 53

Avant-propos

La pollution atmosphérique est de nos jours un problème ubiquitaire, n'ayant pas de frontières. Avec les composés gazeux, les particules en suspension constituent les principaux polluants atmosphériques. La pollution de l'air ainsi que les particules atmosphériques ont récemment été classées cancérogènes certains pour l'homme (Groupe 1) par le Centre international de recherche sur le cancer. De nombreuses études ont mis en évidence la relation entre l'exposition aux particules atmosphériques et la survenue de pathologies cardio-respiratoires chez l'homme. Toutefois, l'effet observé après une exposition varie en fonction à la fois des caractéristiques des particules, mais aussi de la population exposée. Les personnes âgées représentent ainsi une population sensible particulièrement vulnérable.

Cette thèse fait partie de l'étude prospective pilote Aerotox 2. Elle s'inscrit dans une démarche d'identification des effets causés dans des cellules immunitaires par leur exposition aux particules atmosphériques fines. Pour ce faire, un échantillon annuel de particules fines a été collecté dans l'agglomération dunkerquoise. Des prélèvements sanguins ont été réalisés afin d'isoler les lymphocytes T qui ont été exposés aux particules collectées. La recherche de l'influence éventuelle de l'âge sur la réponse des cellules immunitaires a également été mise en œuvre, par le recrutement de 91 volontaires appartenant à trois classes d'âge contrastées. Nous présentons notre travail en quatre chapitres.

Le premier chapitre présente une synthèse bibliographique sur les particules atmosphérique et les données existantes sur la pollution atmosphérique particulaire d'une part et sur le système immunitaire d'autre part. Egalement, l'impact de l'exposition à ces particules sur la santé ainsi que les différents mécanismes cellulaires de toxicité seront évoqués.

Le deuxième chapitre détaille la méthodologie appliquée dans cette étude. Il décrira le site et la technique d'échantillonnage des particules, leurs caractéristiques physiques et chimiques majeures, ainsi que les prélèvements sanguins, la culture des cellules et le protocole des analyses toxicologiques.

Dans le chapitre 3, nous présentons et discutons les résultats des tests toxicologiques réalisés pour étudier l'effet de l'exposition des lymphocytes aux particules.

Le quatrième et dernier chapitre vient conclure ce manuscrit et propose des perspectives en vue d'approfondir l'étude.

CHAPITRE 1 :

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

Ce premier chapitre sera divisé en cinq parties. La première partie de cette analyse bibliographique sera consacrée aux particules atmosphériques, à leur classification, leur formation ainsi que leur composition chimique. Dans la deuxième partie, les réglementations relatives aux polluants atmosphériques, en particulier aux particules, seront décrites. Par la suite, l'impact de la pollution sur la santé humaine sera représenté par une synthèse des études épidémiologiques et toxicologiques. Dans la troisième partie, une vue détaillée sur le système immunitaire, ses constituants et leurs rôles sera présentée. Dans la quatrième partie, certains mécanismes de toxicité pouvant être induits par des particules seront élucidés. Les possibles altérations de ces mécanismes au cours du vieillissement seront présentées. La cinquième dernière partie de ce chapitre abordera la notion de biomarqueurs d'effet et/ou d'exposition à la pollution atmosphérique.

Partie 1 : Les particules atmosphériques

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

1. *Définition, classification et élimination de l'atmosphère*

1.1. *Classification et mécanismes de formation des particules*

Les particules en suspension dans l'atmosphère présentent des tailles extrêmement diverses variant de quelques nanomètres à quelques micromètres. Les particules n'ont pas toutes des formes géométriques bien définies. Pour cette raison, le terme de diamètre aérodynamique équivalent (D_{ae}) a été conçu. On assimile le diamètre aérodynamique équivalent d'une particule atmosphérique comme égal au diamètre d'une particule sphérique de densité 1 g/cm^3 , ayant la même vitesse de chute dans l'air que la particule concernée. Dans la plupart des situations, la détermination du diamètre aérodynamique suffit pour tracer le comportement de la particule que ce soit dans l'atmosphère ou dans le système respiratoire (filtration et déposition).

Une classification de particules fréquemment utilisée (Whitby, 1977) s'appuie sur leur distribution granulométrique et les répartit alors en 2 groupes (Figure I.1) :

- *les particules grossières ($D_{ae} > 2,5 \text{ } \mu\text{m}$)* : ce sont des particules ayant un diamètre aérodynamique équivalent supérieur à $2,5 \text{ } \mu\text{m}$ et générées majoritairement par des procédés mécaniques. Elles présentent une origine naturelle liée à l'érosion des sols, du pétillage de la mer, des volcans ou sont introduites dans l'atmosphère par l'intervention de l'homme lors par exemple de la manipulation des matières premières (tas de minerais) sur les sites industriels.

- *les particules fines ($D_{ae} < 2,5 \mu m$)* : celles-ci sont constituées de particules générées par l'activité industrielle et urbaine mais également de particules biogéniques ou minérales. Cette classe de particules peut être divisée en un mode d'accumulation ($0,1 < D_{ae} < 2,5 \mu m$) et un mode de nucléation ($D_{ae} < 0,1 \mu m$), qualifié de noyaux d'Aitken (particules ultrafines). Les particules relatives au mode de nucléation proviennent des processus de condensation de vapeurs chaudes dans l'atmosphère. Ces particules représentent la part la plus importante en nombre d'aérosols, mais à l'inverse contribuent peu à la masse des particules en raison de leur taille extrêmement faible. Quant aux particules du mode d'accumulation, elles proviennent des conversions gaz-particules ainsi que de la croissance des particules issues du mode de nucléation sous l'effet de la coagulation ou de la condensation de vapeurs sur les particules existantes. Malgré leur faible contribution à la masse totale, ces particules sont caractérisées par une grande surface spécifique qui représente la surface totale par unité de masse d'un solide, c'est à dire, d'une part, la surface géométrique des grains, en fonction de la distribution granulométrique et de leur forme, et d'autre part, la surface développée par les parois des pores. Il s'agit donc de considérer toute la surface des particules, porosité ouverte comprise.

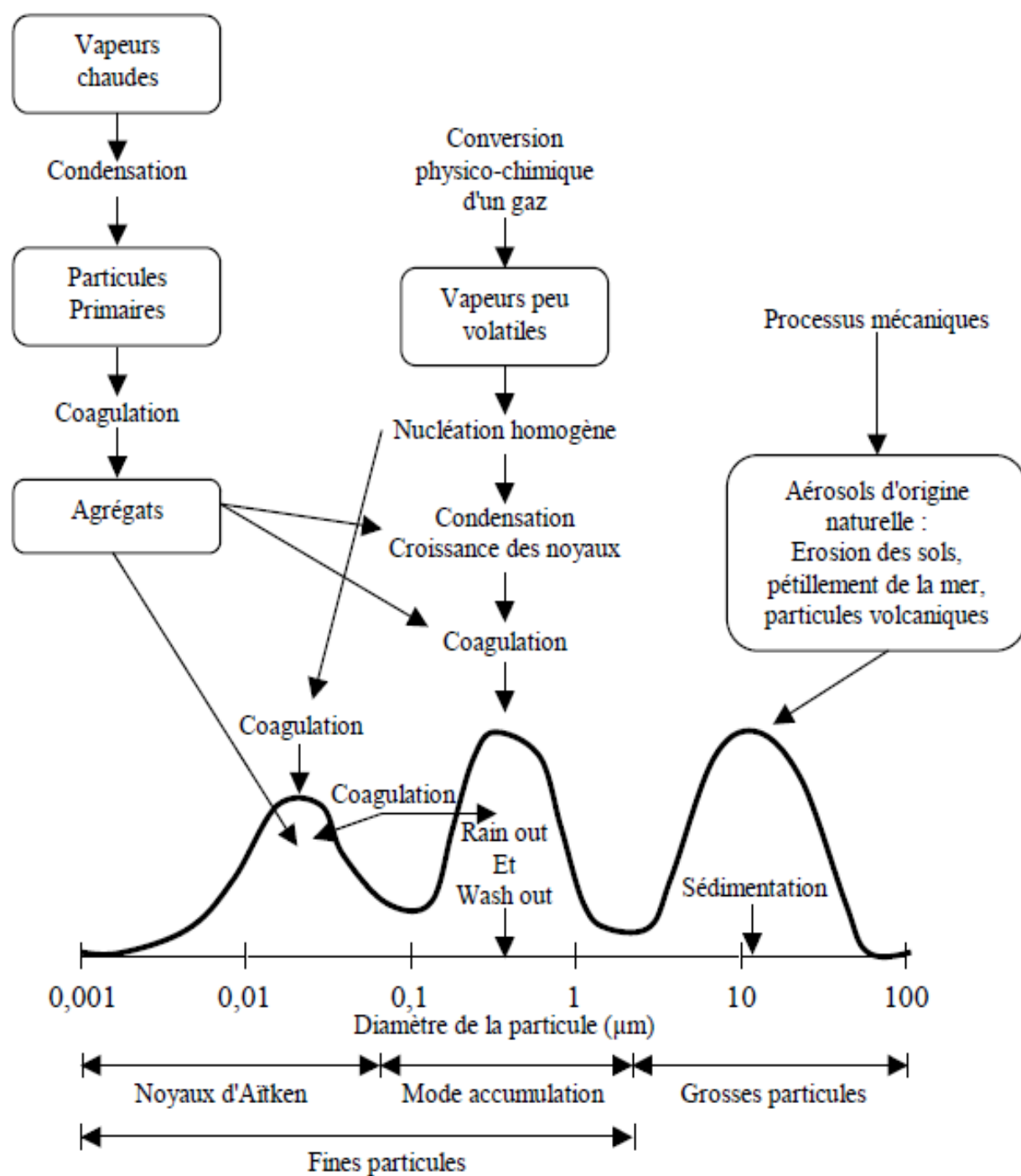


Figure I.1 : Mécanisme de formation des aérosols (d'après Whitby, 1977).

Selon leur mécanisme de formation, les particules peuvent être caractérisées comme primaires ou secondaires.

- *Les particules primaires*

Les particules primaires sont émises directement dans l'atmosphère sous forme particulaire depuis les sources d'émission naturelles ou anthropiques. Il s'agit ainsi de particules qui n'ont pas subi de modifications (chimique, physique) depuis leur émission ;

Parmi les sources naturelles, on peut citer :

- **l'érosion éolienne des sols** (particules majoritairement composées de quartz, de silicates tels que la kaolinite et le feldspath ; de carbonates tels que la calcite ; de sulfate de calcium et d'oxyde de fer) ;
- **les sels marins** (chlorure de sodium (NaCl), sulfate de sodium, magnésium ou potassium (Na_2SO_4 , MgSO_4 et K_2SO_4)) ;
- **les éruptions volcaniques** (pyroxènes, feldspaths, plagioclases et aluminosilicates) et **les sources biogéniques** tels que les pollens, les spores, les fragments d'animaux et de plantes, les bactéries, les algues, les protozoaires, les moisissures et les virus.

Les particules primaires peuvent également être émises par les activités humaines réparties en plusieurs secteurs tels que le secteur résidentiel et tertiaire (chauffage au bois, au fioul ou au charbon), l'industrie manufacturière (métallurgies, raffineries, fonderies, exploitations minières), le trafic routier (fonctionnement du moteur, abrasion des routes, abrasion de pneus et des freins) et l'agriculture (travail des sols).

- *Les particules secondaires*

Les particules secondaires se forment majoritairement à partir des gaz émis de façon naturelle ou par les activités humaines. Ces derniers subissent des réactions d'oxydation, entraînant leur conversion en composés stables dans un état condensé. Ce phénomène de conversion gaz – particules donne naissance à des particules de petite taille (quelques nanomètres) qui augmente rapidement par les processus de coagulation et de condensation. Ces composés gazeux de départ sont composés essentiellement de soufre (SO_2), d'azote (NH_3 et NO_x) et d'hydrocarbures (Pueschel, 1994). De même, si des particules primaires subissent

une transformation durant leur séjour dans l'atmosphère, on parle également de particules secondaires.

Le Tableau I.1 représente les différentes catégories de particules classées en particules grossières ayant un diamètre compris entre 2,5 et 10 μm , particules fines avec un Dae inférieur à 2,5 μm et qui seront nommées par la suite « PF » et particules ultra fines dont le Dae est inférieur à 0,1 μm . Il donne également une vision sur les propriétés physiques les plus importantes (masse, nombre, surface spécifique) et sur l'origine de chaque classe. Chacune de ces caractéristiques affecte la dynamique des particules et ainsi leur comportement et leur devenir dans l'atmosphère (Seinfeld & Pandis, 2006).

Tableau I.1 : Caractéristiques physiques des différentes catégories de particules atmosphériques (Ravindra et al., 2001).

	Taille		Distribution			Origine		Devenir dans l'atmosphère		
	Granulo- métrie	Mode de formation	Masse	nombre	Surface spécifique	source de production	processus de production	Solubilité	Durée de vie	Elimination
Particules grossières PM_{10-2.5}	Dae > 2,5 µm	sédimentation ou grossier	90-95% de la masse totale	les moins nombreux	faible surface	primaire	processus mécaniques	Peu hydrosoluble (à l'exception des sels marins) non hygroscopique	quelques heures à quelques jours	déposition par gravité
Particules fines PM_{2.5-1}	Dae < 2,5 µm	accumulation	1-8% de la masse totale	contribution importante	grande surface	secondaire	conversion gaz-particules à partir des precursseurs	hydrosoluble (à l'exception des suies) hygroscopique deliquescent	des jours voire des semaines	dépôt sec et humide
Particules ultra fines PM_{0.1}	Dae < 0,1 µm	nucléation	part extrêmement faible	la majeure partie de l'aerosol	100 - 1000 m ² /g	secondaire	condensation de vapeurs chaudes		courte	dépôt humide nucléation

1.2. *Élimination des particules*

Les particules atmosphériques sont éliminées de l'atmosphère par voie sèche ou humide selon leurs propriétés physiques notamment le diamètre aérodynamique ainsi que l'hygroscopicité qui permet de définir le pouvoir de la particule à servir de noyau de condensation nuageuse, et ainsi à déterminer le caractère hygrophile ou à l'inverse hygrophobe d'une particule.

Le dépôt sec : la retombée par voie sèche peut se définir comme étant le transport des particules vers des surfaces (sol, végétation, immeubles) en absence de précipitation. Ce mode d'élimination se base sur le mécanisme de sédimentation et concerne en priorité les particules grossières (Seinfeld and Pandis, 2006).

Le dépôt humide : La retombée par voie humide représente le mode principal d'élimination des particules qu'il s'agisse d'un dépôt associé à la pluie,, au brouillard ou à la neige (Seinfeld et Pandis, 1998). On distingue deux phénomènes appelés «washout» et « rainout ». Le washout est l'interception des particules atmosphériques par des gouttelettes de pluie tandis que le rainout (élimination à l'intérieur de nuage) correspond à la condensation de vapeur d'eau sur les particules à caractère hydrophile servant comme noyaux de condensation sur lesquels se forment les gouttelettes de nuage. Lorsque ces gouttelettes grossissent suffisamment, les particules sont éliminées lors des précipitations.

Ces retombées humides ou sèches peuvent se produire très loin des lieux d'émission des polluants et causer des effets néfastes sur les écosystèmes tels que l'acidification des lacs qui entraîne le dépeuplement de nombreuses espèces ou le dépérissement des forêts.

2. *Composition chimique des particules*

Contrairement aux polluants gazeux, les particules sont composées d'un mélange hétérogène et complexe de constituants organiques et inorganiques. Cette composition varie en fonction de l'origine, des conditions météorologiques ainsi que du temps de séjour et de leurs évolutions physico-chimiques dans l'atmosphère.

Les espèces majoritairement retrouvées au sein des particules sont :

2.1. Les espèces carbonées

2.1.1. Le carbone élémentaire (EC)

Les aérosols carbonés peuvent être composés d'un cœur de carbone élémentaire appelé aussi carbone suie. Ce carbone provient essentiellement de sources anthropiques notamment toutes celles faisant appel à un procédé de combustion, que ce soit à partir de combustibles fossiles (diesel, essence, gaz naturel...) ou de la biomasse. Sur ce noyau carboné peuvent se fixer, s'adsorber, des molécules notamment des composés organiques, des hydrocarbures, de la matière biologique, des aérosols acides et des métaux. Plus la surface spécifique de la particule est importante plus le pouvoir d'adsorption est grand.

2.1.2. Le carbone organique (OC)

Le cœur de l'aérosol peut être entouré d'une pellicule d'un mélange complexe de composés organiques adsorbés. Cet OC peut être classé en OC _{fossiles} produit de la combustion incomplète des combustibles fossiles (charbon, fioul, gaz, carburants) à haute température et provient principalement d'émissions liées au transport, de l'industrie et du chauffage. On distingue également le carbone organique OC _{biomasse} provenant de la combustion du bois et d'autres matières végétales (Bi et al., 2005; Ravindra et al., 2008; Valavanidis et al., 2006). Parmi les espèces caractéristiques de ces deux catégories, on trouve les Composés Organiques Volatils (COV) qui s'oxydent dans l'atmosphère par l'ozone (O₃), le radical hydroxyle (OH*) ou le radical nitrate (NO₃*) et produisent des espèces ayant des pressions de vapeur suffisamment basses. Ceci assure la condensation de ces composés de la phase gazeuse vers la phase particulaire aboutissant ainsi à la formation des aérosols organiques secondaires (AOS) (Kroll et Seinfeld, 2008). On peut citer également les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), comme le benzo(a) pyrene (B[a]P) connu pour sa toxicité, ou encore d'autres composés formés lors de la pyrolyse du bois tels que le levoglucosan, utilisé comme traceur de combustion de biomasse (Heal, 2014). Une troisième catégorie regroupe les OC _{biogénique} provenant des hydrocarbures émis directement par les plantes. Les composés entrant dans cette catégorie regroupent un large spectre d'hydrocarbures aliphatiques tels que les éthers, les alcools, les cétones, les aldéhydes, les quinones, les

composés aminés (Valavanidis et al., 2008). Les composés les plus retrouvés sont les terpénoïdes, une famille d'hydrocarbures produits par de nombreuses sources biogéniques et anthropiques ou présents dans de nombreux objets du quotidien (plantes d'intérieur, matériaux de construction et d'aménagement à base de bois, mobiliers et fournitures en bois, produits de nettoyage, désodorisants d'ambiance, bougies parfumées). Cette famille regroupe les terpènes oxygénés et les terpènes non-oxygénés. L'isoprène C_5H_8 (2-méthyl-1,3-butadiène) est le composé le plus répandu. Il représente à lui seul plus de la moitié des émissions de COV biogéniques (Guenther et al., 1995) (Sharkey et al., 2008).

2.2. La fraction minérale

2.2.1. Les ions inorganiques

Parmi les différents ions présents dans la composition des aérosols, les ions sulfate (SO_4^{2-}), nitrate (NO_3^-), ammonium (NH_4^+), chlorure (Cl^-), sodium (Na^+), calcium (Ca^{2+}), magnésium (Mg^{2+}) et potassium (K^+) sont les plus abondants et les plus importants dans la détermination de la contribution naturelle et anthropique de sources de particules (Kfoury et al., 2016a).

2.2.1.1 Les composés à base de soufre

Dans la nature, les volcans, les flores marine et terrestre, la faune, et la combustion de la biomasse sont responsables de la majeure partie des émissions de produits soufrés (Seinfeld and Pandis, 2006). Les émissions anthropiques de composés à base de soufre sont dues à la combustion des combustibles fossiles soufrés, tels que le charbon, le coke de pétrole, le fioul lourd ou le gazole et à la transformation d'énergie et l'industrie manufacturière.

Les composés soufrés dans l'atmosphère proviennent principalement des émissions de dioxyde de soufre (SO_2) qui s'oxyde en sulfate sous forme de H_2SO_4 et peut contribuer au phénomène de pluies acides. Ces composés peuvent également avoir des origines naturelles, telles que les émissions marines et volcaniques (sous forme de H_2S et SO_2). La présence d'ammoniac permet d'établir des processus de neutralisation, qui se traduisent par la

formation de NH_4HSO_4 et $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Renard et al., 2004). De plus, une réaction entre H_2SO_4 et le CaCO_3 a été montrée durant les transports des poussières sur de longues distances et aboutissant à la formation de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Hwang and Ro, 2006). D'autre part, dans une atmosphère marine et côtière, et en présence d'humidité, les composés soufrés peuvent réagir avec les particules de sels marins, riches en NaCl aboutissant à la formation de Na_2SO_4 , tandis que le chlore perdu se retrouve sous la forme de HCl volatil (ten Brink, 1998).

2.2.1.2 Les composés à base d'azote

Le trafic routier ainsi que les activités industrielles et les processus de combustion (combustibles fossiles, biomasse) sont des sources majeures d'émission d'oxydes d'azote (NO , NO_2). Quant aux sources naturelles, elles regroupent les phénomènes électriques dans l'atmosphère (les orages) générant NO , puis NO_2 à l'issue d'une oxydation, alors que l'ammoniac naturel (NH_3) provenant de la croûte terrestre (Middleton, 1995). Le nitrate atmosphérique provient de l'oxydation du dioxyde d'azote (NO_2) en acide nitrique (HNO_3). D'une part, cet acide contribue au phénomène de pluies acides et d'autre part à la formation des particules secondaires. Il est neutralisé par l'ammoniac pour former des particules de NH_4NO_3 . La stabilité du nitrate d'ammonium dépend de la température, il est plus stable à basse température, c'est pourquoi sa concentration dans l'air est plus grande en hiver qu'en été. De même, HNO_3 peut réagir avec le chlorure de sodium en atmosphère côtière pour donner le nitrate de sodium NaNO_3 (Dasgupta et al., 2007 ; Harrison, 1996 ; Lin et Cheng, 2007). Dans une atmosphère contenant des particules riches en calcium, provenant des érosions des sols calcaires, le $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ se forme suite à la réaction entre CaCO_3 et le HNO_3 (Hodzic et al., 2006 ; Kouyoumdjian et Saliba, 2006 ; Koçak et al., 2004).

Un autre composé azoté impliqué dans les réactions de conversion est l'ammoniac NH_3 provenant des sols et des océans ainsi que de la décomposition de matériaux organiques végétales (d'Almeida et al., 1991 ; Möller, 1995). La source majoritaire de NH_3 correspond à l'élevage des animaux et autres activités agricoles notamment l'épandage d'engrais sur les sols. L'ammoniac neutralise les acides de nitrates HNO_3 et de sulfates H_2SO_4 pour former les sels d'ammonium tels que le NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et NH_4HSO_4 (Renard et al., 2004 ; Seinfeld et Pandis, 1998).

L'oxyde de diazote (N_2O) est un gaz azoté provenant essentiellement de l'agriculture notamment la dégradation des engrais. Il est émis aussi suite à la décomposition lente de la végétation.

2.2.2. D'autres ions majeurs

La corrélation entre Na^+ et Cl^- a longtemps été étudié pour identifier la présence des sels marins dans les particules collectées. Des aérosols marins fraîchement émis possèdent un ratio Cl^-/Na^+ proche de celui retrouvé de l'eau de mer (1,80) tandis que des aérosols marins ayant séjourné dans l'atmosphère montrent une valeur plus faible de ce ratio, en raison de l'interaction avec les espèces gazeuses, SO_2 et NO_x , conduisant à une perte de Cl^- . En zone côtière, d'autres ions comme Mg^{2+} et K^+ sont majoritairement associés aux émissions de sels marins (Ilacqua et al., 2007). Toutefois, la présence de ces deux ions dans l'atmosphère peut aussi être expliquée par des émissions de poussières de sols, d'activités de construction, voire d'émissions dues à des phénomènes de combustion de biomasse (cas du potassium).

2.3. Les métaux

Les éléments métalliques présents dans les particules sont nombreux et proviennent de sources diverses, dont les principales sont l'industrie, les trafics routier et maritime, mais aussi la croûte terrestre (Tableau I.2). Un grand nombre de ces éléments sont présents à l'état de traces, mais cependant, les métaux peuvent acquérir le statut de composants majeurs dans les zones industrielles. La spéciation chimique, qui conditionne la biodisponibilité des métaux et donc leur potentiel à participer à des réactions spécifiques, dépend de la source d'émission, c'est pourquoi une simple mesure de la concentration atmosphérique d'un métal ne suffit pas toujours pour définir ses effets délétères potentiels (Harrison and Yin, 2000).

Les particules du sol peuvent être mises en suspension dans l'air grâce au vent et aux activités anthropiques. Les proportions des composants chimiques (Al, Ca, Fe, Mg, Ti,...) des aérosols atmosphériques provenant de la poussière de la croûte terrestre et de l'abrasion des roches varient d'un site d'étude à l'autre, en raison de la différence dans la composition chimique des sols. La mise en suspension de ces particules est maximale par temps sec accompagné de vents importants (Harrison et al., 1997).

Pour identifier les éléments traceurs appropriés pour les sources de pollution de l'air, la recherche des corrélations entre les différents éléments forme une première étape.

Tableau I.2 : Sources des différents métaux présents dans la composition des aérosols.

Sources	Métaux	Références
Croûte terrestre	Al, Ti, Ca, Fe, Mg, Na, K	(Ilacqua et al., 2007) (Wu et al., 2007) (Cyrus et al., 2003) (Götschi et al., 2005)
Trafic		
Emission véhiculaire à l'échappement	Cu, K, Mn, Zn, Pb, Ba, Sb, Br, V, Cd	(Ilacqua et al., 2007) (Cyrus et al., 2003) (Thorpe and Harrison, 2008a)
Emission véhiculaire hors échappement	Fe, Cu, Cd, Ba, Mn (freins de véhicules) Zn, Ba, Mn (abrasion des pneus)	(Grigoratos and Martini, 2015) (Tsai et al., 2015a) (Moreno et al., 2006)
Combustion		
fioul lourd	Ni, V	(Tsai et al., 2015a) (Ilacqua et al., 2007) (Cyrus et al., 2003) (Roche, 2016)
charbon	Ni, Pb, Mn, Hg, Cr, Co, Cu, Cd	(Salvador, 2012) (Cyrus et al., 2003) (Ilacqua et al., 2007) (Lecuyer et al., 2004)
biomasse	K	(Ilacqua et al., 2007)
Activités industrielles		
Sidérurgie	Pb, Cd, Ag, Rb, K, Fe (agglomération de minerais) Zn, Mn (aciérie) Fe, Pb, Zn, Ni	(Kfoury et al., 2016a) (Oravsjärvi et al., 2003) (Dall'Osto et al., 2008)
Pétrochimie	Ni, V, Pb, Zn, Cr, Co	(Moreno et al., 2006)
Métallurgie	Cu, Pb, Zn, Al, Ag	(Moreno et al., 2006)
Industrie des pigments	Cr, Mo, Ni, Co, , Cu, Ti	(Moreno et al., 2006)
Industrie du ciment	Al, Ca, K, Mg, Sr	(Santacatalina et al., 2010)
Industrie verrière	Al, Ti, Ca, Mg, Fe, Mn, Sr, Rb, Ba, (matière première) Li, Zn, Ag, Cd, Sb, Pb, Cu, Sn (étapes de coloration)	(Ledoux et al., 2017) (Rampazzo et al., 2008)

2.4. La fraction biologique

La biosphère constitue une source importante et diverse de particules biogéniques naturelles primaires d'une hétérogénéité considérable avec des structures complexes (surfaces rugueuses, pores internes, formes asymétriques) et dont les diamètres aérodynamiques peuvent varier considérablement entre plusieurs nanomètres et quelques centaines de micromètres.

La fraction biologique regroupe des bactéries présentant une durée de vie longue dans l'atmosphère à cause de leur petite taille. La composition et concentration des bactéries subissent des changements quotidiens, hebdomadaires et saisonniers avec la plus importante concentration en été et automne pour les bactéries rurales et urbaines. Les bactéries d'origine marine sont mieux transférées à l'atmosphère en cas de vent fort. Les embranchements les plus fréquemment rencontrés regroupent les *Proteobacteria* en bactéries gram-négatif, les *Firmicutes* et les *Actinobacteria* en gram-positif (Smets et al., 2016).

Une deuxième classe connue pour sa contribution à la fraction biologique regroupe les champignons, les spores ainsi que les fragments de spores. La plupart des champignons dans l'air appartiennent aux divisions des *Ascomycota* et *Basidiomycota*. En fonction de l'espèce, de l'âge et des conditions ambiantes, le diamètre des spores libérées par les champignons peut varier entre 2 et 10 μm . Ces spores forment des agrégats de chaînes longues affectant le diamètre aérodynamique et par la suite la durée de vie dans l'atmosphère. Parmi les espèces les plus retrouvées on cite *Cladosporium*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus* et *Epicoccum* (Glikson et al., 1995; RNSA, 2011).

Les pollens sont présents dans la fraction biologique des aérosols non seulement sous forme d'unité complète entre 10 et 100 μm mais aussi sous forme fragmentée de 30 nm à 5 μm après rupture des pollens en cas d'humidité élevée. La présence des pollens dans l'atmosphère suit un cycle saisonnier et se caractérise par une courte durée de vie à cause de leur diamètre important.

Les virus forment la classe avec le diamètre le plus petit, de l'ordre de 20 nm, et adhèrent plus souvent à la surface des particules. On trouve également dans cette fraction

des fragments de plantes, dont la présence de cellulose dans l'atmosphère est connue comme estimateur de la concentration totale de débris de plantes, ou encore des fibres animales.

Si la source d'émission des particules joue un rôle important dans leur composition, leurs caractéristiques physiques sont aussi des éléments déterminants. Les capacités d'adsorption des particules étant directement reliées à la surface spécifique disponible, les particules les plus petites présentent généralement la fraction organique la plus importante. D'un point de vue global, les particules fines et ultrafines sont des agrégats carbonés avec des métaux, des ions sulfates et nitrates et des espèces organiques adsorbés à leur surface tandis que les particules grossières sont constitués majoritairement de minéraux dérivés de la croûte terrestre, des sels marins et matériaux d'origine biologique.

Partie 2 : Pollution de l'air : réglementations et impacts sur la santé

1. *Pollution de l'air : réglementations relatives aux polluants atmosphériques*

La pollution ne constitue en aucun cas un problème récent ou un phénomène épisodique. Cependant, ce n'est qu'après le déroulement d'épisodes majeurs de pollution que le risque attribué à cette dernière a été pris en conscience. Au cours du 20^{ème} siècle, de nombreux épisodes catastrophiques de pollution atmosphérique ont eu lieu. En 1930, la vallée de la Meuse, en aval de la ville de Liège fortement industrialisée, a été couverte par un épais nuage de suie pendant les 5 premiers jours de décembre. Des milliers de personnes ont connu des signes et des symptômes respiratoires, et plus de 60 personnes sont décédées durant les 3 jours suivants. Cet épisode a contribué à la première preuve scientifique montrant les effets négatifs de la pollution atmosphérique sur la santé humaine (Nemery et al., 2001). Quelques années plus tard, à Donora une ville industrialisée en Pennsylvanie, un nuage de particules et de gaz a couvert la ville du 26 au 30 Octobre 1948. Parmi les 14000 habitants, entre 5000 et 7000 personnes ont été malades, 400 ont été hospitalisées et 20 sont mortes par asphyxie (Helfand et al., 2001). L'un des pires épisodes de pollution atmosphérique s'est déroulé à Londres en 1952 et est encore aujourd'hui connu sous le nom du « Great London Smog » où un smog épais a couvert la ville du 5 au 9 Décembre causant des milliers de décès, pour la plupart due à des infections des voies respiratoires (Bell and Davis, 2001). C'est suite à cet épisode, reconnu comme étant le plus significatif de l'histoire, que les chercheurs ont mené leur première analyse détaillée établissant la relation entre le niveau de polluants dans l'air et l'augmentation de la morbidité et de la mortalité.

Ces épisodes de pollution ont déclenché la mise en place de réglementations par les gouvernements et les autorités publiques telles que le « Air Pollution Control Act » (Etats Unis) élaboré en 1955, formant la première loi fédérale prévoyant des fonds pour la recherche sur la qualité de l'air. Elle a été suivie par le « Clean Air Act » (Etats Unis) en 1963 mettant en place

un programme fédéral au sein du service de santé publique des États-Unis et autorisant des recherches sur les techniques de surveillance et de contrôle de la pollution de l'air. En 1970, la promulgation du « Clean Air Act » a entraîné un changement majeur dans le rôle du gouvernement fédéral dans la lutte contre la pollution atmosphérique en autorisant l'élaboration de réglementations pour limiter les émissions provenant de sources fixes et mobiles. L'« Environmental Protection Agency » EPA (Etats Unis) a été créée la même année afin de mettre en œuvre les différentes exigences incluses dans cette loi (EPA, 2017).

Afin de limiter l'impact sanitaire des particules atmosphériques, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) recommande de respecter un objectif de qualité. Ainsi, les concentrations maximales recommandées pour les PM₁₀ et les PM_{2.5} ont été fixées respectivement à 20 et 10 µg/m³ en moyennes annuelles et à 50 et 25 µg/m³ en moyennes journalières (WHO, 2006).

Au niveau européen, plusieurs directives ont été élaborées pour établir des valeurs limites et des normes de qualité de l'air telles que la directive établie en 2001 (directive 2001/81/CE) qui fixe des plafonds d'émission pour certains polluants atmosphériques dans chacun des pays membres de l'Union Européenne (UE). Egalement durant cette année, le programme « Air Pur pour l'Europe » CAFE a été lancé par la Commission Européenne pour mettre au point une politique stratégique intégrée à long terme protégeant l'environnement et la santé humaine contre les effets de la pollution atmosphérique (Bartaire, 2001).

Plus tard, la directive européenne (2004/107/CE) du 15 décembre 2004 concernant l'arsenic, le cadmium, le mercure, le nickel et les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les particules a été définie. Elle a pour but de déterminer des méthodes et des critères d'évaluation des concentrations de ces composés ainsi que d'établir les valeurs cibles en moyenne annuelle pour l'arsenic (6 ng/m³), le cadmium (5ng/m³), le nickel (20 ng/m³) et le benzo(a)pyrène (1 ng/m³). Cette directive vise également à garantir la préservation de la qualité de l'air afin d'éviter, de prévenir et de limiter les effets nocifs de ces composés sur la santé et sur l'environnement et à mettre à disposition du publiques les informations adéquates concernant ces composés.

Différentes normes ont été fixées pour des polluants gazeux notamment le dioxyde d'azote (NO₂), l'ozone (O₃), le dioxyde de soufre (SO₂), le monoxyde de carbone (CO) et les particules atmosphériques (PM_{2.5}, PM₁₀).

- *valeur limite*, un niveau à atteindre dans un délai donné et à ne pas dépasser, et fixé sur la base des connaissances scientifiques afin d'éviter, de prévenir ou de réduire les effets nocifs sur la santé humaine ou sur l'environnement dans son ensemble ;
- *valeur cible*, un niveau à atteindre, dans la mesure du possible, dans un délai donné, et fixé afin d'éviter, de prévenir ou de réduire les effets nocifs sur la santé humaine ou l'environnement dans son ensemble ;
- *objectif de qualité*, un niveau à atteindre à long terme et à maintenir, sauf lorsque cela n'est pas réalisable par des mesures proportionnées, afin d'assurer une protection efficace de la santé humaine et de l'environnement dans son ensemble ;
- *seuil d'information et de recommandation*, un niveau au-delà duquel une exposition de courte durée présente un risque pour la santé humaine de groupes particulièrement sensibles au sein de la population et qui rend nécessaire l'émission d'informations immédiates et adéquates à destination de ces groupes et des recommandations pour réduire certaines émissions ;
- *seuil d'alerte*, un niveau au-delà duquel une exposition de courte durée présente un risque pour la santé de l'ensemble de la population ou de dégradation de l'environnement, justifiant l'intervention de mesures d'urgence.

En Europe, les réglementations concernant les teneurs journalières et annuelles en particules en suspension PM₁₀ ont été établies en 1999 (directive 1999/30/CE). Cette directive a été plusieurs fois amendée et depuis 2008 (directive 2008/50/CE), la valeur limite moyenne annuelle est de 40 µg/m³, tandis que la valeur limite moyenne journalière est de 50 µg/m³ avec 35 jours de dépassements autorisés sur l'année. Cependant, le décret n°2010-1250 fixe en plus « *les normes à appliquer pour les particules « PM_{2.5} », jugées plus préoccupantes pour la santé que les particules « PM₁₀ », parce qu'elles pénètrent plus profondément dans les poumons en raison de leur petite taille et qu'elles s'accumulent dans l'organisme* » (MEDDE, 2010). L'objectif de qualité pour les PM_{2.5}, est fixé à 10 µg/m³ en moyenne annuelle. Par

ailleurs, la valeur cible est fixée à $20 \mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ à partir de 2015, tandis que la valeur limite a progressivement été abaissée de $30 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en 2008 pour atteindre $25 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en 2015. Afin de prévenir les populations, une procédure d'information et de recommandation puis d'alerte est mise en place lorsque des seuils de concentration de 50 puis de $80 \mu\text{g}/\text{m}^3$ sont franchis pendant 24h glissante pour les PM_{10} .

En France, la réglementation de la qualité de l'air a commencé en 1996 avec la Loi sur l'Air et l'Utilisation Rationnelle de l'Energie (LAURE) (loi n°96-1236) qui définit la pollution de l'air comme « la dégradation de l'air que l'on respire par l'introduction par l'homme directement ou indirectement, dans l'atmosphère de substances ayant des conséquences préjudiciables de nature à mettre en danger la santé humaine, à nuire aux ressources biologiques et aux écosystèmes, à influencer sur les changements climatiques, à détériorer les biens matériels, à provoquer des nuisances olfactives excessives ». Au niveau de la France, la majorité des actions et des outils mis en œuvre pour lutter contre la pollution de l'air, dépendent de l'impulsion de l'Union Européenne. La réglementation européenne entrée en vigueur en 2015 et appliquée de nos jours figure dans la directive 2008/50/CE qui a été transcrite en droit français et transposée par le décret n°2010-1250 du 21 octobre 2010.

Le Tableau 1.3 représente les valeurs réglementaires définis par les directives européennes et mentionnées dans la réglementation française (décret n°2010-1250).

Tableau I.3 : Valeurs cibles, limites et objectifs de qualité concernant les concentrations de différents polluants imposées par l'Union Européenne et fixées par le Décret n°2010-1250 du 21 octobre 2010 relatif à la qualité de l'air (MEDDE, 2010).

POLLUANT	VALEUR LIMITE	VALEU CIBLE	OBJECTIF DE QUALITÉ
Dioxyde de soufre (SO₂)	Moyenne journalière : 125 µg/m³ (3 jours max par an) Moyenne horaire : 350 µg/m³ (24 heures max par an)	-	Moyenne horaire : 50 µg/m³
Dioxyde d'azote (NO₂)	Moyenne annuelle : 40 µg/m³ Moyenne horaire : 200 µg/m³ (18 heures max par an)	-	-
Ozone (O₃)	-	Moyenne sur 8 heures glissantes : 120 µg/m³ (25 jours max par an moyenne calculée sur 3 ans)	Moyenne sur 8 heures glissantes : 120 µg/m³
PM₁₀	Moyenne annuelle : 40 µg/m³ Moyenne journalière : 50 µg/m³ (35 jours max par an)		Moyenne annuelle : 30 µg/m³
PM_{2.5}	Moyenne annuelle : 25 µg/m³	Moyenne annuelle : 20 µg/m³	Moyenne annuelle : 10 µg/m³
Monoxyde de carbone (CO)	Moyenne sur 8 heures glissantes : 10 mg/m³		

Les réglementations concernant la qualité de l'air ont apporté et continuent à apporter de nombreuses améliorations. Cependant, une large proportion des populations européennes sont toujours exposées aux polluants dont les concentrations dépassent les valeurs limites imposées par l'UE et celles préconisées par l'OMS. Parmi ces polluants, les particules

atmosphériques qui ont révélé une tendance décroissante dans la moyenne annuelle entre 2000-2014 pour les PM_{10} et 2006-2014 pour les $PM_{2.5}$. Toutefois les concentrations en particules atmosphériques ont continué à dépasser les normes définies par l'UE dans une grande partie de l'Europe. En 2014, les concentrations enregistrées étaient supérieures à la valeur limite journalière dans 21 pays des 28 pays membres pour les PM_{10} et dans 8 agglomérations françaises et au-delà de la valeur limite annuelle des $PM_{2.5}$ dans 4 pays de l'UE-28. Le suivi des $PM_{2.5}$ en France montre qu'en 2013, 4 sites sur 104 ont enregistré des teneurs de $PM_{2.5}$ supérieures aux seuils nationaux. A cause de ces excédents, 16% et 50% de la population européenne urbaine ont été exposés à des valeurs de PM_{10} supérieures à celles définies par l'UE et l'OMS respectivement. Quant aux $PM_{2.5}$, 8% et 85% de la population urbaine européenne ont été exposés à des valeurs dépassant les valeurs limites de l'UE et les valeurs guides de l'OMS (EEA, 2016).

Concernant les autres polluants, la valeur limite annuelle a été largement dépassée en 2014 dans 17 pays membres de l'UE-28 pour le dioxyde d'azote, et dans 16 états membres pour l'ozone. Le dioxyde de soufre et le monoxyde de carbone ont montré des concentrations toujours inférieures aux valeurs limites.

Malgré la diminution d'émission et de concentrations de plusieurs polluants au cours de ces dernières années, la qualité de l'air n'est toujours pas satisfaisante : 81% des Etats de l'UE ne respectent pas la réglementation fixée pour les PM_{10} , les $PM_{2.5}$ et le dioxyde d'azote et 59% pour l'ozone. La France est classée quinzième sur 27 avec un taux de dépassement des normes de concentrations de 5% avec un dépassement des seuils pour sept des quinze polluants réglementés en 2014. Comme conséquence, la Commission Européenne a demandé à la France des avis motivés et engagé des procédures précontentieuses pour non-respect des valeurs limites.

2. Impacts de la pollution atmosphérique sur la santé humaine

La prise de conscience des dangers de la pollution atmosphérique, éveillée suite aux épisodes graves, a déclenché la mise en œuvre de nombreuses études épidémiologiques à court et long terme, des études cliniques et des suivis de données physiopathologiques. Ces

études ont révélé que l'exposition à la pollution atmosphérique était liée à la morbidité et à la mortalité. Les deux systèmes affectés en premier sont le système respiratoire et le système cardiovasculaire avec des effets allant des nausées jusqu'à la mort. Toutefois les fonctions de plusieurs organes peuvent être influencées par l'exposition à ces polluants.

Parmi le grand nombre de polluants, le système nerveux est principalement affecté par les métaux lourds tels que le plomb, l'arsenic et le mercure avec des symptômes comprenant les troubles de la mémoire, les troubles du sommeil, la colère, la fatigue, les tremblements de mains, la vision floue et la mauvaise articulation (Andrade et al., 2015; Caito and Aschner, 2015). Le système nerveux est également altéré par l'exposition par inhalation aux dioxines notamment chez les enfants causant une diminution de la vitesse de la conduction du nerf et du développement mentale des enfants (Tai et al., 2016). Cependant la voie principale d'absorption des dioxines étant la voie orale, des altérations du système digestif peuvent avoir lieu induisant le cancer gastro-intestinal et le cancer du foie (Mandal, 2005).

Parmi les nombreux polluants qui peuvent nuire à la santé humaine, nous nous concentrerons par la suite sur les particules atmosphériques en nous intéressant aux effets causés par l'exposition à court et long terme. L'évaluation de l'effet de l'exposition a été recherchée dans des études prospectives de cohorte qui consistent à suivre au fil des années les modifications observées chez un échantillon d'individus. Le constat confirmé par toutes les études menées jusqu'à présent révèle la lourdeur des conséquences de la pollution atmosphérique envers la santé de l'homme.

2.1. *Exposition à court terme aux particules atmosphériques*

2.1.1. *Morbidité*

Plusieurs études disponibles à ce jour ont fourni des preuves d'association entre les expositions à court terme aux particules atmosphériques et la santé. Ces études révèlent un lien de causalité entre l'exposition aux PM₁₀ et l'hospitalisation (Zanobetti and Schwartz, 2005) avec des effets indésirables au niveau du système respiratoire (Chen et al., 2011) tels que l'hospitalisation due à l'asthme (Cai et al., 2014). Toutefois les études s'intéressant aux effets sur le système cardiovasculaire sont les plus nombreuses (Mallone et al., 2011). Une

augmentation de $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de la concentration des PM_{10} augmente le risque d'hospitalisation de 0,7% à cause de cardiopathie ischémique et de 0,8% pour une insuffisance cardiaque congestive (Morris, 2001). Egalement une telle élévation de PM_{10} peut accroître le risque de visites d'arythmie ambulatoire de 0,56% (Zhao et al., 2014).

Une exposition chronique aux $\text{PM}_{2.5}$ peut également cause de l'asthme (Cheng et al., 2014). Les effets sur le système cardiovasculaire ont été bien étudiés. L'exposition chronique aux $\text{PM}_{2.5}$ augmente le risque d'hospitalisation pour cardiopathie ischémique (von Klot et al., 2005; Mustafic et al., 2012; Pope et al., 2004), augmente le nombre de visites hospitalières pour l'arythmie (Chiu et al., 2013) et accroît le risque d'arrêts cardiaques (Ensor et al., 2013; Silverman et al., 2010) et d'infarctus du myocarde (Wellenius et al., 2006).

2.1.2. Mortalité

Suite à l'exposition aiguë aux PM_{10} , une mortalité prématurée a été enregistré dans plusieurs études (Janssen et al., 2013; Meister et al., 2012; Stafoggia et al., 2016; Tobías et al., 2011; Tsai et al., 2015b). Les travaux d'Analitis *et al.* ont montré qu'une augmentation de $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ est associée à une augmentation de 0,76% de la mortalité par maladies cardiovasculaires et 0,56% par causes respiratoires (Analitis et al., 2006).

L'exposition à court terme aux $\text{PM}_{2.5}$ est accompagnée d'une augmentation de la mortalité. Une étude réalisée sur 9 villes en Californie entre 1999 et 2002, a montré que pour une chaque augmentation de $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de la concentration de $\text{PM}_{2.5}$, une élévation de 0,6% du risque de mortalité a été notée (Ostro et al., 2006). La relation positive entre l'exposition aux $\text{PM}_{2.5}$ et la mortalité par causes cardiovasculaires a été prouvée dans de nombreuses études notamment en provenance des Etats-Unis et de l'Asie. Même une exposition de moins de 24 heures aux $\text{PM}_{2.5}$ peut augmenter le risque de mortalité cardiovasculaire journalière de 0,4 à 1% (Pope and Dockery, 2006). Shah *et al.* a montré que l'exposition aux particules fines soulève le risque de mort par insuffisance cardiaque congestive (Shah and Balkhair, 2011).

2.2. Exposition à long terme aux particules atmosphériques

2.2.1. Morbidité

La survenue de certaines pathologies, et notamment certaines formes de maladies cardiovasculaires, a été reliée à une exposition à long terme aux particules atmosphériques. L'étude ESCAPE regroupant plus de 100 000 participants de 11 cohortes en Europe a révélé un risque accru d'événements coronariens de 12% pour une augmentation de 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de PM_{10} et un risque accru de 13% par augmentation de 5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de $\text{PM}_{2.5}$. Cette association persiste même à des concentrations de $\text{PM}_{2.5}$ et PM_{10} en dessous de la limite européenne annuelle fixée (25 et 40 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ respectivement) (Cesaroni et al., 2014). Egalement Wolf *et al.* a établi cette association avec une augmentation du risque d'événements coronariens de 6% et 18% pour une augmentation de 100 ng/m^3 et 50 ng/m^3 de PM_{10} de $\text{PM}_{2.5}$ respectivement (Wolf et al., 2015). Plusieurs études ont examiné les associations d'athérosclérose sous-clinique, la pathologie sous-jacente de la plupart des événements coronariens et l'exposition à long terme aux $\text{PM}_{2.5}$ (Adar et al., 2014; Kälisch et al., 2014; Krishnan et al., 2012). L'exposition chronique aux particules fines a également été liée à une hypertension (Chan et al., 2015) et à un accroissement de 19% du risque d'accident vasculaire cérébral (AVC) pour une augmentation de 5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de l'exposition annuelle aux $\text{PM}_{2.5}$ (Stafooggia et al., 2016).

Quant aux effets sur le système respiratoire, des associations positives ont été établies entre l'exposition chronique aux PM_{10} et la survenue des maladies respiratoires tels que l'asthme et la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO), une maladie pulmonaire se caractérisant par une baisse persistante de l'écoulement des gaz inspirés (Qiu et al., 2012). Le lien est aussi mis en évidence pour les $\text{PM}_{2.5}$ où une exposition à long terme peut augmenter l'incidence de maladies respiratoires en particulier la pneumonie (Katanoda et al., 2011). Les particules fines, ainsi que la pollution de l'air extérieur en général, ont été classées par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) comme des cancérigènes certains (groupe 1) pour l'homme (Loomis et al., 2013). L'étude européenne ESCAPE a signalé une association significative entre l'exposition à long terme aux $\text{PM}_{2.5}$ et PM_{10} et l'incidence du cancer pulmonaire (Raaschou-Nielsen et al., 2013).

2.2.2. Mortalité

Avec des données provenant d'un suivi de la mortalité de 8111 adultes pendant 14 à 16 ans dans six villes américaines, Dockery *et al.* ont montré que la pollution de l'air notamment par les particules fines était positivement associée à la mort par le cancer du poumon et les maladies cardiopulmonaires (Dockery *et al.*, 1993). Par la suite Pope *et al.* a publié une étude comprenant un nombre plus important de sujets, 550 000 personnes dans 151 villes aux États-Unis et en s'intéressant aux causes de la mortalité (Pope *et al.*, 2002). L'étude a montré que chaque augmentation de $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de la pollution de l'air par les particules fines, était associée à une augmentation respectivement de 4%, 6% et 8% du risque de mortalité par le cancer lié à toutes causes, le cancer cardiopulmonaire et le cancer du poumon.. Des chercheurs ont complété l'étude de Dockery en prolongeant le suivi de la mortalité pendant 8 ans (Laden *et al.*, 2006) et 11 ans (Lepeule *et al.*, 2012) en incorporant des périodes de faible concentration de $\text{PM}_{2.5}$. Un nouveau traitement des données de l'étude de Pope a été mené par Krewski en 2004 pour valider les résultats originaux et en 2009 pour un suivi prolongé et une analyse approfondie (Krewski *et al.*, 2004, 2009). Ces nouveaux résultats ont confirmé une association statistiquement significative et cohérente entre l'exposition à long terme aux $\text{PM}_{2.5}$ et le risque de mortalité. En outre, le pourcentage de mortalité par unité d'exposition reste cohérent avec celui de l'étude initiale.

La relation de causalité entre l'élévation des niveaux ambiants de particules fines et l'accroissement de la mortalité se retrouve dans un nombre important de nouvelles études prospectives de cohortes en provenance d'Asie, du Canada, d'Europe et des États-Unis. La mortalité peut être due à toutes causes (Bentayeb *et al.*, 2015; Crouse *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2016; Pinault *et al.*, 2016; Shi *et al.*, 2016), à des maladies respiratoires (Beelen *et al.*, 2008; Hart *et al.*, 2011; Ostro *et al.*, 2010) telles que le cancer du poumon (Gharibvand *et al.*, 2017) ou à des maladies cardiovasculaires (Beelen *et al.*, 2014; Crouse *et al.*, 2012; Puett *et al.*, 2009) notamment l'insuffisance cardiaque ischémique (Lipsett *et al.*, 2011; Ostro *et al.*, 2015), l'arrêt cardiaque (Pope *et al.*, 2002) et les événements vasculaires cérébraux (Miller *et al.*, 2007). Ces études ont fourni des preuves supplémentaires quant aux impacts de l'exposition à long terme aux $\text{PM}_{2.5}$ sur la mortalité avec, dans certaines études, des effets observés à des concentrations de $\text{PM}_{2.5}$ allant jusqu'à $8 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (Crouse *et al.*, 2012; Lepeule *et al.*, 2012), 6,3

$\mu\text{g}/\text{m}^3$ (Pinault et al., 2016) et même $5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (Beelen et al., 2014), des concentrations plus faibles que celles dans les études antérieures et même inférieures aux objectifs de qualité de l'UE et de l'OMS.

De nombreuses études se sont intéressées aux effets des PM_{10} , montrant une association entre l'exposition à ces particules et la mort par maladies cardiovasculaires (Atkinson et al., 2013; Beelen et al., 2014), respiratoires (Chen et al., 2016; Dong et al., 2012; Hales et al., 2012) et autres causes. Une étude en Chine a montré qu'une élévation de $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de PM_{10} augmenterait le risque de mortalité cardiovasculaire de 1,8% (Zhou et al., 2014). Une exposition pendant 12 ans aux PM_{10} est associée à une élévation de la mortalité cardiovasculaire et cérébrovasculaire en Chine (Zhang et al., 2011)

L'ensemble des études menées à court et long termes ont prouvé l'association positive entre l'exposition aux particules atmosphériques et le risque accru de maladies respiratoires (par exemple, asthme, maladie pulmonaire obstructive chronique, cancer du poumon) et cardiovasculaires (par exemple, insuffisance cardiaque, arythmie, accidents vasculaires cérébraux) en plus d'une mortalité liée à des causes respiratoires et cardiovasculaires. D'après l'agence européenne de l'environnement, la France a enregistré 45 120 morts prématurées liées à la pollution atmosphérique en 2013 (EEA, 2016). Il a été estimé qu'une diminution des concentrations de PM_{10} et $\text{PM}_{2.5}$ serait accompagnée d'une augmentation de l'espérance de vie (Boldo et al., 2006; Pope et al., 2009).

2.3. Variation de la réponse à l'exposition aux polluants atmosphériques avec l'âge

D'après l'OMS, la vulnérabilité est le degré auquel une population, un individu ou une organisation est incapable d'anticiper, de s'adapter, de résister, et de sortir des impacts des catastrophes. Parmi les populations classées vulnérables, on cite principalement les enfants, les femmes enceintes et les personnes âgées (WHO, 2017a). Suite à l'exposition à la pollution atmosphérique, différents groupes d'individus sont touchés différemment. Des effets plus graves sont observés chez les populations classées vulnérables et chez les personnes déjà malades.

De nombreuses études épidémiologiques se sont intéressées aux effets observés chez les femmes enceintes après exposition aux polluants. Parmi ces effets, on cite la survenue de fausses couches et l'augmentation du risque d'avortement spontané. La pollution de l'air a également été suggérée comme un facteur de risque de l'accouchement prématuré (Estarlich et al., 2016) notamment par le dioxyde d'azote et le benzène. Ce même effet accompagné d'un faible poids à l'accouchement et d'une naissance de petit poids pour l'âge gestationnel sont observés suite à l'exposition de la femme durant sa grossesse aux PM₁₀ (Pereira et al., 2016) et aux PM_{2.5} (Li et al., 2017; Shah and Balkhair, 2011). Egalement, une augmentation de risque d'avortement spontané (Bellinger, 2005), une réduction de développement du fœtus (accouchement prématuré, faible poids à la naissance) et des lésions au niveau du système nerveux en développement (Garza et al., 2006) sont survenues après l'exposition de la femme enceinte au plomb quelle que soit la voie d'exposition. Quant aux effets observés chez les enfants, les études de cohortes de naissance ont révélé l'association entre l'exposition des enfants aux PM_{2.5} et les infections respiratoires et l'asthme (Darrow et al., 2014; Gehring et al., 2010; Lim et al., 2016; MacIntyre et al., 2011), la bronchiolite (Lewin et al., 2013; de P Pablo-Romero et al., 2015), ainsi que des effets sur le fonctionnement des poumons (Eenhuizen et al., 2013).

Le vieillissement est une évolution inévitable, caractérisée par l'ensemble des processus physiologiques et psychologiques modifiant la structure et le fonctionnement de l'organisme rendant les personnes de plus en plus vulnérables. Il est couramment mesuré par l'âge chronologique, il est considéré qu'une personne de plus de 65 ans fait partie des «personnes âgées». Cependant, Il n'y a pas d'accord général sur l'âge auquel une personne vieillit puisque le processus de vieillissement n'est pas uniforme dans l'ensemble de la population en raison de différences dans la génétique, le mode de vie et la santé globale. Toutefois, dans les pays développés, l'âge équivalent à la cessation de l'activité professionnelle est considéré comme le début de la vieillesse (WHO, 2017b).

Au cours des dernières années, il y a eu une forte augmentation du nombre de personnes âgées dans presque tous les pays, plus rapide que n'importe quel autre groupe d'âge en raison de l'espérance de vie devenue plus longue et de la baisse des taux de naissance. D'après l'OMS, le nombre de personnes âgées de 60 ans ou plus passera de 900

millions, 12% de la population mondiale totale en 2015 à 2 milliards (22%) en 2050 (WHO, 2017c). Au niveau européen, l'âge moyen est déjà le plus élevé au monde, l'OMS prévoit un passage de la proportion des personnes âgées de 14% en 2010 à 25% en 2050 (WHO, 2011). Toutefois, la chance des personnes âgées de vivre le vieillissement en bonne santé varie d'une personne à une autre. L'état de santé est le résultat des effets du vieillissement ainsi que des effets additifs de maladies passées, actuelles, chroniques ou aiguës. C'est pourquoi les études épidémiologiques se sont intéressées récemment à la recherche des conséquences sur la santé de différents facteurs de risques parmi lesquels, on cite les polluants atmosphériques.

La susceptibilité aux effets de la pollution atmosphérique varie d'une personne à une autre et pour un même individu en fonction du temps. Alors que certains individus ne présentent aucun symptôme face à la pollution, cette dernière peut déclencher des problèmes de santé chez d'autres. Egalement la présence de maladies chroniques peut provoquer la susceptibilité. Avec le vieillissement, les personnes souffrent davantage de maladies chroniques respiratoires ou cardiovasculaires pouvant s'aggraver suite à une exposition à des polluants (Goldberg et al., 2013).

2.3.1. Effets de l'exposition des personnes âgées à court terme aux particules atmosphériques

2.3.1.1 Morbidité

Des relations fortes existent entre l'exposition à court terme aux polluants de l'air, y compris les particules atmosphériques, et la morbidité chez les personnes âgées. Les effets de l'exposition aux particules ont été traduits par une augmentation du pourcentage d'admission à l'hôpital pour différentes maladies respiratoires (Jo et al., 2017) et cardiovasculaires (Colais et al., 2012).

Une étude s'intéressant au nombre d'hospitalisations des personnes âgées (âge >65 ans) par jour dues à la BPCO et aux niveaux moyens quotidiens de trois polluants NO₂, CO et PM₁₀ pendant 5 ans, a montré qu'un lien existe entre ces polluants et l'hospitalisation aiguë (Yang et al., 2005). Une grande étude impliquant les habitants de 36 villes des Etats Unis a montré qu'une augmentation à court terme de la concentration ambiante de PM₁₀ était accompagnée d'une augmentation de l'hospitalisation des personnes âgées (>65 ans) à cause

de la BPCO (Medina-Ramón et al., 2006). Chen et ses collègues ont montré qu'en plus des PM_{10} , les $PM_{2.5}$ sont également associés avec une hospitalisation des personnes âgées en raison de cette maladie (Chen et al., 2004). Chez les personnes âgées et suite à une augmentation de $10 \mu g/m^3$ de la concentration de PM_{10} et $PM_{2.5}$, un accroissement du pourcentage d'hospitalisations pour BPCO de 2,4% et 3,1% a été respectivement observé entre 0 et 5 jours de latence (Ko et al., 2007). En comparant le taux d'hospitalisation chez les enfants, les adultes et les personnes âgées, Halonen a montré qu'un effet immédiat est observé chez les personnes âgées par rapport aux autres catégories d'âge (Halonen et al., 2008).

Une deuxième maladie respiratoire causant l'hospitalisation chez les personnes âgées est l'asthme. Selon une étude Canadienne, une élévation de la concentration des $PM_{2.5}$ est associée à l'augmentation de visites au département d'urgence à cause de l'asthme. Parmi ces visites les personnes âgées (>65 ans) représentent 8,1% et sont classés deuxième après les enfants (2-4 ans) 12,5% (Villeneuve et al., 2007). Une étude a montré qu'après exposition aux PM_{10} et $PM_{2.5}$, les personnes âgées de plus de 65 ans ont un temps de latence court, comparé aux personnes de moins de 65 ans, pour développer un excès d'asthme (Ko et al., 2007).

L'augmentation du taux d'hospitalisation pour pneumonie a également été observée. L'exposition aux PM_{10} est associée à une augmentation d'hospitalisation par pneumonie (Medina-Ramón et al., 2006). Une augmentation de $10 \mu g/m^3$ de la concentration des $PM_{2.5}$ soulève de 3,8% le pourcentage d'hospitalisation pour raison de pneumonie chez les personnes âgées (Zanobetti and Schwartz, 2005). Une deuxième étude a montré une augmentation encore plus importante de 4,9% (Halonen et al., 2009).

Bien que plusieurs études aient montré que l'exposition aux particules atmosphérique pouvait augmenter le risque de maladies cardiovasculaires, peu se sont concentrées sur les personnes âgées.

Une relation apparait entre l'exposition à court terme aux particules atmosphériques et l'augmentation du risque de morbidité par maladies cardiovasculaires. Dominici et al. a montré une large association entre les concentrations en $PM_{2.5}$ et l'insuffisance cardiaque congestive. Une augmentation de $10 \mu g/m^3$ peut augmenter le risque d'insuffisance de 1.28% (Dominici et al., 2006). D'autres études ont révélé une augmentation de l'hospitalisation par

maladies cardiovasculaires surtout la cardiopathie ischémique, chez les personnes âgées (>65 ans) par rapport aux adultes (<65 ans) suite à l'exposition aux PM₁₀ (Larrieu et al., 2007), aux PM_{10-2.5} (Host et al., 2008) et aux PM_{2.5} (Pope et al., 2008).

2.3.1.2 Mortalité

De nombreuses études ont démontré un effet significatif de l'exposition à court terme aux particules atmosphériques sur la mortalité des personnes âgées. Une étude regroupant 29 villes européennes a montré que l'augmentation de 10 µg/m³ de la concentration en PM₁₀ produit une élévation de 0,8% du nombre journalier de mort chez les personnes âgées de plus de 65 ans (Aga et al., 2003). Cette population est considérée plus susceptible que d'autres à une mortalité non accidentelle après une telle exposition (Zeka et al., 2006). Plusieurs études récentes en Chine ont confirmé cette relation. Une élévation de 10 µg/m³ de la concentration en PM₁₀ en deux jours, est associée à l'augmentation de 0,26% (Kan et al., 2010) et de 0,5% de la mortalité liée à toutes causes (Chen et al., 2013). Une méta analyse regroupant les études publiées après 1995 sur l'exposition à court terme aux PM₁₀ et la mortalité a permis de conclure que pour une augmentation de 10 µg/m³ des PM₁₀ le risque de mortalité est significativement plus élevé chez les personnes âgées 0,64% par rapport aux plus jeunes 0,34% (Bell et al., 2013).

Ces mortalités peuvent être liées à des causes respiratoires ou cardiovasculaires. Une étude a été réalisée sur les causes de mortalité entre 2003 et 2006 à Milan et le lien éventuel avec une exposition à court terme aux PM₁₀. Une exposition journalière à une concentration de PM₁₀ supérieure à 40 µg/m³ était responsable de la mort de 1102 personnes âgées dont 797 par causes cardiovasculaires et 243 par problèmes respiratoires. A travers cette étude, Baccini *et al.*, a estimé le nombre de décès en moyenne qui aurait pu être évité si la concentration journalière des PM₁₀ n'avait pas dépassé 40 µg/m³ (Baccini et al., 2017).

Plusieurs études ont confirmé l'existence d'un lien positif entre la mortalité des personnes âgées par causes respiratoires et l'exposition aux PM₁₀ (Cakmak et al., 2007; Qian et al., 2010; Romieu et al., 2012) et PM_{2.5} (Brunekreef et al., 2009; Franklin et al., 2007; Lee et al., 2007). Une méta analyse effectuée sur les études chinoises a montré que pour chaque augmentation de 10 µg/m³ des PM_{2.5} la mortalité pour causes respiratoires s'élève de 0,51% (Shang et al., 2013).

Les études faisant le lien entre l'exposition à court terme aux particules et la mortalité pour raison cardiovasculaire sont moins nombreuses (Kan et al., 2010). Une étude récente a montré que les personnes âgées de plus de 65 ans appartiennent à la catégorie de population à susceptibilité élevée aux particules fines avec des effets négatifs allant jusqu'à la mort par AVC ischémique et AVC hémorragique (Kowalska and Kocot, 2016).

2.3.2. Effets de l'exposition des personnes âgées à long terme aux particules atmosphériques

2.3.2.1 Morbidité

L'exposition à long terme aux particules atmosphériques peut avoir des effets sur le système respiratoire des personnes âgées. L'étude de Bentayeb menée en France sur 2104 sujets âgés de plus de 65 ans, a ainsi révélé qu'une association peut être définie entre l'élévation de la moyenne annuelle de PM₁₀ et l'augmentation de la prévalence de la toux (Bentayeb et al., 2010). Une étude récente a établi un lien entre l'exposition chronique aux particules des sources industrielles et du trafic routier et la détection de marqueurs d'inflammation dans le condensat de l'air exhalé et dans l'expectoration induite (Vossoughi et al., 2014). De plus, l'exposition aux particules peut réduire les fonctions pulmonaires chez les personnes âgées de plus de 65 ans (Eckel et al., 2012) avec des dommages non réversibles malgré les améliorations de la qualité de l'air (Yanagita et al., 2013).

Quant aux effets cardiovasculaires, une étude a démontré que résider à proximité d'un axe routier à forte densité de trafic et caractérisé par des niveaux parmi les plus élevés de PM_{2.5}, entraîne une insuffisance de l'artère de conduction et de la fonction microvasculaire chez les personnes âgées (Wilker et al., 2014). Des travaux ont établi un lien entre l'exposition aiguë et chronique aux particules et le risque de thrombose veineuse profonde (Kloog et al., 2015). En parallèle, une étude récente a révélé l'association entre l'exposition à long terme des personnes âgées aux PM_{2.5} et l'augmentation de l'intervalle QT corrigé ce qui représente un facteur de risque d'arythmie (Mordukhovich et al., 2015).

2.3.2.2 Mortalité

Les risques de mortalité par pollution atmosphérique sont généralement plus élevés suite à une exposition chronique par rapport à une exposition aiguë (Beverland et al., 2012).

Une étude de cohorte a établi un lien positif entre l'exposition aux PM₁₀ et l'augmentation du risque de mortalité pour toutes causes, pour causes cardiovasculaire et aussi respiratoire avec pour cette dernière une augmentation de 1,7% du risque pour une élévation de 10 µg/m³ de la concentration des PM₁₀ (Zhou et al., 2014). Egaleme nt suite à l'exposition à long terme aux PM_{2.5}, une augmentation du risque de mortalité respiratoire a été identifiée. Une étude réalisée sur des personnes âgées (>65 ans) a montré qu'une augmentation de 10 µg/m³ de la moyenne mobile sur 12 mois des PM_{2.5} est associée à une augmentation de risque de mortalité de 24% pour causes respiratoires, de 60% par pneumonie et de 10% par BPCO (Pun et al., 2017).

La majorité des études effectuées révèle ainsi des risques plus élevés chez les personnes âgées comparativement au reste de la population. Les effets se traduisent par une augmentation de l'hospitalisation pour causes pulmonaires et cardiovasculaires et aussi par une surmortalité surtout par maladies respiratoires. En effet, peu d'études ont évalué la mortalité à long terme chez les personnes âgées. Toutefois, en raison de l'augmentation actuelle et prévue du nombre de personnes âgées, il s'avère nécessaire de mener davantage d'études épidémiologiques en se focalisant sur l'effet de l'exposition de cette population vulnérable à la pollution atmosphérique surtout à long terme et notamment aux particules atmosphériques au vu des dépassements fréquents des valeurs limites de concentration en particules en air ambiant.

Partie 3 : Système immunitaire, généralité

1. *La composition du sang total*

Le système circulatoire est un circuit fermé constitué par le cœur et un réseau de vaisseaux (artères, artérioles, capillaires, veinules et veines) permettant la circulation du sang dans tout l'organisme (Figure I.2). Le sang est un liquide biologique vital contenant des cellules et des fragments cellulaires présents dans un liquide aqueux. Il est formé de 60% de plasma et de 40% de cellules. Le plasma est la composante liquide du sang (pH 7,4) dans laquelle sont suspendus les éléments figurés. Il est constitué d'eau et de différentes substances telles que des protéines (albumines, α -, β - et γ -globulines, des fibrinogènes, des anticorps, des enzymes et des hormones), des sucres (glucose), des gaz dissous, des électrolytes et des lipides. Les éléments figurés sont toutes les cellules sanguines, qui proviennent de la moelle osseuse. Après maturation, ces cellules peuvent être regroupées en trois types principaux : les érythrocytes, les plaquettes et les leucocytes. Grâce à ses composants, le sang assure non seulement le transport de l'oxygène, des métabolites et des hormones aux cellules de l'organisme, mais aussi l'élimination des résidus métaboliques. Il contient également des cellules immunitaires impliquées dans le combat contre les infections et contient les plaquettes capables de former des caillots pour éviter la perte de sang lorsque les vaisseaux sont endommagés. Il participe également à la régulation de la température du corps, au maintien de la balance acide – base et à l'équilibre osmotique.

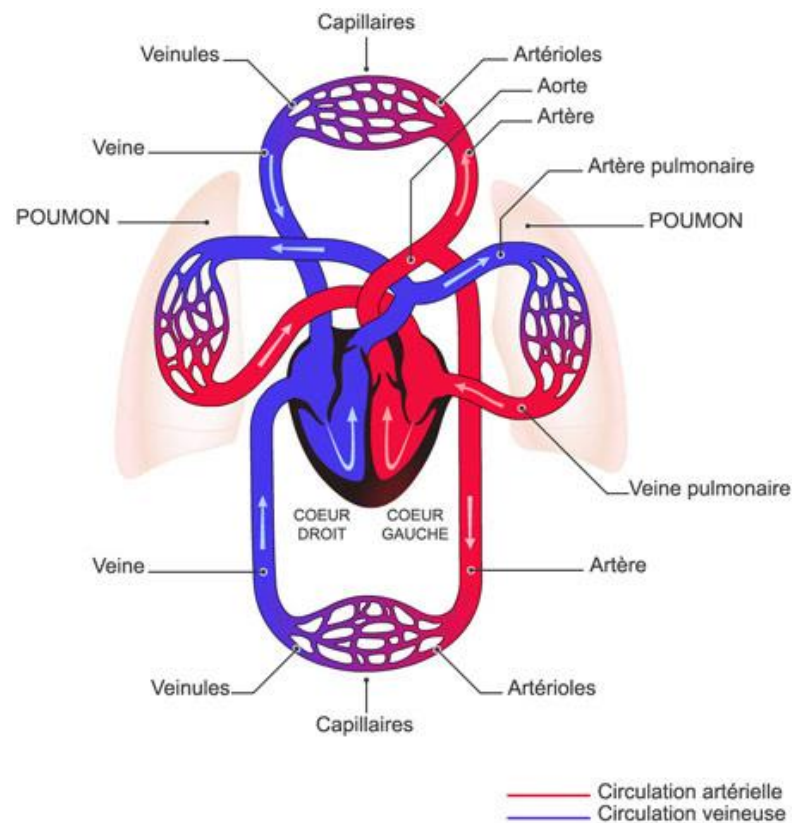


Figure I.2 : Schéma de l'appareil circulatoire humain Le sang quitte le cœur par la circulation artérielle en empruntant les artères puis les artérioles et traverse le réseau capillaire soit au niveau des poumons (circulation pulmonaire) ou au niveau d'autres organes (circulation systémique) avant de retourner vers le cœur via les veinules et les veines. Dans la circulation pulmonaire, les artères partent du ventricule droit et ramènent aux alvéoles le sang carboné (bleu) pour le réoxygéner et éliminer l'excès de CO_2 . Le sang oxygéné (rouge) est ramené vers l'oreillette gauche par les veines pulmonaires. Dans la circulation systémique, les artères partant du ventricule gauche transportent le sang oxygéné vers les différents organes et les veines transportent le sang carboné vers l'oreillette droite (Henkel, 2017).

Les cellules sanguines n'ont pas toutes la même densité. La réalisation d'une centrifugation d'un échantillon de sang total permet de séparer les différents constituants du sang. La vitesse de centrifugation permet de récupérer les différents cellules et composés sanguins (Figure I.3).

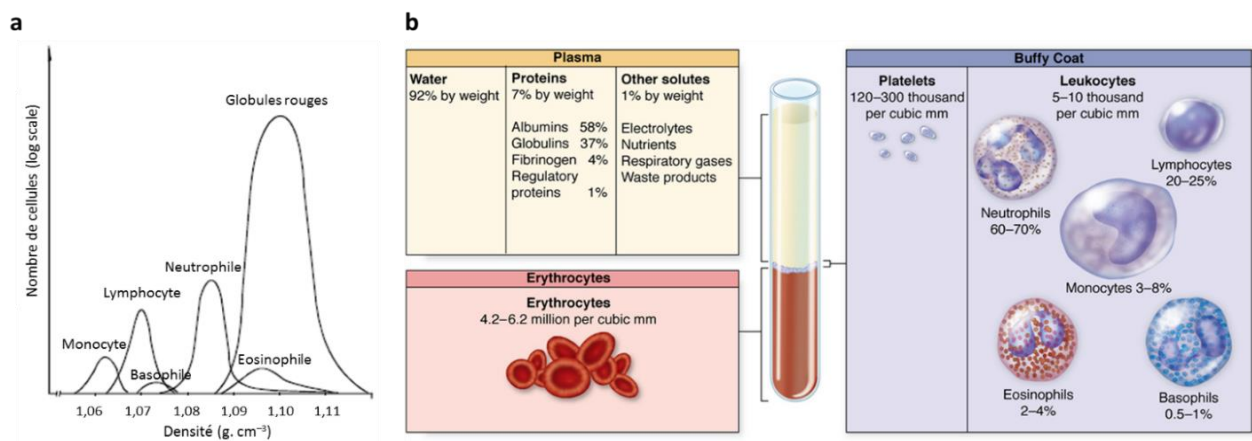


Figure 1.3 : Composition du sang total (a) Les densités des différents cellules sanguines (Bøyum et al., 1991). (b) Les différents constituants du sang total retrouvés après centrifugation (Mescher, 2009).

Les globules rouges, ou érythrocytes, constituent le type le plus abondant de cellules sanguines avec 4-6 millions de cellules par microlitre de sang. Ces cellules ont un diamètre de 7,5 μm , une épaisseur de 2,6 μm sur le rebord et de 0,75 μm au centre avec un cytoplasme riche en hémoglobine pour assurer le transport d'oxygène. L'absence de noyau et la forme biconcave de ces cellules permettent une diffusion d'oxygène plus importante à travers leur surface. Dans les conditions normales, ces cellules ne quittent jamais le système circulatoire.

Les plaquettes ou thrombocytes sont originaires de la fragmentation de grandes cellules, les réticulocytes, contenues dans la moelle osseuse. Elles jouent un rôle important dans la coagulation sanguine en transformant les fibrinogènes en structures fibreuses de fibrine qui piègent les globules rouges et des plaquettes pour former un caillot de sang, un thrombus, obturant ainsi le vaisseau sanguin.

Les globules blancs, ou leucocytes, constituent les cellules du système immunitaire. C'est un groupe hétérogène de cellules nucléées de différentes tailles et de différentes formes :

- Les polynucléaires : il s'agit des cellules au noyau multilobé et comprenant notamment les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles.
- Les mononucléées : qui comprennent deux types de cellules, les monocytes et les lymphocytes.

Les lymphocytes constituent une famille de leucocytes à noyau sphérique divisée en trois groupes fonctionnels selon leurs marqueurs de surface. On trouve les lymphocytes T (L_T), les lymphocytes B (L_B) et les Natural Killer (NK).

Le Tableau I.4 présente les caractéristiques des différents types de cellules immunitaires ainsi que leur rôle, leur proportion et leur nombre.

Tableau I.4 : Morphologie, rôle, pourcentage et nombre des constituants du sang (HAS, 1997; Mescher, 2009). D : diamètre de la cellule ; GB : Globule Blanc.

TYPE CELLULAIRE	MORPHOLOGIE	ROLE	% DANS LE SANG	NOMBRE 10^6 /ML DE SANG
Erythrocytes	D = 7,5 μ m Anucléés	Transport des gaz respiratoires	40 – 45%	4000 – 5800
Plaquettes	D = 2-4 μ m Fragments cellulaires anucléés	Déclenchement de la coagulation	1%	150 - 400
Leucocytes	Groupe hétérogène de cellules nucléées	Cellules du système immunitaire		4,0 – 11
Les cellules mononucléées				
Lymphocytes	D = 9-12 μ m Noyau sphérique	Réponses immunitaires spécifiques	20 - 40% des GB	1,5 - 4
Monocytes	D = 12-20 μ m Noyau allongé réniforme ou serpentiforme	Précurseurs des cellules du système de phagocytose des cellules mononucléées	2 - 8% des GB	0,1 - 1
Les cellules polynucléaires				
Neutrophiles	D = 12-15 μ m Noyau segmenté (2 à 5 lobes)	Réponse immunitaire innée / non spécifique	50 - 70% des GB	1,7 – 6,0
Basophiles	D = 12-15 μ m Noyau polylobé totalement recouvert de volumineuses granulations	Sécrétion d'histamine et d'héparine en réponse à des allergies ou des infections	0,5 - 1% des GB	0,02 - 0,11
Eosinophiles	D = 12-15 μ m Noyau souvent bilobé	Allergies et infections parasitaires	2 – 4% des GB	0,04 - 0,4

2. Le système immunitaire

Le système immunitaire dispose de deux types de défense. L'immunité « innée » ou « non adaptative » constitue une réponse proinflammatoire, rapide et non spécifique déclenchée par les cellules de l'immunité innée qui sont les neutrophiles, les macrophages, les monocytes, les cellules dendritiques et les Natural killers, suite à la rencontre avec l'agent pathogène. L'inflammation générée par ces cellules est importante non seulement pour la lutte contre l'infection mais aussi pour la prolifération et la différenciation des cellules de l'immunité « adaptative ». Cette dernière, également nommée immunité « acquise », est une réponse spécifique plus tardive, créée suite à la rencontre entre les cellules de l'immunité adaptative, les lymphocytes T et B, et des Cellules Présentatrices de l'Antigène (CPA) (Pennock et al., 2013). Cette réponse adaptative peut être classée en réponse humorale, dans ce cas elle est accomplie par les lymphocytes B, ou cellulaire médiée par les lymphocytes T qui réagissent en éliminant les cellules infectées ou en sécrétant des cytokines qui agissent sur d'autres cellules immunitaires.

2.1. Production et maturation des lymphocytes

Toutes les cellules sanguines proviennent d'un seul type de cellule souche, la cellule souche hématopoïétique (CSH), située au sein de la moelle osseuse. L'ensemble des étapes de production des cellules sanguines à partir de cette cellule souche est appelée l'hématopoïèse.

La prolifération et la différenciation des CSH aboutissent à la formation de deux lignées principales de cellules sanguines, la lignée myéloïde à l'origine des érythrocytes, des monocytes, des granulocytes et des mégacaryocytes (plaquettes) et la lignée lymphoïde qui donnera les lymphocytes et les cellules NK à l'issue de la lymphopoïèse.

Durant la première phase de la lymphopoïèse au niveau de la moelle osseuse, la CSH se différencie en progéniteurs lymphoïdes (progéniteurs T et progéniteurs B) qui à leur tour donnent les précurseurs « lymphoblastes » (Figure I.4). Ces derniers subissent 2 à 3 mitoses

successives formant des « prolymphocytes » n'ayant à leur surface aucun antigène spécifique pour les lymphocytes T ou B. La différenciation de ces précurseurs en L_T et L_B se déroule dans deux organes lymphoïdes primaires différents.

Pour la production des L_B et des NK, la différenciation des prolymphocytes se déroule au sein de la moelle osseuse. Les L_B et les NK acquièrent les marqueurs de surface spécifiques pour leurs lignées. Suite à leur maturation, les L_B et NK quittent la moelle osseuse vers les organes lymphoïdes secondaires.

Concernant les L_T , les prolymphocytes quittent la moelle osseuse et se dirigent via la circulation sanguine vers le thymus. Appelées « thymocytes », ces cellules ne présentent à leur surface ni le récepteur T Cell Receptor (TCR) ni les marqueurs CD4 et CD8, elles sont alors classées comme double négatives ($CD4^- CD8^-$). Les thymocytes sont localisés au niveau du cortex du thymus où ils subissent une intense prolifération, puis une différenciation accompagnée de l'acquisition du TCR à la surface membranaire par réarrangement des gènes codant pour ce récepteur.

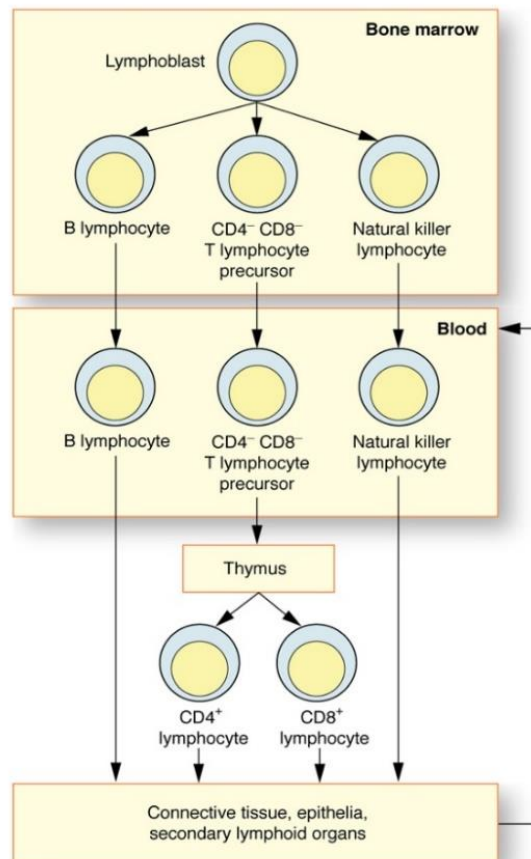


Figure I.4 : Les étapes de la lymphopoïèse. La différenciation des précurseurs lymphoïdes en L_T , L_B ou NK se déroule dans deux organes lymphoïdes différents. Au niveau de la moelle osseuse, les prolymphocytes se différencient en L_B et NK. Suite à leurs maturations, les L_B et NK quittent la moelle osseuse vers les organes lymphoïdes secondaires. Quant aux L_T , les prolymphocytes résidants au niveau de la moelle osseuse, passent vers thymus via la circulation sanguine. Au sein du thymus, ces précurseurs prolifèrent et se différencient avant de passer l'étape d'éducation thymique (sélections positive et négative). Les L_T obtenus sont des L_T naïfs CD4⁺ ou CD8⁺ capables de passer vers les organes lymphoïdes secondaires (Mescher, 2009).

Par la suite, ces thymocytes entrent dans la phase d'éducation thymique, un processus de contrôle qualité rigoureux composé d'une étape de sélection positive et d'une sélection négative.

La sélection positive consiste à sélectionner les TCR capables de reconnaître un antigène présenté par une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) classe I ou II (voir la partie 2.2) de l'individu présente à la surface de cellules telles que les cellules corticales épithéliales thymiques, les macrophages ou les cellules dendritiques. Tous les

thymocytes ayant des TCR incapables de reconnaître l'antigène sont considérés comme des cellules non fonctionnelles et subissent alors une apoptose pour être éliminées ultérieurement par les macrophages locaux. Cette sélection peut éliminer jusqu'à 80 % des thymocytes. Suite à cette étape, les cellules perdent un des deux marqueurs CD4 ou CD8 et sont classées comme simple positives, le CD4 étant sélectionné via le CMH II et le CD8 via le CMH I.

La deuxième phase de l'éducation thymique est une sélection négative pour éliminer les TCR ayant une forte affinité pour les antigènes du soi afin que ces thymocytes ne causent des réponses auto-immunes dommageables.

Seulement 2 à 3 % des thymocytes passent les 2 types de sélection et survivent pour migrer jusqu'à la médulla du thymus (Mescher, 2009). Les cellules résultantes sont des L_T naïfs capables de passer dans la circulation sanguine via les parois des veines de la médulla pour être distribués dans l'organisme mais incapables de produire une réponse pouvant assurer une protection immunitaire. Une activation de ces L_T est nécessaire pour garantir une réponse immunitaire (Pennock et al., 2013).

2.2. *Activation des L_T*

Durant le développement dans le thymus, les L_T expriment sur leurs membranes cellulaires le récepteur T Cell Receptor (TCR) formé de deux chaînes α et β unies par un pont disulfure (Figure I.5). Associé à la molécule CD3, ce récepteur forme le complexe TCR/CD3 qui assure la transduction d'un signal d'activation dans les L_T .

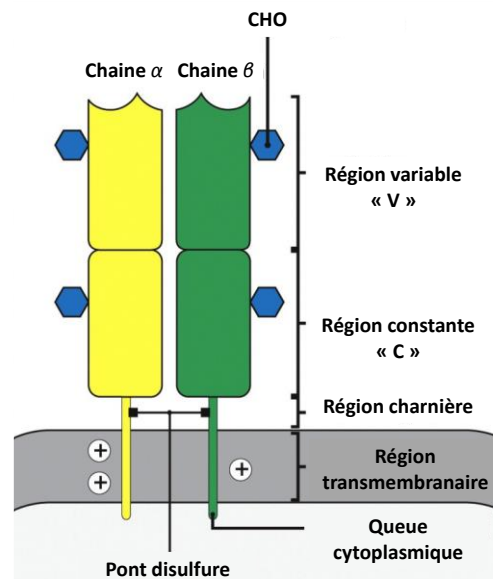


Figure I.5 : Structure du récepteur hétérodimérique TCR formé de deux polypeptides transmembranaires α et β . Chaque chaîne possède une région cytoplasmique permettant de transduire un signal d'activation à la cellule. Chaque chaîne dispose de deux domaines glycosylés : un domaine constant et un domaine variable qui détermine la spécificité pour l'antigène. Une région charnière connecte les domaines à la partie transmembranaire et contient des cystéines permettant la formation du pont disulfure entre les deux chaînes (Murphy, 2011).

Suite à la formation du TCR, le L_T libéré du thymus est un L_T naïf capable de migrer dans les organes lymphoïdes secondaires et dans la circulation mais incapable de produire une réponse immunitaire. Une étape d'activation du L_T naïf est nécessaire autrement le L_T naïf meurt par négligence. Cette activation s'initie suite à l'interaction entre le TCR et la CPA, porteuse de l'épitope sous forme de peptide lié par une liaison non covalente à des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Ces molécules sont des protéines membranaires nommées classe I et classe II. Les CMH de classe I forment des complexes avec les peptides issus de la dégradation de protéines endogènes tandis que les CMH de classe II présentent aux L_T des antigènes exogènes internalisés dans la cellule par endocytose, dégradés puis exposés au niveau de la membrane cellulaire sous forme de complexe avec le CMH. Chaque TCR est associé avec un corécepteur (CD4 ou CD8 en fonction du type des L_T) qui se fixe également au CMH (CMH de classe I pour les CD8 et de classe II pour les CD4) pour stabiliser l'interaction entre le L_T et la CPA (Figure I.6). De même, un signal de co-stimulation

est créé lors de la liaison entre des molécules co-stimulatrices CD80 et CD86 sécrétées par la CPA et le récepteur CD28 du L_T .

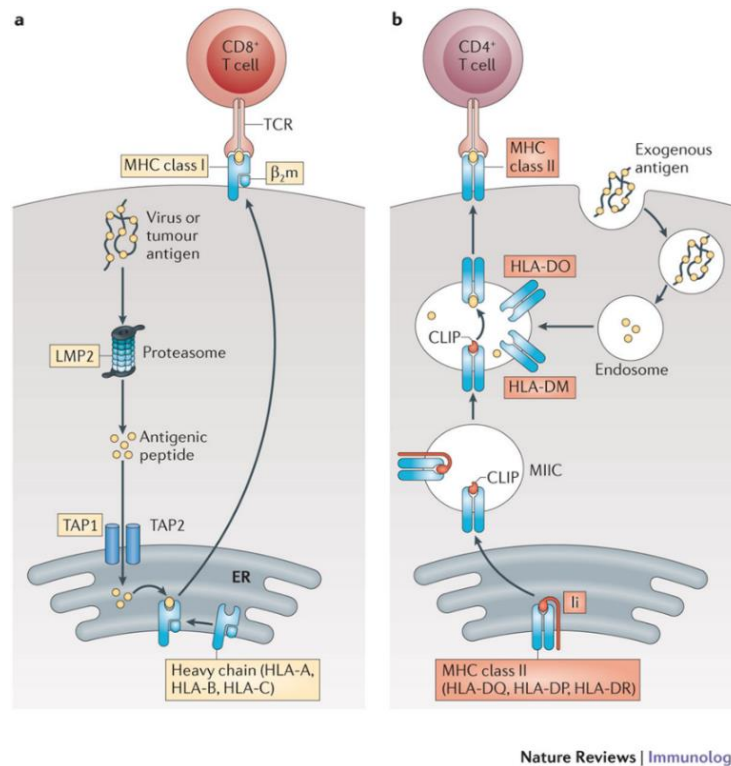


Figure 1.6 : Stabilisation de l'interaction L_T /CPA par les corécepteurs CD4 CD8 fixés aux CMH. (a) Les L_T CD8 reconnaissent des peptides issus de la transformation des antigènes intracellulaires par l'immunoprotéasome et transportés dans le réticulum endoplasmique (ER), où ils sont chargés dans la cavité du complexe MHC de classe I. (b) Les L_T CD4 reconnaissent des peptides issus de la dégradation de protéines exogènes par les enzymes endolysosomales et présentés par les molécules CMH de classe II (Kobayashi and van den Elsen, 2012).

La présence uniquement d'un des deux facteurs, le complexe TCR/peptide/CPA ou le signal de co-stimulation, ne cause pas d'activation mais une anergie des L_T . L'expression de protéine tyrosine phosphatase CD45 est également essentielle pour l'activation des L_T via le TCR. Il s'agit d'une famille de glycoprotéines transmembranaires de haut poids moléculaire (180 et 220 KDa) exprimée au niveau de la membrane cellulaire de toutes les cellules hématopoïétiques en occupant 10% de la surface membranaire. Chez les $CD4^+$ et les $CD8^+$, le domaine extracellulaire du CD45 est exprimé sous différentes isoformes (Figure 1.7). L'isoforme exprimée dépend de la sous population de lymphocytes ainsi que du stade de

stimulation et d'activation. Lorsque les L_T sont au repos, c.à.d. des L_T naïfs, la forme la plus longue de la protéine est exprimée comportant la totalité des 33 exons. Ces lymphocytes expriment alors l'isoforme CD45RA. Suite à l'activation, les ARNm du CD45 sont épissés alternativement et les trois exons consécutifs 4, 5, 6 sont excisés. La forme de CD45 ainsi produite est donc plus courte et ne peut pas jouer son rôle d'activateur. Le passage à l'isoforme à chaîne courte suite à l'activation réduit l'activité phosphatase du CD45, ce qui empêche les L_T de recevoir un signal d'activation trop longtemps et donc de déclencher une réponse immunitaire disproportionnée (Altin and Sloan, 1997).

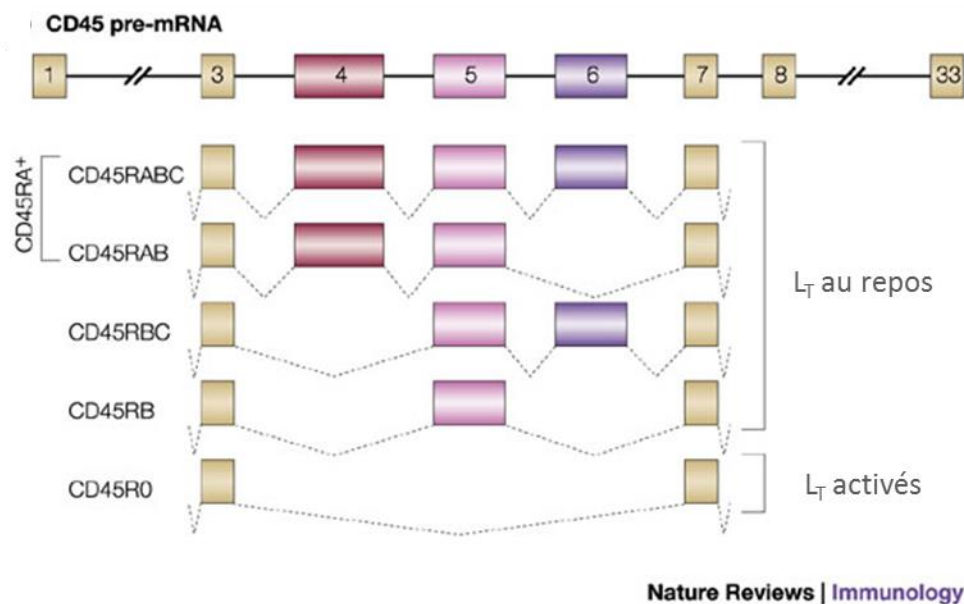


Figure I.7 : Les différentes isoformes du CD45 exprimées selon le stade d'activation des L_T (Lynch, 2004).

En réponse aux interactions, la membrane des L_T et celle de la CPA subissent un réarrangement médié par l'actine permettant la formation d'une zone élargie de contact entre les deux cellules optimisant alors la signalisation, la synapse immunologique (Figure I.8). La formation du complexe TCR/peptide/CMH cause la phosphorylation des protéines membranaires CD3 par les kinases Src (Lck et Fyn) ce qui active les protéines kinases ZAP-70. Ces dernières phosphorylent LAT (Lifer for Activation of T cells) qui rassemblent d'autres protéines importantes dans la signalisation de l'activation ce qui induit la production et la

sécrétion de l'interleukine 2 IL-2, le stimulateur de la prolifération des L_T (Mescher, 2009; Pennock et al., 2013).

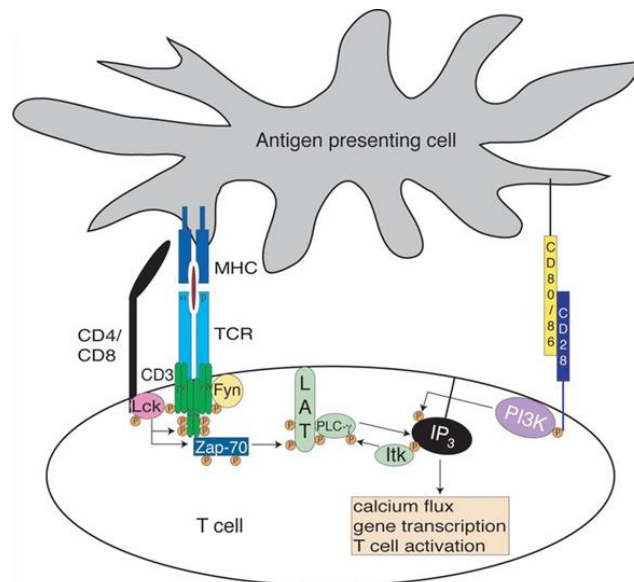


Figure I.8 : Synapse immunologique, modèle simplifié de l'activation d'un L_T suite à la rencontre d'une CPA (Pennock et al., 2013).

2.3. Différenciation des L_T

Suite à l'activation, les L_T entrent en division cellulaire et passent alors de L_T naïfs (T_N) à L_T effecteurs (T_{EFF}). Toutefois, l'engagement du TCR des L_T naïfs n'est pas suffisant pour la détermination du destin des L_T effecteurs produits. Les L_T $CD4^+$ auxiliaires effecteurs « Th » (T helper) sont tous le résultat de la différenciation des L_T naïfs. Toutefois leur voie de prolifération est déterminée par les cytokines présentes dans le milieu connues comme « cytokines inductrices » qui déclenchent un mécanisme de programmation génétique, impliquant des facteurs de transcription et aboutissant à un profil déterminé de L_T . Parmi les profils de L_T , on cite les « Th1 », les « Th2 », les « Th17 » et les « Treg ». Chacun de ces profils est caractérisé par des « cytokines sécrétées » spécifiques et par une réponse immunitaire appropriée à l'élimination du pathogène (Pennock et al., 2013). Les L_T auxiliaires peuvent alors être classés en différentes sous populations présentant une différence au niveau des

cytokines sécrétées et une hétérogénéité fonctionnelle. Le Tableau I.5 rappelle les différents profils de L_T avec leurs cytokines inductrices et sécrétées.

Les cytokines sont des glycoprotéines de faible poids moléculaire produites par divers types cellulaires notamment les L_T auxiliaires et les monocytes et capables d'agir sur différents types de cellules permettant la communication entre des cellules de différents systèmes. Après leurs fixations sur leur récepteur spécifique au niveau de la membrane cellulaire, les cytokines produisent leurs effets spécifiques. Les cytokines sont impliquées dans plusieurs mécanismes biologiques tels que les réponses cellulaires et humorales, l'induction des réponses inflammatoires, le contrôle de la prolifération et la différenciation cellulaire ainsi que la régulation de l'hématopoïèse (Sivangala and Sumanlatha, 2015). La réponse au niveau de la cellule cible se traduit par la synthèse de nouveaux ARN messagers et par la suite de nouvelles protéines induisant alors une réponse biologique spécifique (Zhang and An, 2007).

La différenciation des cellules Th et la production de cytokines nécessite des facteurs de transcription ; des protéines impliquées dans la transcription de l'ADN en ARN grâce à leur domaine de liaison à l'ADN. Ces facteurs peuvent initier la transcription en se liant à la séquence promotrice de l'ADN, formant par la suite le complexe d'initiation de transcription. Ils sont également régulateurs de la transcription quand ils se lient à la séquence amplificatrice de l'ADN pour stimuler ou réprimer la transcription du gène cible (Nature Education, 2014). La détermination du destin de chaque lignée nécessite au moins deux types de facteurs de transcription : les régulateurs majeurs et le transducteur de signal et activateur de la transcription des protéines (STAT). L'activité des régulateurs majeurs est contrôlée par leur expression, alors que les protéines STAT sont activées par des cytokines via des modifications post-transcriptionnelles comme la phosphorylation. Certaines protéines STAT sont responsables de l'induction de l'expression des régulateurs majeurs. En outre, les mêmes STAT et les régulateurs majeurs souvent collaborent dans la régulation de la production de cytokines en agissant directement sur les gènes de cytokines.

La compréhension de l'existence de plusieurs profils de $CD4^+$ différenciés a eu lieu en analysant des L_T $CD4^+$ de souris. Les premiers profils de L_T effecteurs auxiliaires ont été identifiés et nommés « Th1 » et « Th2 » par Mosmann et Coffman en 1986. Les L_T de ces deux

groupes se différencient par leurs cytokines sécrétées ainsi que leurs molécules de surface (Mosmann et al., 1986). Par la suite plusieurs chercheurs ont confirmé l'existence de ces deux profils chez différentes espèces y compris chez l'homme (Zhu et al., 2010).

Le profil Th1 : L'interleukine 12 (IL-12) et l'Interféron-gamma (IFN- γ) sont des cytokines essentielles pour l'induction du profil Th1 (Figure I.9). L'IFN- γ et l'IL-12 présents dans le milieu se lient sur leurs récepteurs pour phosphoryler STAT1 et STAT4 respectivement, une étape importante pour l'induction du facteur de transcription majeur T-bet qui par la suite agit sur les régions promotrices des gènes et induit la transcription de l'IFN- γ et du récepteur IL-12 beta 2 (IL-12R β 2) formant alors une boucle de rétrocontrôle positif. La présence de l'interleukine 2 (IL-2) dans le milieu joue un rôle dans la polarisation vers un profil Th1. L'IL-2 est impliqué dans l'étape d'initiation de ce profil en induisant l'expression de la chaîne IL-12R β 2 ce qui augmente la réactivité de la cellule à l'IL-12. Il stabilise également le profil Th1 en régulant positivement l'expression du gène *Tbx21*, codant la protéine T-bet. Les CD4⁺ Th1 activés sécrètent majoritairement de l'IFN- γ , du Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α) et de l'IL-2, des cytokines qui activent les cellules présentes dans le milieu tel que les macrophages et les lymphocytes T cytotoxiques, les CD8⁺. Les lymphocytes Th1 sont connus pour leur activité pro-inflammatoire et leur capacité à induire les réponses immunitaires cytotoxiques les plus efficaces contre les pathogènes intracellulaires comme les virus et les bactéries (Li et al., 2014; Olson et al., 2013; Pennock et al., 2013).

Le profil Th2 : Un profil différent de différenciation de L_T nommé Th2 est déterminé par la présence dans le milieu des cytokines inductrices IL-4 et IL-2. Cette dernière induit STAT5 qui à son tour induit l'expression du récepteur IL-4R α augmentant ainsi la réactivité de la cellule à l'IL-4 présent. L'IL-4 est un régulateur positif de STAT6 induisant sa phosphorylation ce qui active le facteur de transcription majeur de ce profil : GATA3. Etant donné que son site de liaison se trouve sur les régions promotrices des gènes codants pour l'IL-5 et l'IL-13, GATA3 est responsable de la sécrétion des cytokines IL-4, IL-5 et IL-13. Toutefois, GATA3 seul n'est pas suffisant pour induire la sécrétion d'IL-4, l'activité de STAT5 est nécessaire. Les cytokines sécrétées par les Th2 favorisent l'immunité humorale en soutenant la différenciation des L_B pour la production des anticorps contre les parasites extracellulaires. Ces cytokines activent

également les cellules voisines tels que les basophiles, les éosinophiles et les mastocytes spécialisées dans l'élimination des parasites (Li et al., 2014a; Olson et al., 2013; Pennock et al., 2013; Zhu and Paul, 2008).

Plus récemment d'autres profils de sécrétion de L_T $CD4^+$ ont été décrits.

Le profil Th17 : La différenciation des L_T en Th17 se déroule en trois étapes. Une « différenciation » est déclenchée par la présence dans le milieu du facteur de croissance TGF beta ($TGF-\beta$), de l'IL-6 ou de l'IL-23 qui causent la phosphorylation de STAT3 et par la suite l'activation du facteur majeur de transcription, le récepteur de l'acide rétinoïque gamma T (ROR γ t). Cette étape est suivie par une « amplification » médiée par l'IL-21 en vue de sa capacité de remplacer l'IL-6 dans l'induction de ROR γ t. La troisième étape est une étape de « stabilisation » due à la liaison de la cytokine IL-23 sur son récepteur IL-23R présent au niveau des Th17 en différenciation ce qui active davantage STAT3, stabilisant le phénotype Th17. Suite à cette différenciation, les Th17 produisent les cytokines IL-17A, IL-17F et IL-22 et sont impliquées dans le contrôle des infections bactériennes extracellulaires et fongiques. L'IL-17A produit est une cytokine pro-inflammatoire capable d'induire l'expression de $TNF-\alpha$, IL-1 β et de la protéine chimioattractante monocyttaire de type 1 (MCP-1). L'IL-17 active également les cellules de l'immunité innée notamment les neutrophiles pour agir au site d'invasion bactérienne ou fongique (Li et al., 2014a; Olson et al., 2013; Zhu and Paul, 2008).

Le profil Treg : Les L_T ayant ce profil constituent 10% des $CD4^+$ naïfs présents chez l'homme. Les Treg peuvent être groupés en Treg naturels (nTreg), générés dans le thymus durant l'ontogenèse, et les Treg induits (iTreg) différenciés du lymphocyte $CD4^+$ naïf sous l'influence de facteurs environnementaux tels que $TGF-\beta$ et l'acide rétinoïque. $TGF-\beta$ active Smad3 qui favorise l'expression du forkhead box P3 (FOXP3), le facteur de transcription des Treg, indispensable pour l'engagement, la différenciation, l'expansion et le maintien de l'activité immunosuppressive de ces cellules. STAT5, activé par l'IL-2 peut contribuer à l'induction de FOXP3 en se liant sur son promoteur induisant son expression. Les Treg forment une lignée régulatrice des L_T produite pour maintenir l'homéostasie et la tolérance immunitaire par suppression des cellules effectrice grâce à un contact cellulaire ou via les cytokines sécrétées. Les Treg peuvent sécréter l'IL-10, une cytokine suppressive qui réduit la

prolifération des L_T et la production des cytokines en bloquant CD2, CD28 et la signalisation des co-stimulateurs de l'induction des L_T . Ces cellules sont capables également de produire le TGF- β qui réprime l'expression génique chez les L_T (Jin et al., 2012; Olson et al., 2013; Zhu and Paul, 2008).

Tableau I.5 : Les profils lymphocytaires avec leurs cytokines inductrices et sécrétées.

PROFIL LYMPHOCYTAIRE	CYTOKINES INDUCTRICES	CYTOKINES SECRETEES
Th1	IL-12, IFN- γ	IFN- γ , TNF- α , IL-2
Th2	IL-4	IL-4, IL-5, IL-13
Th17	TGF- β , IL-6, IL-21, IL-23	IL-17A, IL-17F, IL-22
Treg	TGF- β	IL-10

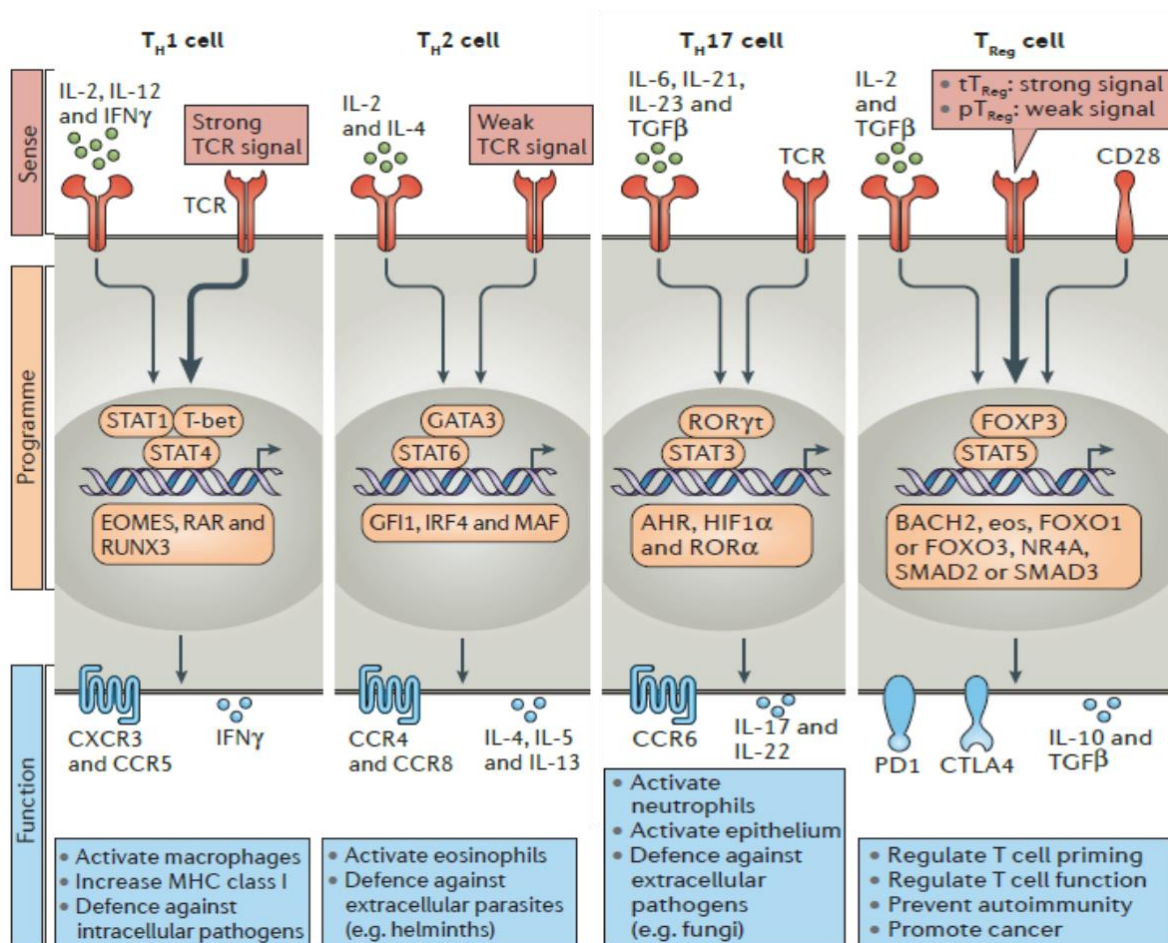


Figure I.9 : Les différents profils de différenciation des CD4⁺ (DuPage and Bluestone, 2016).

La différenciation des L_T en l'un des profils décrits n'est pas un phénomène si simple. Au cours de la différenciation du L_T, plusieurs rétrocontrôles positifs sont exercés par les cytokines dans le but de dévier cette différenciation vers un profil précis. Cela est accompagné par des répressions transcriptionnelles des facteurs de transcription et des cytokines causant la suppression des autres profils. D'autres facteurs de transcription sont également impliqués dans l'étape de « fine-tuning » de la différenciation.

Une fois différenciés, les L_T CD4⁺ auxiliaires effecteurs coordonnent la réponse immunitaire en sécrétant des cytokines qui recrutent et activent des cellules de l'immunité innée et favorisent l'activation des L_T CD8⁺ (cytotoxiques) et des L_B spécifiques de l'antigène. Les L_T CD8⁺ sont capables de sécréter un large panel de cytokines et sont classés en cellules

Tc1 et Tc2, toutefois leur fonction principale se concentre sur l'élimination des cellules infectées grâce à des activités cytotoxiques notamment par la libération de granules cytotoxiques (perforine et granzymes) dans le cytoplasme de la cellule infectée. Suite à la réponse immunitaire exercée, les cellules effectrices ($CD4^+$ et $CD8^+$) disparaissent. Toutefois, certains lymphocytes sont mis en réserve par le système immunitaire et forment alors les L_T mémoires (T_M) caractérisés par une longue durée de vie et par la présence à leurs surfaces de l'isoforme CD45RO. On cite deux catégories de T_M , les « L_T mémoire centraux » (T_{CM}) localisés dans les organes lymphoïdes secondaires et les « L_T mémoire effecteurs » (T_{EM}) situés au niveau des tissus récemment infectés (Golubovskaya and Wu, 2016). Suite à un second contact avec l'antigène, les cellules $CD8^+$, T_{EM} se transforment immédiatement en T_{EFF} capables d'exercer leur activité cytotoxique tandis que les T_{CM} prolifèrent et se développent avant d'acquies la fonction effectrice. Au niveau des $CD4^+$, suite à une stimulation, les T_{EM} produisent les cytokines IFN- γ et IL-4 quant aux T_{CM} , l'IL-2 est la cytokine majoritairement sécrétée (Broere et al., 2011).

En passant du statut T_N à T_{EFF} un changement de profil génétique est activé, notamment par l'augmentation de la fonction effectrice de la cellule, assurée par la surexpression progressive des gènes associés aux cellules effectrices tels que les gènes codants pour les molécules cytotoxiques, ou pour les régulateurs de la différenciation et de la senescence des effecteurs. Cela est accompagné d'une diminution de l'expression des gènes liés aux T_N . Egalement un changement au niveau des marqueurs de surface permet de séparer les différents statuts cellulaires (T_N , T_{EFF} , T_{CM} et T_{EM}). Les T_N sont bien connus comme ayant le phénotype $CD3^+$, $CD45RA^+$, $CD45RO^-$, $CD62L^+$ (L-selectin), $CCR7^+$ (CC Chemokine receptor 7). Ces marqueurs changent pour devenir $CD3^+$, $CD45RA^-$, $CD45RO^+$, $CD62L^-$, $CCR7^-$ pour les T_{EFF} (Broere et al., 2011; Golubovskaya and Wu, 2016).

Partie 4 : Mécanismes cellulaires de toxicité des particules atmosphériques

De nombreux mécanismes d'action et voies de signalisation sont activés par les substances toxiques. Dans cette partie d'analyse bibliographique, nous présenterons certains mécanismes cellulaires de toxicité pouvant être induits par les particules atmosphériques et qui pourraient notamment participer à leur potentiel cancérigène. Nous aborderons en premier lieu les mécanismes non spécifiques au système immunitaire tels que les processus d'activation métabolique, de stress oxydant, de génotoxicité et d'altérations épigénétiques. Ensuite, nous décrirons les mécanismes affectant directement les cellules immunitaires notamment l'inflammation. Enfin, quelques interactions potentielles entre ces différents mécanismes de toxicité seront évoquées.

1. Mécanismes non spécifiques au système immunitaire

1.1. Activation métabolique

1.1.1. Description générale

La métabolisation fait référence à l'ensemble des réactions chimiques qui se produisent au sein d'une cellule vivante. Suite au contact avec un xénobiotique, une série de réactions chimiques réalisée par les Enzymes de Métabolisation des Xénobiotiques (EMX), se déclenche causant sa transformation en un ou plusieurs composés, dits métabolites. Ce processus de conversion métabolique est appelée la biotransformation. Elle a pour objectif d'augmenter l'hydrophilie des composés afin de permettre leur élimination par les liquides biologiques tels que les urines, la bile, la salive ou la sueur. La majorité des réactions chimiques s'effectuent au niveau des cellules hépatiques toutefois, la biotransformation a lieu aussi dans plusieurs autres types cellulaires. Nous pouvons distinguer trois phases dans la métabolisation des xénobiotiques (Figure I.10).

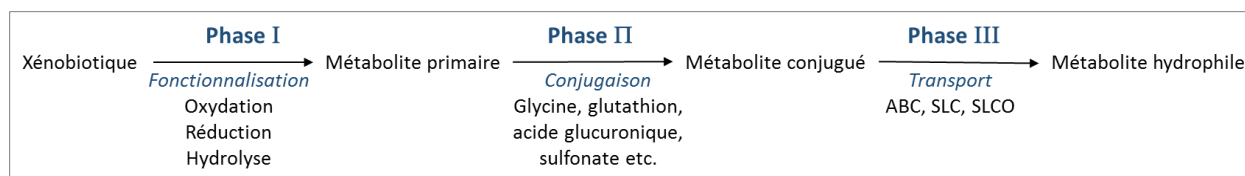


Figure I.10 : Les trois phases de la biotransformation des xénobiotiques.

Phase I fonctionnalisation : Introduction d'un ou plusieurs groupements fonctionnels polaires (souvent OH) sur le xénobiotique initial par réactions d'oxydation, de réduction ou d'hydrolyse. Le système NADPH-cytochrome P450 (CYP) est le système le plus important parmi les enzymes impliquées dans les réactions d'oxydation de la phase I. Il regroupe la Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (NADPH) comme source d'énergie et les mono-oxygénases cytochromes P450, des enzymes à noyau hème (hémoprotéines) localisées dans le réticulum endoplasmique lisse et capables de catalyser de nombreuses substances organiques par des mécanismes variés. Les époxydes hydrolases sont également des enzymes de cette phase, localisées dans le cytoplasme et catalysant la conversion des groupes époxydes formés par les cytochromes en dihydrodiols. La fonctionnalisation du xénobiotique peut également être assurée par la NADPH-Quinone Oxydo-réductase 1 (NQO1) qui transforme les quinones en hydroquinones.

Phase II conjugaison : Conjugaison des produits de la phase I du métabolisme et d'autres xénobiotiques possédant des groupes fonctionnels avec un groupement polaire grâce à des enzymes de conjugaison telles que le glutathion (GSH) par les Glutathion-S-Transférases (GST), l'acide glucuronique par les UDP-Glucuronosyl-Transférases (UGT), ou encore un groupement sulfonate par les SULfo-Transférases (SULT). La conjugaison du xénobiotique rend ce dernier plus hydrosoluble, moins toxique et plus facilement éliminé. Toutefois Il faut noter que la biotransformation des xénobiotiques peut se révéler parfois néfaste en transformant une substance non toxique en métabolite(s) plus réactif(s) que la molécule initiale. De plus, l'induction génique des EMX de la phase 2 est généralement plus faible que celle des EMX de la phase 1.

Phase III transport : Transport, au travers des membranes biologiques, des xénobiotiques conjugués via des protéines transporteuses telles que celles des familles des

transporteurs ATP Binding Cassette (ABC), SoLute Carrier (SLC), ou SoLute Carrier Organic anion (SLCO). Ces produits sont alors excrétés des cellules pour être éliminer par différentes voies (p. ex. urinaire, biliaire).

Différents composés organiques tels que les HAP, COV, PCDD/F et PCB sont des substrats inducteurs des enzymes de la phase I et II. Toutefois, les PCDD/F sont résistants à la biodégradation et s'accumulent dans le foie et les tissus adipeux. Au cours de la transformation des xénobiotiques et surtout suite à la phase I, un phénomène de bioactivation peut avoir lieu. Ce type de phénomène a été décrit pour différents types de composés, dont des HAP, des COV ou encore des PCB. Les composés oxydés formés (quinones, époxydes, aldéhydes) sont réactifs et exercent le plus souvent leur toxicité via l'apparition d'un stress oxydant, la formation d'adduits à l'ADN, ou encore la modification d'autres macromolécules cellulaires, telles que les protéines ou les lipides.

1.1.2. Métabolisation des PM_{2.5}

Différents composés organiques peuvent entrer dans la composition des particules atmosphériques, tels que des HAP, COV, PCDD/F ou encore PCB. La libération par les particules de ces composés organiques et leur biodisponibilité cellulaire peuvent induire quelques enzymes de la phase I et de la phase II du métabolisme.

1.1.2.1 Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

Parmi les différents composés appartenant à la famille des HAP, le B[a]P est souvent pris comme modèle vu son métabolisme très bien étudié. Dès sa pénétration dans le cytoplasme, le B[a]P se lie à un récepteur cytoplasmique très spécifique des HAP, l'Aryl hydrocarbon Receptor (AhR) et déclenche sa voie de signalisation. La liaison entre l'AhR et le HAP, un des ligands principaux, cause la dissociation de l'AhR des protéines avec lesquelles il forme un complexe au niveau du cytoplasme. Cette dissociation permet son entrée dans le noyau où il se lie à son partenaire de dimérisation l'Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator (ARNT) formant ainsi le complexe AhR/ARNT et induisant, via le Xenobiotic Response Element (XRE), la transcription de plusieurs gènes y compris les *CYP 1A1*, *1A2*, *1B1* et *2S1*. Ce mécanisme est régulé par l'Aryl hydrocarbon Receptor Repressor (AhRR) agissant comme répresseur de l'AhR, en entrant en compétition avec lui pour l'hétérodimérisation

avec l'ARNT et la fixation sur les XRE. Il existe 3 principales voies de métabolisation des HAP. La voie majeure implique la famille des CYP qui catalyse l'oxydation des HAP en époxydes instables rapidement hydrolysés en diols. La deuxième voie est catalysée par les CYP peroxydases et repose sur la formation d'un radical cation. L'HAP activé peut ensuite se transformer en phénol et puis en quinones. La troisième voie, catalysée par des dihydrodiols déshydrogénases, implique la formation des quinones à partir des catéchols instables par deux oxydations successives. Ces voies de métabolisation peuvent donner des métabolites réactifs tels que les quinones et le BPDE connus pour leurs effets génotoxiques (voir la partie 4, paragraphe 1.3). Les quinones peuvent être reconverties par les NQO1 en métabolites hydroxylés moins toxiques.

Les études menées sur la métabolisation des HAP entrant dans la composition des PM_{2.5} ont révélé une augmentation de l'expression de l'AhrR et des gènes codant pour les enzymes (EMX) de la phase I (CYP1A1, 1A2, 1B1, CYP2E1, CYP2F1 et NQO1) et de la phase II. Une étude a montré une augmentation du gène *CYP1A1* suite à l'exposition des cellules mononucléées du sang périphérique (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC) au B[a]P et aux HAP des particules diesel (Plé et al., 2015). Il a également été montré que l'exposition au B[a]P des L_T suite à leur activation, cause une augmentation significative de l'expression des gènes *CYP1A1*, *CYP1B1* et *AhrR* (Prigent et al., 2014). Il a été reporté récemment que les L_T primaires activés par les billes anti-CD3/CD28 possèdent les systèmes de métabolisation CYP 1A1 et 1B1 et sont alors considérés comme modèle utile pour étudier la capacité de métabolisation des HAP (Liamin et al., 2017).

1.1.2.2 Composés Organiques Volatils

L'un des composés type des COV est le benzène. Classé cancérigène de groupe 1 certain pour l'homme par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC), il est responsable de la leucémie, une hémopathie maligne de la moelle osseuse. La métabolisation des COV et notamment du benzène fait intervenir des cytochromes tels que les CYP 2E1 et 2F1. Des métabolites toxiques peuvent être formés, notamment des quinones (1,2-benzoquinone et 1,4-benzoquinone). Comme pour le cas des HAP, le NQO1 peut intervenir dans la détoxification de ces métabolites en les transformant en catéchol ou hydroquinone. La toxicité des COV est principalement due aux espèces réactives générées qui induisent un

stress oxydant et causent des dommages à l'ADN et aux macromolécules notamment en formant des adduits. Une étude a montré une augmentation de l'expression du gène *CYP2E1* dans les PBMC de travailleurs exposés à des niveaux de concentration de benzène dans l'air aussi bas que 0,1 ppm (Thomas et al., 2014).

1.1.2.3 Dioxines et Polychlorobiphényles

Cette classe regroupe des composés organiques persistants et stables dans l'environnement. De nombreux composés sont cancérogènes avérés ou soupçonnés pour l'homme. Les dioxines et quelques PCB sont capables d'interagir avec le récepteur AhR et d'affecter l'expression de nombreux gènes. La métabolisation des PCB peut former des époxydes capables de réagir avec les acides nucléiques ou les protéines et former des adduits. Elle peut également donner des quinones capables de réagir sur les sites nucléophiles des protéines ou de l'ADN. Le taux de métabolisation des PCB diminue avec l'augmentation du degré de chloration des PCB favorisant l'accumulation de ces composés dans les tissus surtout adipeux. Il a été montré qu'une exposition à la dioxine, un des ligands exogènes de l'Ahr, augmente significativement l'expression génique des CYP 1A1 et 1B1 chez les LT activés (Prigent et al., 2014).

Dans de très nombreux cas, la métabolisation des xénobiotiques protège l'organisme exposé. Cependant les enzymes impliquées dans les phases de métabolisation peuvent dans certaines circonstances permettre la mise en place de processus toxiques non seulement via la formation de métabolites toxiques tels que l'exemple classique du B[a]P mais également via la génération des Espèces Réactifs de l'Oxygène (ERO) capables d'induire un stress oxydant.

1.2. Stress oxydant

1.2.1. Description générale

Les organismes aérobies utilisent l'oxygène pour générer de l'énergie sous forme d'ATP nécessaire pour le fonctionnement de la cellule. De plus, la synthèse de nombreuses molécules est dépendante de l'oxygène. C'est le cas de la tyrosine, l'acide nicotinique, les

stéroïdes et les acides gras polyinsaturés essentiels pour la structure et les processus cellulaires. Des espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont produites au cours de ce fonctionnement cellulaire normal, essentiellement par la chaîne respiratoire mitochondriale. Ce sont des dérivés oxygénés réactifs. Certains sont des radicaux libres, possédant un électron non-apparié sur leur couche de valence tels que l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ et le radical hydroxyle $\cdot OH$, alors que d'autres sont des espèces pro-oxydantes non radicalaires, telles que le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Toutefois, la production de ces espèces peut avoir des sources exogènes comme les microorganismes, les radiations UV, certains médicaments et un grand nombre de xénobiotiques.

Depuis leur découverte dans les années 50, les ERO sont connues pour leurs réactions néfastes. Elles peuvent susciter des réponses négatives, telles que l'inhibition de la croissance, des dommages cellulaires ou la mort cellulaire. Toutefois, ces espèces se caractérisent par deux faces, elles servent également de molécules de signalisation pour réguler les processus biologiques et physiologiques (Finkel, 2011). Ce rôle entraîne des réponses positives telles que la différenciation cellulaire, la régénération cellulaire, la régulation de l'inflammation et la prévention du vieillissement (Schieber and Chandel, 2014). Selon la concentration et les conditions intracellulaires, les ERO peuvent provoquer des dommages ou agir comme molécules de signalisation redox.

La cellule dispose d'un processus hautement contrôlé pour l'élimination des ERO. Il est régulé par différents systèmes antioxydants enzymatiques (SuperOxyde Dismutase, SOD, la catalase et la Glutathion Peroxydase, GPx) et non-enzymatiques (via l'oxydation du glutathion réduit, GSH, en glutathion oxydé, GSSG) (Figure 1.11). La surproduction de ces espèces oxydantes et/ou la diminution des espèces antioxydantes ou le dysfonctionnement du système de défense causent un déséquilibre au niveau de la balance redox. Le stress oxydant est la situation de stress cellulaire où la balance oxydant/antioxydant est décalée vers un état de pro-oxydants. Le stress oxydant est une épée à double tranchant où sur un plan physiologique il est nécessaire pour le phénomène de signalisation alors que les ERO produites en excès peuvent déclencher une chaîne de réactions néfastes et causer des dommages au niveau des constituants essentiels de la cellule. Parmi les dommages on peut citer, la lésion et la dénaturation de la chaîne peptidique, la peroxydation des lipides et la lésion du brin d'ADN

ou la modification de la base conduisant potentiellement à une mutation et une mort cellulaire.

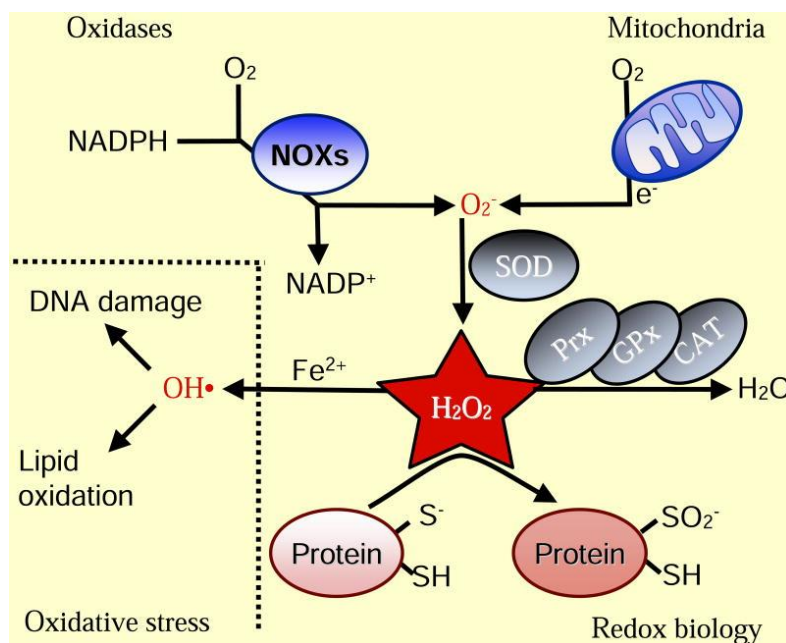


Figure I.11 : Production, élimination, effets ainsi que rôle des ERO. L'anion superoxyde est produit suite à l'oxydation de la NADPH par l'enzyme NADPH oxydase (NOX) ou par la chaîne respiratoire mitochondriale. Il est ensuite converti en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 par l'enzyme superoxyde dismutase (SOD). H_2O_2 joue un rôle de signalisation en oxydant les résidus de cystéines sur les protéines. Il peut également être converti en H_2O sous l'action des enzymes antioxydantes telles que la peroxiredoxine (Prx), la Glutathion Peroxydase (GPx) et la catalase (CAT). D'autre part, l'augmentation incontrôlée du niveau d' H_2O_2 peut conduire à la formation du radical $OH^\bullet$ par la réaction de Fenton. Ce radical est réactif envers plusieurs cibles biologiques (Schieber and Chandel, 2014).

1.2.2. Stress oxydant et $PM_{2.5}$

L'induction du stress oxydant est considérée comme un des mécanismes les plus importants déclenchés par les $PM_{2.5}$. De nombreuses études ont montré qu'une exposition aux $PM_{2.5}$ peut contribuer au stress oxydant et aux dommages cellulaires. Différents mécanismes de formation de ces ERO ont été évoqués. Le premier fait intervenir les radicaux libres persistants (Environmentally Persistent Free Radicals, EPFR) sur les $PM_{2.5}$ (Gehling et al., 2014). Ces radicaux se forment suite à la chemisorption d'un précurseur organique sur un site redox d'un métal (CuO ou Fe_2O_3), causant la réduction de ce métal via un transfert d'électron. Ce mécanisme aboutit à la formation de radicaux libres persistants. L'association de ces radicaux à la surface des $PM_{2.5}$ renforce leur stabilité, permettant ainsi leur persistance dans

l'environnement. Ces EPFR sont considérés comme source de formation des ERO, chaque radical pouvant générer $\sim 10^4$ OH $\cdot$ (Khachatryan et al., 2011). Le deuxième mécanisme implique les composés organiques occupant la surface de la particule (tels que les HAP et les COV) et qui par activation métabolique produisent des ERO (Gualtieri et al., 2012). Les métaux de transition tels que le fer, le cuivre, le manganèse ou le vanadium, entrant dans la composition des particules, sont aussi capables de produire des radicaux hydroxyles hautement réactifs via la réaction de Fenton ou en perturbant la fonction de certaines enzymes impliquées dans le système antioxydant de la cellule (Maciejczyk et al., 2010; Torres-Ramos et al., 2011). En cas d'inflammation, le stress oxydant peut également provenir de l'activation de cellules inflammatoires capables de produire des ERO (Federico et al., 2007).

Les particules fines peuvent altérer le système antioxydant et diminuer la capacité antioxydante des cellules. Les ERO générées suite à l'exposition aux PM_{2.5} sont capables de causer la translocation vers le noyau du facteur de transcription Nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (Nrf2). Vu son rôle primaire dans les mécanismes de défenses intracellulaires, cette translocation altère la transcription des enzymes antioxydantes (Deng et al., 2013a). Ainsi l'exposition aux PM_{2.5} peut affecter l'expression des enzymes antioxydantes (SOD, CAT, GPx) (Deng et al., 2013a; Kouassi et al., 2010) et causer une diminution de leur activité et de celle des enzymes de métabolisation du glutathion (Kouassi et al., 2010; Torres-Ramos et al., 2011).

Plusieurs études ont montré le lien entre l'exposition aux particules atmosphériques notamment les particules fines et la génération des ERO dans les cellules pulmonaires et les macrophages alvéolaires. Toutefois peu d'études se sont intéressées à la détection de ces espèces dans les PBMC et les lymphocytes. Suite à l'exposition des PBMC aux extraits dans des nanoparticules riches en métaux (c.à.d. Fe, Ni, Cu, Cr), une génération d'ERO notamment O₂ $\cdot^-$ a été détectée (Dwivedi et al., 2012). L'étude de Lombaert sur les métaux lourds (le carbure de tungstène, WC, et le cobalt métallique, Co) a révélé une augmentation de l'expression de *HMOX1*, impliqué dans la réponse face au stress oxydant, dans les PBMC exposées pendant 15 minutes à ces métaux par rapport aux cellules non exposées. Une cascade cellulaire a été déclenchée suite à l'exposition dont les événements peuvent contribuer à une activité carcinogénèse causée par WC-Co (Lombaert et al., 2013). Les

couleurs de Holi utilisées durant les festivals surtout en Inde sont formées de plus de 40% de PM_{10} . Dans le but d'étudier les effets causés par ces couleurs, une étude a été menée en exposant à ces colorants les PBMC isolés des échantillons sanguins prélevés de six sujets. Une génération accrue des ERO dans les granulocytes et les monocytes exposés pendant 4h aux PM_{10} a été enregistrée (Bossmann et al., 2016).

L'exposition aux $PM_{2.5}$ a été associée aux marqueurs d'oxydation de protéines, de lipides et de l'ADN, notamment la formation de 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine (8-OHdG) représentant le dommage à l'ADN le plus souvent caractérisé. Une étude épidémiologique a révélé une association entre l'exposition pendant 48h aux $PM_{2.5}$ et les dommages à l'ADN mesurés par le niveau de 8-OHdG dans les lymphocytes. Pour une augmentation de $10 \mu g/m^3$ de $PM_{2.5}$, une élévation de 11% du niveau de 8-OHdG a ainsi été détectée (Sørensen et al., 2003). Cette association a également été établie dans des études toxicologiques où une exposition ex vivo aux $PM_{2.5}$ et aux HAP a été corrélée avec le niveau de 8-OHdG dans les lymphocytes humains (Vattanasit et al., 2014).

Bien que la production d'ERO soit un événement crucial dans la défense cellulaire, ces espèces sont capables de causer des dommages aux macromolécules cellulaires telles que les acides nucléiques, les lipides et les protéines.

1.3. Génotoxicité

1.3.1. Description générale

La stabilité génomique est d'importance primordiale pour la survie et le fonctionnement correct de tout organisme. Toutefois des agents génotoxiques aux caractères électrophiles sont capables d'induire des dommages au génome en se liant à des sites nucléophiles de l'ADN. La génotoxicité est donc la capacité des agents génotoxiques à induire des dommages à l'ADN. Nous distinguons deux types de génotoxicité. La génotoxicité directe faisant référence aux effets directs causés suite à l'interaction entre l'agent génotoxique à caractère électrophile et l'ADN nucléophile. Parmi ces effets, la formation d'adduits, les pontages, ou encore de cassures de l'ADN. D'autre part, lorsque les altérations ont lieu au niveau de différents systèmes intracellulaires tels que les systèmes de réparation de l'ADN,

les télomérases, ou encore le fuseau mitotique, elles sont considérées comme atteintes indirectes à l'ADN. Nous parlons ainsi de la génotoxicité indirecte. Dans ce qui suit, seront relatées certaines études axées sur l'implication des particules atmosphériques dans l'observation d'effets génotoxiques.

1.3.2. Génotoxicité liée aux particules atmosphériques

Les particules fines sont capables d'entraîner divers dommages à l'ADN. Ces dommages sont causés par certains métabolites générés suite à la biotransformation des composés rentrant dans la composition des particules. Egalement, les espèces réactives issues des composés organiques et des métaux ainsi que des mécanismes de stress oxydant et d'activation métabolique sont capables d'interagir avec différentes macromolécules cellulaires dont l'ADN. Ces interactions sont susceptibles de conduire à des lésions du génome qualifiées de lésions génotoxiques (Dergham et al., 2012; Gualtieri et al., 2012; Longhin et al., 2013).

Suite à l'exposition aux particules fines plusieurs dommages à l'ADN ont été détectés notamment les cassures de l'ADN, la formation des adduits, l'oxydation des bases, la formation de sites abasiques et les pontages (Figure I.12). Dans la suite, nous allons nous concentrer sur deux dommages principaux testés au cours du projet de recherche : la formation des adduits et les cassures doubles brin de l'ADN.

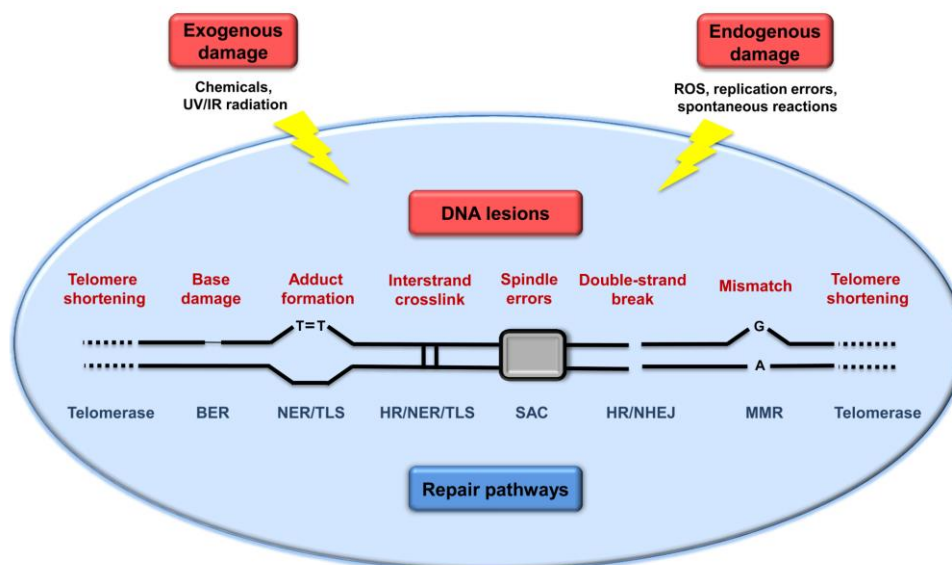


Figure 1.12 : Les dommages à l'ADN causés par des sources endogènes et exogènes et les différentes voies de réparations (López-Otín et al., 2013).

1.3.2.1 Formation d'adduits à l'ADN

De nombreux xénobiotiques ou leurs métabolites sont capables de se fixer de manière covalente à des macromolécules cellulaires pour former des adduits. L'ADN est la macromolécule cible la plus étudiée. La formation de ces adduits entraîne des changements structuraux au niveau de l'ADN (une mauvaise reconnaissance de la base transformée ; une mutagenèse) perturbant sa fonction, et pouvant entraîner des pathologies tels que le cancer et le vieillissement.

Le B[a]P est connu pour sa capacité à former des adduits encombrants à l'ADN. La présence de ces adduits est un événement important dans l'apparition de tumeurs via la production de mutations dans des gènes tels que le suppresseur de tumeur *TP53*. Suite à la métabolisation du HAP, l'époxyde BPDE est un métabolite terminal extrêmement réactif vis-à-vis de l'ADN. L'anneau époxy est le site ayant la plus grande réactivité électrophile formant alors le site préférentiel d'interaction covalente du BPDE avec des sites nucléophiles tels que les bases puriques de l'ADN (l'adénine et la guanine) formant des adduits. La métabolisation du B[a]P peut également donner un catéchol qui subit deux oxydations conduisant à la formation des quinones avec la production concomitante d'ERO. Ces quinones sont ainsi

capables de former des adduits stables à l'ADN au niveau de la guanine, de la cytosine et de l'adénine.

Les études épidémiologiques ont bien établi l'association entre l'exposition aux HAP et la formation d'adduits. Une méta-analyse regroupant 13 études entre 1988 et 1997 a montré une association entre le niveau des adduits dans les leucocytes et les lymphocytes et l'exposition à la pollution atmosphérique avec le B[a]P comme indicateur d'exposition. La relation établie est linéaire à de faibles doses de B[a]P et sublinéaire à fortes doses (Peluso et al., 2001). Il a été montré aussi que la formation d'adduits était associée à l'exposition aux PM₁₀, dans le cas d'une étude mesurant les adduits dans les lymphocytes sanguins des travailleurs exposés à la circulation pendant une période de 1-2 semaines (Palli et al., 2008).

Les études toxicologiques ont également élucidé cette association. En exposant *in vitro* des lymphocytes non activés et des monocytes au B[a]P, il a été montré que les adduits sont uniquement formés chez les monocytes. Toutefois, suite à l'activation des lymphocytes par la phytohaemagglutinine pendant 48h, ces cellules ont montré un motif d'adduit similaire à celui des monocytes. De plus, l'exposition de ces deux lignées cellulaires au BPDE, le métabolite du B[a]P, conduit à des adduits d'ADN similaires dans les deux types de cellules (Holz et al., 1991). Une étude récente a montré que l'exposition de L_T activés à 2µM de B[a]P pendant 48h conduit à une induction significative du gène *CYP1A1* impliqué dans la métabolisation du B[a]P en BPDE et à la formation d'adduits dG-N²-BPDE (Liamin et al., 2017). Après exposition des lymphocytes et des monocytes en co-culture au B[a]P, les adduits formés étaient semblables à ceux des monocytes. Cette étude n'a pas seulement mis en évidence la relation entre l'exposition au B[a]P et la formation d'adduits mais elle a aussi montré que les lymphocytes non stimulés qui sont incapables d'activer des promutagènes métaboliques comme le B[a]P, reçoivent le matériel génotoxique d'autres cellules sanguines (telles que les monocytes) pour former des adduits (Holz et al., 1991).

1.3.2.2 Cassures double brin de l'ADN

La cassure double brin (DNA Double Strand Breaks, DSB) est l'une des lésions de l'ADN les plus graves qui compromettent l'intégrité génomique. Au cours de cette lésion, les deux brins de la double hélice sont endommagés, ce qui empêche l'utilisation du brin

complémentaire comme matrice pour la réparation. Ces cassures sont suffisantes pour induire des mutations géniques et des aberrations chromosomiques.

Parmi les réponses cellulaires aux dommages à l'ADN, la phosphorylation du variant H2A.X est la modification la plus caractérisée. H2A.X est un variant de remplacement de l'histone H2A. Suite aux cassures doubles brins de l'ADN, une phosphorylation a lieu sur la serine 139 (Ser139) de l'extrémité Carboxy-terminale (C-terminal) de H2A.X pour former la gamma-H2A.X (γ H2A.X ou p-H2A.X). H2A.X semble jouer un rôle important dans le processus de réparation des DSB. La phosphorylation de l'histone est une étape clé pour la signalisation et l'initiation de la réparation. Par la suite, plusieurs protéines de réparation de l'ADN sont recrutées telles que la recombinaise Rad51 et la X-ray repair cross-complementing protein 4 (XRCC4). Cette étape génère de nouveau une phosphorylation de H2A.X formant des foyers de γ H2A.X. Le nombre de foyers formés chez les cellules de mammifères, correspond au nombre des DSB. A la fin de la réparation, γ H2A.X est déphosphorylée.

De nombreuses études *in vitro* se sont intéressées à la détection de γ H2A.X pour étudier le stress génotoxique et la réponse de plusieurs types cellulaires aux dommages à l'ADN après une exposition à des agents environnementaux tels que la fumée de cigarette (Albino et al., 2004), les métaux lourds (Peterson-Roth et al., 2005), les HAP (Toyooka and Ibuki, 2006) et les nitro-HAP (Kawanishi et al., 2009; Oya et al., 2011). Ces études ont montré des augmentations du niveau de γ H2A.X suite à l'exposition.

Concernant les études réalisées sur les PBMC et les lymphocytes, Ishida a observé une augmentation du nombre de foyers de γ H2A.X *in vivo* chez les PBMC des jeunes fumeurs en comparant aux non-fumeurs. De plus, l'arrêt du tabac pendant 1 mois a réduit les DSB et le nombre de foyers de γ -H2A.X à un niveau comparable à celui observé chez les non-fumeurs (Ishida et al., 2014). Une étude a montré que les femmes exposées à la fumée issue de l'utilisation des carburants à base de biomasse dans des cuisines mal ventilées ont un pourcentage de PBMN présentant des foyers de γ H2A.X multiplié par 6 par rapport aux cellules des femmes utilisant le gaz de pétrole liquéfié comme carburant (Mondal et al., 2010).

Des études *ex vivo*, ont également montré une augmentation du niveau de γ -H2AX lié aux DSB dans les lymphocytes suite à l'exposition aux radiations ionisantes (Redon et al., 2009), aux particules alpha (Horn et al., 2015) et aux rayons X (Horn et al., 2011). Une étude

récente a montré une distinction significative des foyers γ H2A.X caractéristiques des DSB chez les L_T activés exposés pendant 48h à 2 μ M de B[a]P illustrant la capacité du B[a]P à causer des dommages à l'ADN (Liamin et al., 2017).

Concernant l'exposition aux particules atmosphériques, plusieurs études figurent dans la littérature. Une étude réalisée sur les A549 a montré une phosphorylation de H2A.X suite à la formation des DSB après exposition aux PM₁₀ (Sánchez-Pérez et al., 2009). Une autre étude effectuée sur des BEAS-2B a également montré une phosphorylation de H2A.X liée à l'exposition aux PM_{2.5} à Dunkerque (Lepers et al., 2014). A notre connaissance, aucune étude ne s'est intéressée à rechercher cette phosphorylation au niveau des lymphocytes suite à l'exposition aux particules atmosphériques. Les lymphocytes peuvent être intéressants comme modèle pour l'évaluation de γ H2A.X en raison de la grande spécificité et de la sensibilité des analyses effectuées avec ces cellules, des quantités considérables de cellules pouvant être facilement obtenues dans un court laps de temps avant et après exposition et la quantité limitée de sang nécessaire. Le recours aux lymphocytes comme modèle minimise le risque d'hétérogénéité intra-individuelle, car il est connu que les différences dans le niveau d'expression des foyers γ H2A.X entre les sous-populations de lymphocytes s'avèrent être minimales.

1.3.3. Réparation des lésions de l'ADN

Les cellules eucaryotes sont équipées d'un mécanisme sophistiqué de détection et de réparation des dommages à l'ADN. Ces mécanismes regroupent des voies de réparation ainsi que des cascades de signalisation, des checkpoints, qui causent des pauses dans la progression du cycle cellulaire et coordonnent la réparation de la lésion (Figure I.12). Si elles ne sont pas réparées ou si la réparation est erronée, les altérations de l'ADN peuvent conduire à l'apparition de mutations au niveau des gènes, des chromosomes ou du génome et augmenter le risque de cancer.

1.3.3.1 Réparation des adduits

Les modifications covalentes liées à la formation des adduits ne sont pas réversibles mais il existe un mécanisme de réparation de l'ADN. La réparation par excision de nucléotides (*Nucleotide Excision Repair*, NER) prend en charge l'élimination de lésions volumineuses telles

que les adduits encombrants qui cause une distorsion de la double hélice. Il existe deux voies, l'une couplée à la transcription, la TC-NER (Transcription-Coupled NER) qui répare les lésions au niveau des brins transcrits des gènes actifs. La deuxième est la GG-NER (Global Genome NER) qui répare les lésions dans l'ensemble du génome (y compris les brins non transcrits et les régions non codantes de l'ADN). Une fois le dommage identifié, les 2 voies se rejoignent et font intervenir le facteur de transcription TFIIH dont les sous-unités ont une activité hélicase et vont séparer les deux brins de l'ADN. Le brin endommagé va ensuite être incisé de chaque côté de la lésion. Ceci conduit à l'excision d'un fragment d'ADN simple brin de 25-30pb (paires de bases) contenant la lésion. La resynthèse du brin excisé est assurée par l'ADN polymérase δ ou ϵ . La ligation du double brin d'ADN est enfin réalisée par la ligase I. Suite à la formation d'adduits à l'ADN lié à l'exposition des L_T activés au B[a]P, une augmentation de l'expression des gènes associés à la réparation par excision de nucléotides tels que ERCC3, ERCC4, ERCC3, RAD23B et SLK a été montrée (Liamin et al., 2017).

1.3.3.2 Réparation des cassures double-brin

Deux mécanismes de réparation des DSB sont activés selon plusieurs facteurs tels que le type cellulaire, les phases du cycle cellulaire et la complexité de la cassure. La recombinaison homologue (Homologous Recombination, HR) est une voie de réparation efficace et sans erreur en utilisant la séquence homologue présente sur la chromatide sœur et faisant intervenir plusieurs protéines. Cette recombinaison a lieu uniquement après la réplication de l'ADN c.à.d. lors des phases S ou G2 du cycle cellulaire. Le deuxième mécanisme correspond à la religature d'extrémités non-homologues (Non-Homologous End Joining, *NHEJ*), une voie de réparation à risque d'erreur. Elle consiste à lier les extrémités libres générant alors des mutations. Une étude récente a montré que l'exposition des L_T activés au B[a]P pendant 48h déclenche les mécanismes de réparation des DSB par recombinaison homologue. Cette voie de réparation a été vérifiée par l'augmentation de l'expression des facteurs de réparation par HR (MRE11A, BRCA1, BRIP1 and BRCA2) sans exclure le fait qu'une partie des DSB générées soit réparées par religature d'extrémités non-homologues (Liamin et al., 2017).

1.4. Modifications épigénétiques, cas des microARN

A l'opposition des modifications génétiques (mutations) qui causent un changement dans la séquence des gènes aboutissant au changement de leur expression, les modifications épigénétiques sont des changements moléculaires conduisant à une modification de l'expression de gènes sans en modifier la séquence. Ces modifications peuvent être de plusieurs ordres, la méthylation de l'ADN, les modifications post-traductionnelles des histones, les complexes de remodelage de la chromatine et les ARNs non-codants. Dans cette partie nous détaillerons uniquement le dernier mécanisme.

Les micro-ARN, ou miARN ou miR, sont des ARN courts (19-25 nucléotides) non codants ayant un rôle important dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique en se liant à l'ARNm cible. Plus de 1000 miARN existent dans le génome humain, modulant l'expression de 30 à 60% des gènes codants pour les protéines (Friedman et al., 2009). Les miARN sont impliqués dans le contrôle des processus biologiques tels que le développement, la prolifération et la différenciation cellulaire ainsi que l'apoptose et la réponse au stress. D'autre part, en régulant des gènes suppresseurs de tumeurs et des oncogènes, les miARN peuvent être impliqués dans le développement du cancer (Kloosterman and Plasterk, 2006).

1.4.1. Biogenèse et mode d'action des miARN

La biogenèse des miARN a lieu en quatre étapes aboutissant à la formation d'un miARN mature capable d'exercer sa fonction de répression post-transcriptionnelle (Figure I.13).

1.4.1.1 Transcription du miARN primaire

La première étape de formation d'un miARN mature débute par la transcription du gène codant pour le miARN. La majorité de ces gènes sont localisés dans des régions non-codantes de l'ADN et possèdent leur propre système de transcription. Les transcrits primaires du miARN (pri-miARN) sont transcrits sous l'action de l'ARN polymérase II qui produit une molécule d'ARN d'une centaine de nucléotides en forme d'épingle à cheveux ayant une coiffe 7-méthylguanosine en 5' et une queue polyA en 3'.

1.4.1.2 Formation du pré-miARN

Les pri-miARN sont pris en charge par le complexe multi-protéique appelé « microprocesseur » composé de l'enzyme Drosha, une ribonucléase de type III, associée à la protéine de liaison à l'ARN double brin la DGCR8. L'enzyme clive le pri-miARN de manière à former un pré-miARN d'environ 70 nucléotides formant toujours une structure en épingle à cheveux avec une extrémité 5'-phosphate et une 3' libre de 2 nucléotides.

1.4.1.3 Export du pré-miARN vers le cytoplasme

Le pré-miARN généré dans le noyau est exporté dans le cytoplasme par l'exportin-5 (XPO5) qui reconnaît le pré-miARN grâce à son extrémité 3' sortante.

1.4.1.4 Clivage du pré-miARN et libération du miARN

Dans le cytoplasme, le pré-miARN subit sa dernière étape de maturation qui consiste en un clivage du pré-miARN par l'enzyme DICER, une ribonucléase de type III. Le miARN résultant est un duplex de 21 nucléotides en moyenne formé d'un brin de miARN mature et d'un autre brin de taille similaire issu du bras opposé du pré-miARN.

1.4.1.5 Mécanisme de régulation post-transcriptionnelle

L'activité régulatrice des miARN est exercée au sein du complexe RISC (RNA-Induced Silencing Complex). Le duplex formé dans les étapes précédentes s'associe avec le complexe formé des protéines DICER-2, Argonaute (AGO 1-4), Trans-activation response RNA-Binding Protein (TRBP) et Protein Activator of PKR (PACT). L'activité hélicase du complexe, avec l'aide d'AGO, va aboutir à la dissociation des deux brins du miARN, en ne gardant que le brin complémentaire de l'ARNm à cibler constituant le brin « guide » alors que l'autre brin sera qualifié de brin « passager » et sera dégradé.

Le complexe RISC est ensuite guidé vers l'ARNm par le miARN qui se fixe au niveau de la région 3'-UTR (Untranslated Regions) de l'ARNm cible auquel il est complémentaire. Ceci aboutit à deux mécanismes d'action différents en fonction du niveau de complémentarité entre les séquences du miARN et de l'ARNm. Une forte complémentarité conduit au clivage de l'ARNm au niveau de l'appariement avec les nucléotides 10 et 11 du miARN, par l'activité endoribonucléasique de RISC. Ago2 « slicer » est le seul membre de la famille des protéines

Argonautes à posséder une fonction ribonucléase. Dans le cas d'une complémentarité imparfaite, la répression traductionnelle de l'ARNm a lieu par l'action de plusieurs RISC qui se fixent au niveau de la région 3'UTR de l'ARN bloquant la traduction.

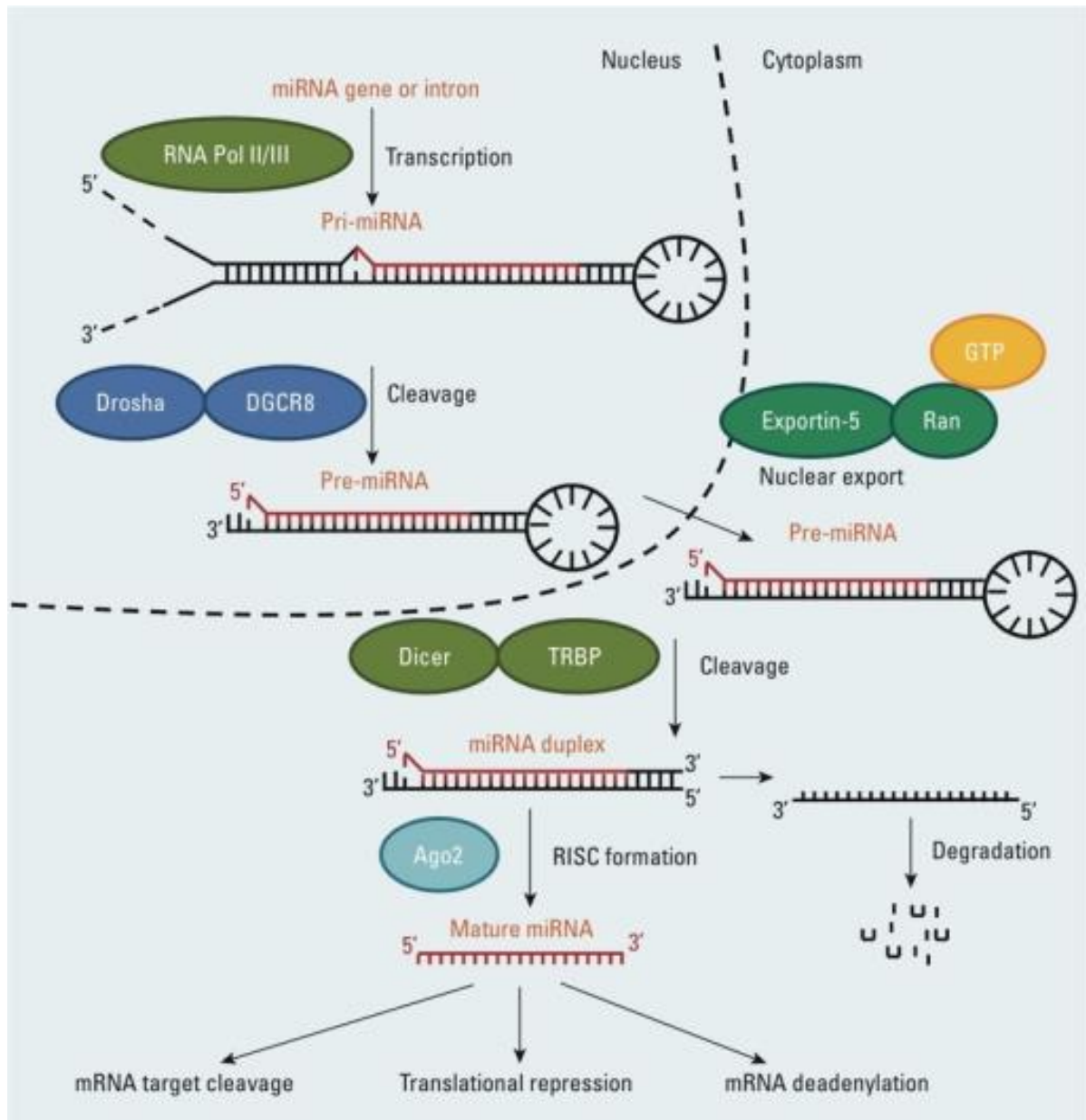


Figure I.13 : Biogenèse et mode d'action des miARN (Vrijens et al., 2015).

1.4.2. Effets des particules atmosphériques

Les profils d'expression des miARN ainsi que leurs susceptibilités envers l'exposition environnementale est un domaine de recherche en expansion avec un petit nombre de publications interrogeant ce mécanisme épigénétique. Suite à l'exposition aux particules atmosphériques ou à leurs composants (COV, HAP, métaux), des modifications de l'expression de nombreux miARN ont été enregistrées. Pour la suite, nous nous appuierons sur les études réalisées sur les leucocytes notamment les lymphocytes afin d'illustrer les effets de l'exposition aux particules et à leurs composants sur l'expression des miARN.

Une étude a mesuré la modification de l'expression du miARN dans les leucocytes des femmes enceintes exposées aux COV (benzène, toluène et xylène) présents dans la fumée de cigarette. L'exposition maternelle à la fumée de tabac durant la grossesse est en corrélation avec le niveau d'expression de miR-223 dans le sang. Les concentrations élevées de benzène et de toluène dans les maisons ont été associées à des concentrations plus élevées de miR-223 dans le sang maternel. Une expression élevée de ce miR a été associée à un nombre faible de Treg dans le sang (Herberth et al., 2014). Dans une étude transversale s'intéressant à l'expression du miR-221 dans les lymphocytes des agents de station-service exposés au benzène, il a été montré que les niveaux de benzène et de l'expression du miR-221, un oncogène potentiel, étaient plus élevés chez ces agents par rapport aux contrôles non exposés, établissant alors une association significative entre le benzène et le miR-221. Ceci a permis de proposer une relation entre l'exposition au benzène et l'élévation de l'expression du miR-221 au niveau des lymphocytes humains (Hu et al., 2016).

Une étude s'est intéressée à l'expression de trois miARN (miR-222, miR-21 et miR-146a) liés aux processus de stress oxydant et d'inflammation suite à l'exposition professionnelle aux PM₁₀ riches en métaux (arsenic, fer, nickel, plomb, cadmium, chrome et manganèse). Les niveaux d'expression des miARN ont été déterminés dans les leucocytes de 63 travailleurs en aciérie avant et après exposition. L'expression des miR-222 et miR-21 a significativement augmenté après exposition suggérant que les changements dans l'expression des miARN peuvent représenter un nouveau mécanisme qui intervient dans les réponses aux PM et à ses composants métalliques (Bollati et al., 2010).

Compte tenu de leur abondance dans le système cardiovasculaire, les miARN sanguins sont étudiés en tant que biomarqueurs potentiels des maladies cardiovasculaires soutenant la possibilité que la plupart des événements physiologiques et pathologiques dans le système cardiovasculaire soient contrôlés, au moins en partie, par les miARN. Une étude a ainsi prouvé que les miARN interviennent dans un mécanisme moléculaire qui sous-tend les effets liés à la tension artérielle suite à l'exposition aux PM₁₀ (Motta et al., 2016).

En raison à la fois de leur accessibilité, les miARN circulants dans le sang ont été suggérés comme étant une composante active et un biomarqueur relativement peu invasif et stable de la réponse cellulaire à l'exposition aux particules atmosphériques.

2. Mécanismes spécifiques au système immunitaire

L'inflammation ou réaction inflammatoire est la réponse des tissus vivants, vascularisés, à une agression ayant pour origine physique, chimique ou biologique dans le but de maintenir l'intégrité de l'organisme. La réponse inflammatoire est associée au système immunitaire. Le déclenchement et le maintien de la réponse sont dûs à l'activation de tout un ensemble de médiateurs cellulaires et moléculaires. La composante cellulaire regroupe les granulocytes (neutrophiles, éosinophiles et basophiles) ainsi que les monocytes et les lymphocytes. Quant aux médiateurs moléculaires, on cite les médiateurs lipidiques et les cytokines. Les médiateurs lipidiques de l'inflammation sont les produits terminaux du métabolisme de l'acide arachidonique, tels que les prostaglandines (PG) et les leucotriènes (LT) qui contribuent au recrutement des cellules immunitaires sur le site inflammatoire. Les cytokines constituent une famille de médiateurs pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF- α) et immunorégulateurs (IL-10, TGF- β , IL-1ra) sécrétés par les cellules effectrices et qui interviennent dans la régulation du processus inflammatoire. La balance entre les cytokines pro- et anti-inflammatoires est la clé de la régulation de l'inflammation.

2.1. Le déroulement de la réponse inflammatoire

Le déroulement d'une réponse inflammatoire présente toujours les mêmes mécanismes. Toutefois l'intensité, la durée ainsi que l'aspect lésionnel de la réponse inflammatoire dépendent de la nature de l'agent pathogène, de l'organe où l'inflammation se déroule et du terrain physiologique de l'hôte. La réaction inflammatoire peut être divisée en trois étapes :

2.1.1. Reconnaissance de l'agent initiateur et déclenchement de la réaction inflammatoire

Les agents initiateurs de l'inflammation peuvent être physiques, chimiques ou biologiques infectieux, endogènes ou exogènes. La reconnaissance de l'agent a lieu suite à l'interaction entre les signaux de danger d'origine exogène, les motifs moléculaires associés aux pathogènes (pathogen-associated molecular patterns, PAMP) ou endogène, les motifs moléculaires associés aux dégâts cellulaires (danger-associated molecular patterns, DAMPs). Ces signaux de danger vont stimuler les récepteurs de l'immunité innée, les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (Pattern Recognition Receptors PRR) et activer la phase aiguë de l'inflammation. L'initiation passe principalement par l'activation du facteur de transcription NF- κ B, conduisant à l'augmentation des protéines pro-inflammatoires (TNF- α , histamines, prostaglandines, leucotriènes, sérotonines et le facteur d'activation plaquettaire (Platelet Activation Factor, PAF).

2.1.2. Recrutement des cellules immunocompétentes, le passage relais entre réponse innée et adaptative

Les signaux fortement pro-inflammatoires libérés suite à l'initiation de la réponse inflammatoire, favorisent la vasodilatation et l'extravasation, les cytokines TNF- α et IL-1 et les médiateurs lipidiques conduisent à la migration des leucocytes. Les premiers à arriver au niveau du site inflammatoire sont les neutrophiles qui sécrètent des protéases et également des ERO participant à la dénaturation des protéines et de l'ADN. Les neutrophiles ensuite phagocytent les pathogènes. Les macrophages arrivent après les neutrophiles et mettent en œuvre les mêmes mécanismes d'action ainsi que la phagocytose.

Selon le type de l'infection, la réponse inflammatoire innée va pouvoir ou non éliminer le pathogène. Une réponse spécifique est parfois nécessaire faisant intervenir la réponse immunitaire adaptative grâce au recrutement et l'activation des lymphocytes. Cette réponse est une phase tardive pouvant être humorale permettant grâce aux anticorps produits par les lymphocytes B de neutraliser l'agent infectieux, ou cellulaire faisant intervenir les lymphocytes T. Pour la suite, nous allons seulement détailler la contribution des lymphocytes T à la réponse inflammatoire adaptative.

Cette réponse est déclenchée par les macrophages et les cellules dendritiques, qui ayant capturé l'antigène sont devenus des cellules présentatrices d'antigène. Ces cellules migrent vers les organes lymphoïdes pour présenter les fragments antigéniques aux L_T entraînant leur activation. Les $CD8^+$ exercent une fonction cytotoxique et éliminent les cellules infectées. Leur implication dans les maladies inflammatoires n'est pas très bien connue. Les $L_T CD4^+$ jouent un rôle régulateur majeur dans la réponse immunitaire par la sécrétion de cytokines spécifiques. Suite à l'activation, ces cellules naïves prolifèrent et se différencient en L_T effecteurs auxiliaires Th1, Th2 ou Th17. Les Th1 induisent une réponse pro-inflammatoire pour contrôler les pathogènes intracellulaires. Les Th2 se différencient et favorisent la production d'immunoglobulines contre les pathogènes extracellulaires. Ces cellules ont également été associées à l'asthme allergique. Les cellules Th1 et Th2 produisent des cytokines qui inhibent mutuellement l'activité et la prolifération de l'autre profil définissant une balance Th1/Th2. Un troisième profil regroupe les Th17. Leur profil de sécrétion cytokinique les a placés au centre de l'inflammation tissulaire et de l'auto-immunité. Ils jouent également un rôle contre les infections bactériennes et fongiques.

2.1.3. Résolution de l'inflammation, retour à l'homéostasie ou passage à la chronicité

Le retour à l'homéostasie est assuré par de nombreux mécanismes mis en place afin d'arrêter la réponse inflammatoire en éliminant les éléments inducteurs de l'inflammation et les produits résultants de la dégradation du tissu altéré. Des médiateurs lipidiques anti-inflammatoires sont produits tels que les lipoxines sécrétées par les macrophages pour arrêter l'influx de neutrophiles et permettant le recrutement de monocytes afin de phagocytter les cellules apoptotiques et les débris cellulaires. Des inhibiteurs de protéases peuvent également

être sécrétés par les macrophages, les neutrophiles et les cellules épithéliales inhibant les protéases sécrétées par les neutrophiles. Les Treg jouent également un rôle dans le contrôle de l'inflammation en sécrétant des cytokines anti-inflammatoires (IL-10, TGF- β) ou en entrant en contact direct avec les L_T effecteurs ou les CPA.

Toutefois, dans certains cas comme par exemple la persistance de l'agent initiateur, une réponse immunitaire non adaptée, pour des raisons génétiques ou/et environnementales, le phénotype inflammatoire peut évoluer vers une chronicité pathologique. Dans cette situation, une dérégulation du système immunitaire a lieu. L'inflammation chronique jouerait un rôle important dans l'initiation, la progression et l'aggravation de plusieurs pathologies cardiovasculaires telles que l'athérosclérose, l'accident vasculaire cérébral et l'infarctus du myocarde. Cependant, les mécanismes expliquant ce lien entre inflammation et maladies cardiovasculaires restent très complexes et difficiles à expliquer.

2.2. L'Ahr régulateur de la réponse immunitaire

L'Ahr joue un rôle important dans le contrôle de la réponse immunitaire adaptative. Il est impliqué dans la prolifération et différenciation cellulaire ainsi que dans la production des cytokines. Plusieurs gènes liés à la réponse inflammatoire contiennent des domaines XRE en amont de leur séquence ce qui peut contribuer à la régulation transcriptionnelle de plusieurs activités immunitaires suite à l'activation de l'Ahr.

L'Ahr est ainsi capable de réguler la différenciation des Th17 et Treg. Dans l'établissement du profil Th17, sa fonction varie selon le stade de différenciation. En stade précoce, l'Ahr exprimé en réponse à IL-6 et TGF- β limite l'effet inhibiteur d'IL-2 en bloquant l'activation via la phosphorylation de STAT1 et STAT5. Quant au stade tardif, il se lie au promoteur d'IL-17 et contribue à l'expression des cytokines IL-17, IL-21 et IL-22 (Figure I.14a). L'Ahr intervient également dans le développement du profil Treg (Foxp3⁺ Treg et Treg de type 1). Sous les conditions de polarisation des L_T en Foxp3⁺ Treg, Ahr interagit directement sur le promoteur de Foxp3 induisant son expression. L'Ahr augmente également l'expression de SMAD1 aboutissant à la stabilisation de l'expression de Foxp3. Il limite aussi l'activité de STAT1

connu pour son rôle dans l'inhibition de la différenciation en Treg. La différenciation en Treg de type 1 fait également intervenir le facteur de transcription AhR en plus du facteur de transcription, la c-maf. Ces deux forment le complexe AhR-c-maf qui se lie aux régions promotrices d'IL-10 et d'IL-21 induisant la génération de ces cytokines (Figure I.14b).

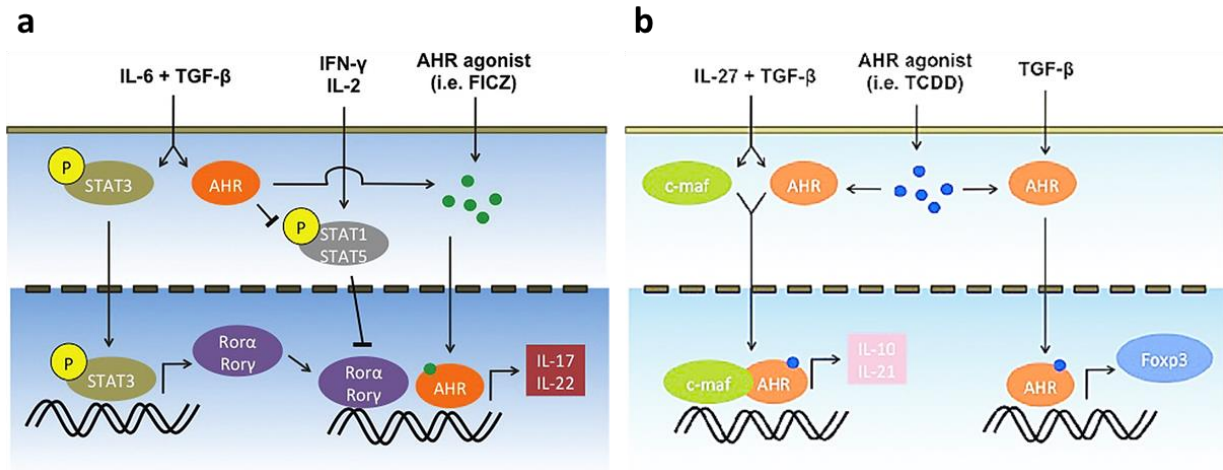


Figure I.14 : AhR au cours de la différenciation des L_T en Th17 (a) et en Treg (b) (Nguyen et al., 2013).

2.3. Effet des particules atmosphériques

Le système immunitaire est une cible toxicologique sensible pour les xénobiotiques. Les particules atmosphériques peuvent directement agir sur plusieurs cellules effectrices étroitement associées à la réponse immunitaire et inflammatoire telles que les lymphocytes, les monocytes et les macrophages.

La réponse inflammatoire est un mécanisme biologique important illustrant les effets de l'exposition à la pollution atmosphérique sur le système cardiovasculaire et le système respiratoire. Une exposition à long terme aux particules atmosphériques peut causer une inflammation et activer la réponse immunitaire humorale et cellulaire avec les effets les plus importants causés par les PM_{2.5}. Une étude épidémiologique a montré une augmentation du nombre de L_B, de L_T CD4⁺, de L_T CD8⁺ et de NK suite à l'exposition aux PM₁₀ et PM_{2.5} avec une augmentation plus importante et plus significative après exposition aux PM_{2.5} (Leonardi et al., 2000).

La balance entre les profils lymphocytaires Th1 et Th2 est importante pour réguler la fonction immunologique et la réponse inflammatoire. Suite à l'exposition aux PM₁₀, une réponse inflammatoire avec un profil mixte Th1/Th2 peut être établie. Une induction du profil Th1 a été démontrée par l'augmentation des cytokines TNF- α et IFN- γ . Au contraire, une réponse inflammatoire allergique a été détectée liée à l'augmentation des cytokines du profil Th2, IL-5 et IL-13 (Huang et al., 2017). Ces effets contradictoires tiennent au fait que les particules forment un mélange hétérogène de composés pouvant favoriser la différenciation vers un des deux profils. La différenciation des lymphocytes en Th1, connu pour la défense contre les pathogènes intracellulaires et le LPS, est une réponse suite à l'exposition à la composante microbienne des particules contenant une proportion d'endotoxine (Park et al., 2011). D'autre part, l'induction du profil Th2 est assurée à travers une voie commune, le stress oxydant. Le glutathion contribue à la différenciation des L_T en Th1 en interférant dans la production de l'IL-4. Le stress oxydant généré peut convertir le glutathion, en sa forme oxydée. En plus, l'excès de stress oxydant cause une déficience en glutathion réduit ce qui balance la réponse inflammatoire vers un profil Th2. Il a été montré que les particules fines induisent le déséquilibre entre les deux profils au niveau transcriptionnel.

Une étude s'est intéressée à déterminer si une exposition à court terme aux particules fines par voie pulmonaire est capable de produire une réponse pro-inflammatoire détectable au niveau des tissus cardiaques du rat. L'expression génique des facteurs de transcriptions des deux profils ainsi que les niveaux des cytokines ont été mesurés. Suite à l'exposition, une surexpression de STAT1, STAT6 et GATA-3, facteurs de transcription relatifs au profil Th2 a été enregistré accompagné d'une diminution de l'expression de T-bet spécifique du profil Th1. Cette variation a montré que la déviation vers un certain profil a lieu au niveau transcriptionnel et qu'une exposition aux particules fines peut favoriser la différenciation des L_T en Th2. En plus, la détection de l'augmentation des cytokines du profil Th2 (IL-4, IL-3) et la diminution des IFN- γ dans le surnageant obtenu du myocarde du rat ainsi que l'augmentation du STAT1 lié à l'apoptose suggère que le déséquilibre entre Th1 et Th2 peut contribuer à des défaillances cardiaques. Le profil Th2 établi par les L_T sous-tend l'association démontrée dans de nombreuses études entre l'exposition aux particules et l'asthme (Saunders et al., 2010; Zhao et al., 2012b).

L'Ahr fournit une voie moléculaire à travers laquelle les facteurs environnementaux peuvent moduler la réponse immunitaire et, par conséquent, le développement de dysfonctionnement à médiation immunitaire. Une étude mesurant le niveau d'expression d'Ahr dans différents profils lymphocytaires (Th1, Th2 et Th17) a montré que l'Ahr est exprimé dans tous ces profils mais avec l'expression la plus importante au niveau des Th17 (Prigent et al., 2014). Suite à l'exposition *in vitro* à la fumée de cigarette connue pour la présence des HAP, un profil Th17 avec une augmentation d'IL-22 ont été observés chez les L_T primaires (Torii et al., 2011). L'augmentation de l'expression d'Ahr liée à l'activation des L_T ainsi que l'élévation du niveau d'expression des gènes des EMX contrôlés par l'Ahr suggère que l'activation de l'Ahr suite à la stimulation des L_T peut augmenter le pouvoir de ces cellules à métaboliser les ligands de l'Ahr dans le but de protéger les L_T en cours de prolifération (Prigent et al., 2014).

3. Interactions entre les différents mécanismes cellulaires

3.1. Epigénétique - inflammation

Des liens ont été établis entre la variation de l'expression de certains miARN et la régulation de la différenciation des cellules immunitaires telles que les L_T auxiliaires CD4⁺ (Monticelli, 2013). Il a été montré que le miR-24 et miR-181 sont sous-exprimés suite à l'activation des CD4⁺ par anti-CD3/CD28 qui aboutit à la surexpression de la cytokine IFN- γ (Fayyad-Kazan et al., 2014).

Il est de plus en plus évident que les expositions environnementales, en particulier la fumée du tabac, induisent des changements épigénétiques, tels que la méthylation de l'ADN, les modifications d'histone et les altérations de l'expression des miARN. Ces changements affectent la différenciation des cellules épithéliales et immunitaires. Les miARN peuvent moduler de nombreux aspects de la réponse immunitaire, tels que la différenciation, la prolifération, la détermination du sort cellulaire et les voies de signalisation intracellulaire (O'Connell et al., 2012). L'étude de Herberth sur l'exposition des femmes enceintes aux COV présents dans la fumée de cigarette a montré une corrélation entre l'augmentation de

l'expression du miARN-223 et la diminution du nombre de Treg dans le sang maternel et placentaire suite à l'exposition des femmes au tabac (Herberth et al., 2014).

3.2. Stress oxydant – inflammation

Les ERO jouent un rôle dans chacune des deux réponses immunitaires. Suite à la liaison des PAMP et DAMP sur les récepteurs spécifiques (par exemple Toll like Receptor, TLR), une augmentation des ERO est assurée via l'activité de la NADPH oxydase ou la mitochondrie. Ces ERO sont nécessaires pour la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IFN- γ , TNF- β) impliquées dans la réponse inflammatoire. Quant à leurs rôles dans la réponse adaptative, une étude in vitro a montré que le traitement de L_T primaires stimulés par des antioxydants, inhibe leur prolifération ainsi que la production d'IL-2 (Chaudhri et al., 1986). La signalisation du TCR nécessite la génération des ERO. Ces espèces interviennent également dans la balance Th1/Th2 où une élévation de la concentration des ERO, observée dans le cas d'un stress oxydant, diminue le nombre de L_T Th1 et augmente le nombre de Th2. Ce phénomène élucide le rôle du stress oxydant dans la régulation positive de l'inflammation causée par le profil Th2, aggravant ainsi la sévérité des maladies allergiques (Kesarwani et al., 2013).

La réponse inflammatoire dépend du niveau des ERO. Une quantité très faible d'ERO peut causer une immunosuppression en inhibant l'activation de la réponse inflammatoire. Un niveau faible de ces espèces maintient et améliore la réponse du système immunitaire tandis qu'une élévation importante cause une augmentation de la sécrétion des cytokines proinflammatoires et peut contribuer au développement de maladies auto-immunes.

3.3. Stress oxydant - activation métabolique – génotoxicité

Le stress oxydant ainsi que l'activation métabolique peuvent influencer les effets génotoxiques. A titre d'exemple, l'effet du polymorphisme génétique de la catalase (CAT), enzyme antioxydante et du CYP1B1 impliqués dans la métabolisation des HAP, sur la formation d'adduits à l'ADN a été étudié sur les lymphocytes sanguins exposés *ex vivo* au B[a]P. Une corrélation a été observée entre les niveaux d'expression des gènes *CAT* et *CYP1B1*.

Il a été montré que le polymorphisme génétique dans la région promotrice de CAT peut déterminer la quantité et l'activité de la catalase, qui peut ensuite réguler l'expression du *CYP1B1* modulant ainsi les niveaux d'adduits des métabolites du B[a]P à l'ADN dans les lymphocytes (Schults et al., 2013).

Vieillesse et modifications des mécanismes cellulaires

Il est concevable que le vieillissement soit un processus dégénératif causé par une combinaison de sous-produits toxiques issus du métabolisme normal, tels que les espèces réactives d'oxygène, les imperfections dans les systèmes qui sont normalement capables de réparer les dommages cellulaires mais également un changement de statut inflammatoire.

Bien que le vieillissement ne soit pas considéré comme une maladie par lui-même, il entraîne des pertes de fonction et rend l'organisme plus vulnérable à beaucoup de maladies comme le cancer, les maladies cardiaques, neurodégénératives et le diabète. Le taux de cancer augmente avec l'âge avec une incidence de 12-36 fois plus élevée chez les individus âgés de plus que 65 ans par rapport aux individus de 25-44 ans et de 2-3 fois plus que celle des individus de 45-64 ans. 70% des cas de mortalité par cancer sont retrouvés chez les personnes âgées de plus de 65 ans.

1. Mécanismes non spécifiques au système immunitaire

1.1. Métabolisation

Peu d'études se sont intéressées à l'influence de l'âge sur le processus de métabolisation. Il a été montré que la phase I de métabolisation est conservée intacte chez les personnes âgées en bonne santé. Les enzymes de cette phase, notamment les cytochromes P450, n'ont pas subi de diminution de leur activité dans les microsomes hépatiques en fonction de l'âge (Hunt et al., 1990; Schmucker et al., 1990). Egalement la phase II de métabolisation est bien préservée avec l'âge où il a été montré que l'âge, à lui seul, ne cause pas de baisse de l'activité des enzymes de cette phase (Herd et al., 1991). Toutefois, il

est important de noter que le métabolisme pourrait être réduit chez les personnes âgées fragiles ou malades.

A notre connaissance, il n'existe pas d'études s'intéressant à l'influence de l'âge sur la métabolisation des composés entrant dans la composition des particules atmosphériques.

1.2. Stress oxydant

La théorie du vieillissement par les radicaux libres, proposée par Harman, pose la question de la contribution des ERO au vieillissement à travers leur réactivité envers les macromolécules en particulier au niveau de la mitochondrie (Harman, 1956). Une mitochondrie endommagée est capable de produire des quantités accrues d'ERO, affectant ainsi les fonctions cellulaires.

Les espèces réactives de l'oxygène endommagent arbitrairement les macromolécules dans la zone où elles sont produites, menant, dans de nombreux cas, à la mort de la cellule par apoptose. Le mécanisme de protection contre le stress oxydant semble être perturbé par le vieillissement. Il a ainsi été reporté que l'activité de la SOD diminue chez les personnes âgées. En revanche, l'activité de la catalase et de la glutathion peroxydase augmente avec l'âge, ce qui pourrait refléter une réponse compensatoire aux niveaux basaux extrêmement élevés d'ERO dans les cellules des individus âgés (Kedziora-Kornatowska et al., 2007).

Une étude mesurant le stress oxydant suite à l'exposition des jeunes enfants et des personnes âgées aux PM_{2.5} a montré que les personnes âgées sont les plus susceptibles au stress oxydatif ce qui pourrait expliquer le mécanisme des effets néfastes sur la santé tels que les maladies cardiovasculaires ou respiratoires observées suite à l'exposition aux PM_{2.5}, en particulier chez les personnes âgées (Kim et al., 2009).

Toutefois, des observations récentes ont montré qu'une augmentation des ERO n'est pas forcément néfaste pour le cycle de vie. Une légère augmentation de ces espèces peut activer les réponses cellulaires augmentant ainsi les voies de signalisation. Cependant, un niveau élevé des ERO pourrait hyper-activer les voies de signalisation favorisant le développement d'inflammation, de cancer ou de mort cellulaire conduisant à l'accélération du vieillissement (Schieber and Chandel, 2014).

1.3. Génotoxicité

L'augmentation des dommages aux macromolécules, notamment l'ADN, est un élément marquant dans le processus du vieillissement. En raison de son rôle important, l'ADN a longtemps été considéré comme une cible majeure des dommages cellulaires liés à l'âge et des dommages à l'ADN, cause potentielle du vieillissement. La majorité de ces dommages sont réparés rapidement. Ils ne seraient donc pas capables de déclencher le processus de vieillissement. Cependant, certaines lésions très néfastes et persistantes en très faibles quantités telles que les DSB, peuvent représenter une menace considérable pour la cellule et l'organisme.

Les études ont montré que les foyers γ H2A.X caractéristiques des DSB, sont très persistants et augmentent en nombre avec l'âge. Cela a été démontré au niveau du nombre de foyers dans les lymphocytes (Sedelnikova et al., 2008) ainsi que l'expression génique et protéique de la γ H2A.X dans les PBMC des personnes âgées (Noren Hooten et al., 2010) ce qui a suggéré la présence de cette modification d'histone dans le processus de vieillissement. L'augmentation de γ H2A.X n'est pas la cause d'un problème de déphosphorylation (White et al., 2015) ; elle montre que la réparation des DSB par la cellule est plus difficile avec l'âge ce qui explique leur accumulation au cours du temps. Cela a été prouvé par la diminution de la capacité des cellules à détecter et à réparer les dommages à l'ADN avec l'âge. Les deux mécanismes de recombinaison homologue (HR) et de religature d'extrémités non-homologues (NHEJ) impliqués dans la réparation des DSB ont tendance à diminuer avec l'âge. Puisque la réparation par HR dépend de la réplication de l'ADN (phases S et G₂), une diminution de la réparation peut indiquer une diminution de la prolifération cellulaire dans les tissus en cours de vieillissement en raison de la senescence cellulaire (Wang et al., 2009).

Jusqu'à présent, aucune étude ne s'est intéressée aux dommages à l'ADN des lymphocytes chez les personnes âgées suite à l'exposition aux particules atmosphériques.

1.4. Epigénétique

Les connaissances sur le rôle des miARN au cours du vieillissement sont limitées. Une étude a mis en évidence des changements au niveau de l'expression des miARN avec l'âge. 32

miARN ont été testés chez les PBMC des jeunes (30 ans) et des personnes âgées (64 ans). Une sous expression a été notée chez les personnes âgées pour 9 de ces miARN (miR-103, miR-107, miR-128, miR-130a, miR-155, miR-24, miR-221, miR-496, miR-1538). Parmi ces miARN, 5 sont impliqués dans la pathogenèse du cancer (Hooten et al., 2010).

Peu d'études ont concerné les changements dans l'expression des miARN en réponse à des facteurs de stress environnementaux, y compris les particules atmosphériques. A notre connaissance, une seule étude s'est intéressée à la variation de l'expression des miARN suite à l'exposition de personnes âgées aux particules. Au cours de cette étude épidémiologique, le niveau d'expression des miARN a été mesuré dans les leucocytes sanguins provenant de 153 hommes âgés. Il a été montré que suite à l'exposition aux particules fines notamment celles liées au trafic routier, une régulation négative des microARN (miR-126, -146a, -155, -21, and -222) a été détectée. Ces miARN sont impliqués dans des processus potentiellement liés à l'exposition aux particules atmosphériques (comme l'inflammation, le dysfonctionnement endothéliale et la coagulation) chez les hommes âgés (Fossati et al., 2014).

2. Mécanismes spécifiques au système immunitaire

L'immunosénescence fait référence au vieillissement physiologique du système immunitaire lors duquel certaines fonctions immunitaires sont réduites alors que d'autres sont conservées et même augmentées. L'immunosénescence contribue non seulement à l'augmentation de la susceptibilité des personnes âgées aux maladies infectieuses et à la diminution de la qualité de la réponse vaccinale, mais également à l'augmentation de l'incidence avec l'âge des maladies auto-immunes, des cancers, de l'ostéoporose, de certaines maladies neurodégénératives et du diabète.

L'« Inflamm-aging » est un état chronique d'inflammation légère accompagnant le processus de vieillissement et caractérisé par une augmentation des niveaux de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6, IL-1) et des biomarqueurs de la phase aiguë d'inflammation (la protéine C réactive, CRP). Ce phénomène a été associé à une élévation de la morbidité et mortalité au cours du vieillissement. Une situation dite « inflammation stérile » a également

été décrite chez les personnes âgées où les mécanismes innés sont déclenchés même en absence d'infection pouvant produire à long terme une inflammation chronique.

Le phénomène d'immunosénescence est un remodelage complexe causant des altérations au niveau des cellules souches hématopoïétiques ainsi que des cellules de l'immunité innée et adaptative.

2.1. Changement au niveau des cellules hématopoïétiques et involution thymique causés par le vieillissement

Le compartiment des cellules souches hématopoïétiques (CSH) est modulé négativement avec l'âge en subissant des changements au niveau de ses fonctions. La matrice de la moelle osseuse subit des changements au niveau de la structure notamment une diminution des cellules stromales avec l'âge. La composition du compartiment hématopoïétique de la moelle osseuse change aussi et devient de plus en plus riche en tissus adipeux. Une altération du programme de différenciation des CSH a lieu avec une réduction de leur capacité à s'orienter vers la lignée lymphoïde alors que le potentiel myéloïde est augmenté.

L'involution thymique fait référence à une décroissance progressive, liée à l'âge, du thymus de 3% par an à compter de la puberté. Morphologiquement, cela correspond au remplacement des cellules épithéliales thymiques par des cellules adipeuses. Une réduction de la thymopoïèse, accompagnée de la diminution de production de thymocytes, est associée à l'involution du thymus. Ce processus est véhiculé par la régulation positive des cytokines thymo-suppressives (IL-6) et la diminution de la production d'IL-7 important pour la thymopoïèse. L'involution thymique est la cause de la réduction progressive des L_T naïfs avec l'âge. Chez les jeunes 50% des L_T sont des L_T naïfs, ce pourcentage baisse à 35% chez les personnes âgées. Cette réduction d'export de L_T naïfs est observée au niveau des L_T cytotoxiques $CD8^+$ plus que pour les auxiliaires $CD4^+$. A 70 ans les L_T naïfs $CD8^+$ forment ainsi seulement 10% de la population totale de $CD8^+$ contrairement aux $CD4^+$ (40%) (Fagnoni et al., 2000). Cette atrophie de thymus est une cause majeure de déclin des compétences

immunitaires avec le vieillissement. Afin de maintenir l'intégrité et la diversité du pool de L_T périphériques, des mécanismes homéostatiques préservent les L_T naïfs et les L_T à mémoire.

2.2. Immunité innée et vieillissement

Le pouvoir fonctionnel des cellules de l'immunité innée diminue avec l'âge (Figure I.15).

Les neutrophiles subissent des déficiences fonctionnelles traduites par la réduction de leurs capacités phagocytaires et de leur chimiotactisme ainsi que de l'augmentation de la production de l'anion superoxyde. De plus, l'expression et la fonction des récepteurs de surface (Toll like receptor, TLR), ainsi que l'expression des molécules de surface (CMH classe II) et la production de cytokines sont réduites au cours du vieillissement.

Le nombre de macrophages sanguins n'est pas modifié au cours du vieillissement cependant leurs activités phagocytaires et leurs production d'ERO sont diminuées. Une diminution du niveau de cytokines générées par ces cellules (IL-1, IL-6, TNF- α) est observée. L'expression des molécules CMH-II est altérée avec l'âge.

Les cellules dendritiques semblent être affectées par le vieillissement au niveau de leur distribution et leur capacité à migrer. Des changements dans les signaux de co-stimulation entre ces cellules et les lymphocytes T sont également liés à l'âge. Ceci peut contribuer au déficit cellulaire en L_T au cours de l'immunosénescence.

L'activité cytotoxique des cellules NK diminue avec l'âge notamment à cause d'une défaillance dans la sécrétion de perforine et une polarisation défective des granules vers la synapse immunologique. La production de l'IL-2, IFN- γ , TNF- α et IL-12 diminue avec l'âge.

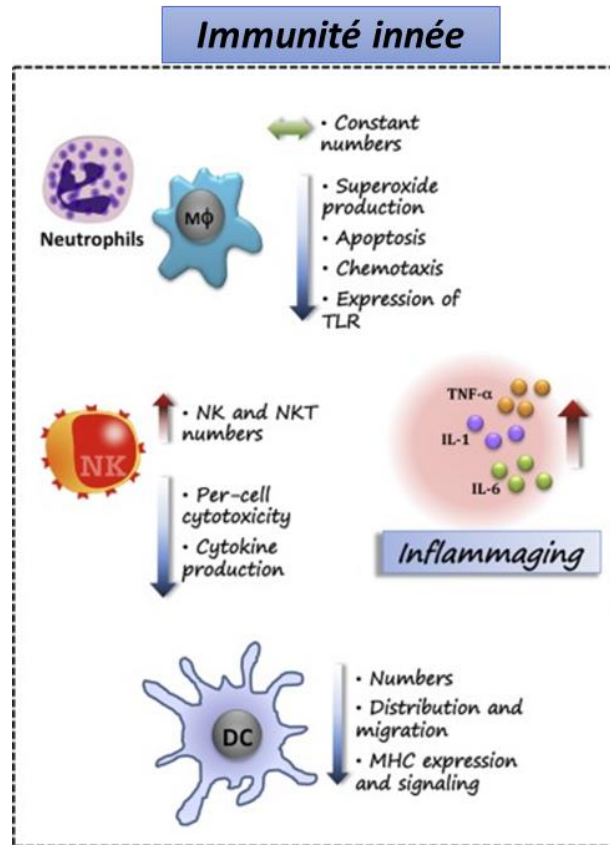


Figure I.15 : Synthèse des changements liés à l'âge au niveau de l'immunité innée (Bauer and Fuente, 2016).

2.3. Immunité adaptative et vieillissement

Les changements liés à l'âge affectent les deux lignées lymphocytaires T et B (Figure I.16).

2.3.1. Changement au niveau des L_T

Accompagnant la baisse du nombre de L_T naïfs causée par l'involution du thymus, des changements phénotypiques et fonctionnels au niveau des $CD4^+$ et $CD8^+$ sont également liés au vieillissement.

Durant une réponse immunitaire, ou même en cas de besoin de réapprovisionnement en L_T lié au vieillissement, les L_T subissent des proliférations. Suite à plusieurs cycles de division, les L_T sont atteints de « sénescence répliquative », un arrêt essentiellement irréversible de la prolifération cellulaire et restent alors bloqués dans un plateau d'arrêt de croissance

appelé « plateau de senescence répliquative » ou « plateau de Hayflick ». Les cellules sont anergiques, résistantes à l'apoptose et ont des télomères plus courts en raison de l'absence graduelle de la télomérase au fur et à mesure des divisions. Avec cette senescence cellulaire, l'expression du TCR est maintenue. Toutefois les CD4⁺ et CD8⁺ perdent l'expression des molécules de co-stimulation CD28 et CD27 aboutissant à un changement phénotypique. Une accumulation de L_T fortement différenciés CD27⁻/CD28⁻ présentant des caractéristiques de cellules effectrices a lieu. Ces cellules sécrètent des cytokines inflammatoires (IFN- γ , TNF- α) et expriment le marqueur de surface des NK, le CD56, associé à une augmentation de la présence de molécules cytotoxiques (perforine). Ce profil permet aux L_T de s'activer indépendamment du TCR. Ces changements ont tendance à affecter les CD8⁺ plus que les CD4⁺ ce qui suggère la soumission des CD4⁺ à des mécanismes homéostatiques plus sévère.

Chez les adultes le ratio CD4/CD8 est d'environ 2 : 1. Un risque de faible immunité a été attribué aux personnes ayant le ratio CD4/CD8 inversé (<1). Ce profil immunitaire observé chez les personnes âgées est associé à l'augmentation de mortalité et de morbidité liées à l'âge.

Concernant les profils lymphocytaires, les L_T ont une faible expression des facteurs de transcription des profils Th1 (T-bet), Th2 (GATA-3) et Th17 (ROR γ t). Toutefois, une expansion de Treg (Foxp3⁺) a lieu.

2.3.2. Changement au niveau des L_B

Des détériorations majeures affectent les L_B au cours du vieillissement.

En raison de la capacité affaiblie des CSH à produire de nouveaux L_B, le nombre de L_B naïfs diminue, réduisant la capacité de réagir face à un nouvel antigène. Cela est accompagné d'une augmentation du nombre de L_B à mémoire résistants à l'apoptose.

Des changements au niveau de la production d'anticorps sont également liés à l'âge. Suite à la rencontre d'un antigène, la réponse est lente chez les personnes âgées. Une diminution du pouvoir d'expansion clonale des L_B en corrélation avec un faible nombre d'anticorps circulants suite à la rencontre d'un antigène connu est observée. Il faut également noter une faible diversité des réponses anticorps et le passage d'une réponse de haute affinité contre l'antigène à une réponse de faible affinité. Des perturbations de collaboration entre L_B

et L_T sont observées chez les personnes âgées. La diminution de la production d'IL-2 avec l'âge peut favoriser la baisse de coopération des L_T dans la production des anticorps des L_B .

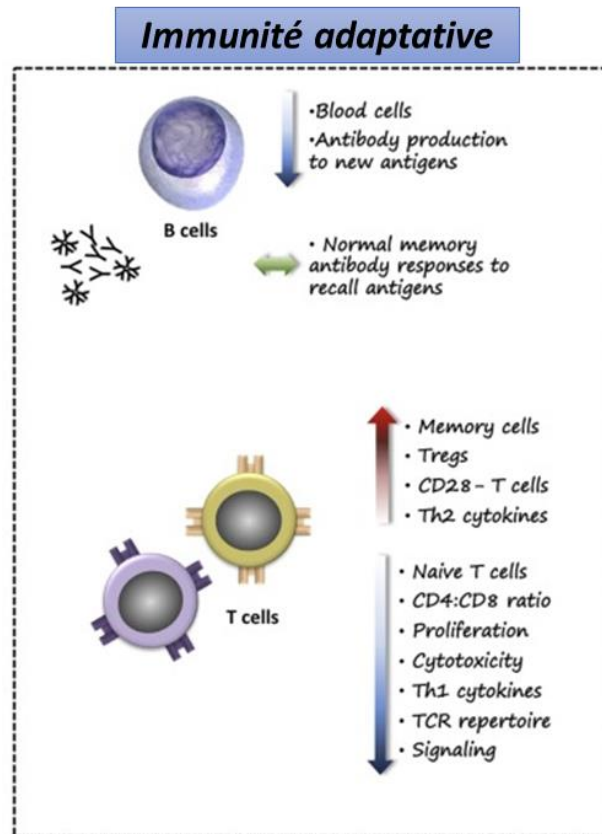


Figure I.16 : Synthèse des changements liés à l'âge au niveau de l'immunité adaptative (Bauer and Fuente, 2016).

3. Interactions entre les différents mécanismes cellulaires

Aucun mécanisme seul n'est capable d'expliquer tous les aspects du vieillissement. Des processus multiples contribuent à ce phénomène. Les mécanismes à contribution majeure sont le stress oxydant et l'inflammation à la base de l'hypothèse de l'« oxi-inflamm-aging ».

L'inflammation et l'oxydation sont deux processus interconnectés. Les cellules immunitaires produisent des ERO qui en activant NF- κ B sur-expriment les gènes pro-inflammatoires permettant aux cellules d'exercer leurs fonctions défensives. La surexpression

de ces espèces est capable d'induire une réponse inflammatoire. Une perte d'homéostasie est liée à l'âge. Elle est traduite par une diminution de l'équilibre entre les ERO et les défenses antioxydantes aboutissant à un stress oxydant chronique. Ce stress est également accompagné de l'altération de l'équilibre entre pro- et anti-inflammation, causant une inflammation chronique. Ces deux stress observés au cours du vieillissement affectent toutes les cellules de l'organisme et en particulier les cellules des systèmes homéostatiques tels que le système nerveux, endocrinien et immunitaire causant des altérations de leurs fonctions.

Partie 5 : Biomarqueurs suite à l'exposition à la pollution atmosphérique

Le terme « biomarqueur » ou « marqueur biologique » est de plus en plus utilisé dans différents domaines d'application aussi bien au cours des études toxicologiques que dans le développement pharmaceutique et la médecine clinique.

Selon le National Institute of Health (NIH), un biomarqueur est « une caractéristique qui est objectivement mesurée et évaluée comme un indicateur de processus biologiques normaux, de processus pathogènes ou de réponses pharmacologiques à une intervention thérapeutique » (Biomarkers Definitions Working Group., 2001). D'après l'organisation Mondiale de la Santé (OMS), « un biomarqueur fait référence à toute substance, structure ou procédé qui peut être mesuré dans le corps ou ses produits et influencer ou prédire l'incidence du résultat ou de la maladie » (WHO, 2001). Une définition plus large fait allusion non seulement à l'incidence et au résultat de la maladie mais aussi aux effets des traitements, des interventions et même de l'exposition environnementale non intentionnelle, par exemple aux produits chimiques ou nutriments. Le biomarqueur correspond à « toute mesure reflétant une interaction entre un système biologique et un risque potentiel, qui peut être chimique, physique ou biologique. La réponse mesurée peut être fonctionnelle et physiologique, biochimique au niveau cellulaire, ou correspondre à une interaction moléculaire » (WHO, 1993).

En toxicologie, les biomarqueurs sont utiles pour la détection précoce des changements liés aux maladies ou à l'exposition aux xénobiotiques via l'étude du mode d'action ou des mécanismes de toxicité. Ils sont également utilisés dans l'évaluation de la relation dose-réponse et dans l'étude des corrélations des différentes étapes des processus liés à la toxicité. Les biomarqueurs conviennent aussi pour l'évaluation de la variabilité individuelle humaine dans la sensibilité ou la susceptibilité aux xénobiotiques. De ce fait, la mesure d'un biomarqueur aide à l'amélioration de l'identification des dangers.

Les biomarqueurs peuvent être classés en fonction des approches utilisées pour les identifier (approche génomique, protéomique et métabolomique). Ils peuvent aussi être répartis sous trois types selon leurs utilités (biomarqueurs d'exposition, d'effet ou de susceptibilité).

1. Classification des biomarqueurs moléculaires

Les biomarqueurs moléculaires ont été découverts en utilisant les technologies « omique » (génomiques, protéomiques, métabolomiques). Ces biomarqueurs reçoivent une grande attention grâce aux connaissances qu'ils peuvent apporter sur les processus fondamentaux de lésions et de mort cellulaire.

1.1. Approche génomique d'identification des biomarqueurs

La génomique, l'analyse du génome, permet d'étudier les réponses altérées des gènes suite aux stimuli chimiques ou physiques. Cette approche est bien développée et les techniques utilisées peuvent détecter les réponses biologiques des cellules au niveau du génome. Les biomarqueurs identifiés par cette approche sont des mesures des modifications d'un génotype ou d'une expression d'un gène spécifique. Ces mesures sont caractéristiques d'un processus biologique, pathogénique ou d'une réponse à une intervention thérapeutique.

Les puces à ADN permettent de suivre le profil d'expression de centaines de gènes en parallèle. A partir de l'ARNm, une retro-transcription permet d'obtenir un ADN complémentaire qui sera mis en contact avec des sondes d'ADN simple brins connues en des endroits précis de la puce. Une hybridation entre la sonde d'ADN et l'ADN complémentaire peut avoir lieu et être quantifiée par la suite. Pour valider un biomarqueur, la RT-PCR reste à ce jour la technique la plus sensible pour détecter et doser de faibles quantités d'ARNm. Il est important de noter que pour l'analyse des données générées par ces techniques, la bioinformatique et les biostatistiques sont indispensables.

1.2. *Approche protéomiques d'identification des biomarqueurs*

La protéomique étudie les variations des taux d'expression des différentes protéines en fonction du temps, de l'environnement de la cellule, de son état de développement, de son état physiologique et pathologique et de l'espèce d'origine. Les biomarqueurs déterminés par cette approche examinent les changements dans les protéines issues des produits génétiques traduits et qui sont réellement synthétisés ou produits en réponse à des agents chimiques.

Différentes techniques sont disponibles pour identifier, doser et mesurer l'activité d'une protéine telle que le gel d'électrophorèse bidimensionnelle, le spectromètre de masse ainsi que les techniques d'immunodosage (puces protéiques).

1.3. *Approche métabolomiques d'identification des biomarqueurs*

La métabolomique consiste à établir le profil d'expression des métabolites endogènes issus des processus biologiques dans les liquides biologiques ou les tissus.

Les techniques de chromatographie gazeuse, liquide couplées à spectrométrie de masse ainsi que la spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN) sont les plus utilisées. Ces techniques suivent les perturbations des voies métaboliques induites par les xénobiotiques ou cherchent à identifier des métabolites générés par ces voies proposant ainsi des biomarqueurs.

2. *Différents types de biomarqueurs*

Les biomarqueurs sont utilisés pour évaluer l'exposition à un xénobiotique, les effets dus à cette exposition et la susceptibilité des individus. On distingue alors trois types de biomarqueurs :

2.1. Biomarqueurs d'exposition

Ces marqueurs indiquent qu'une exposition à un composé a eu lieu par la mesure dans l'organisme de ce composé, de son métabolite ou du produit de l'interaction entre le xénobiotique et la molécule ou la cellule cible (formation d'adduits à l'ADN et aux protéines). La présence de ce type de biomarqueurs indique seulement qu'une exposition a eu lieu mais ne dévoile pas la pertinence biologique telle que la présence d'effets indésirables ou de maladie.

Ces biomarqueurs peuvent être des « biomarqueurs de dose interne » permettant d'estimer la quantité de polluants présents ou l'un de ses métabolites dans l'organisme de l'individu exposé ou des « biomarqueurs de dose biologique active », ceux sont les produits d'interaction entre les xénobiotiques et les macromolécules cellulaires permettant d'estimer la quantité du polluant (ou d'un de ses métabolites) présente au site d'action.

Parmi les différents types, les biomarqueurs d'exposition ont été largement utilisés. La mesure des composés dans les matrices biologiques comme le plomb et la dioxine dans le sang, le mercure dans les cheveux et le cadmium dans l'urine montrent que les substances chimiques sont présentes au niveau de l'organisme mais n'indiquent pas l'implication toxicologique de ces composés. Suite à l'exposition aux HAP, des biomarqueurs tels que la mesure des adduits à l'ADN et aux protéines notamment l'hémoglobine ainsi que la recherche des métabolites dans l'urine ont été proposés dans plusieurs études. Toutefois la préférence reste pour la technique non invasive de collection d'échantillons. La détection dans l'urine du 1-hydroxypyrene (1-OHP), un métabolite du pyrène, est un biomarqueur validé indicateur d'une exposition aux HAP (Klösslová et al., 2016). Après l'exposition à la fumée de cigarette, la nicotine n'est pas indiquée comme biomarqueur vue qu'elle est largement biotransformée en plusieurs métabolites et présente une demi-vie courte (1-2h). Toutefois, la cotinine, un métabolite majeur de la nicotine, est retrouvée dans le sang et l'urine et présente une demi-vie biologique de 16 à 18 heures (Benowitz et al., 2009). Cependant, il s'avère intéressant de doser la cotinine du fait qu'il est le métabolite de nicotine le plus abondant, la cotinine apparaît ainsi comme le biomarqueur idéal pour évaluer l'exposition au tabac. Ce marqueur a été utilisé pour évaluer une exposition récente au tabagisme passif chez les adultes, les enfants et les nouveau-nés (Avila-Tang et al., 2013).

2.2. Biomarqueurs d'effet

Ils font références aux altérations mesurables au niveau de l'organe cible qu'elles soient biochimiques, physiologiques ou comportementales. Ces biomarqueurs peuvent parfois être associés à des déficiences de santé et à des maladies établies ou pouvant l'être. Ces biomarqueurs sont également nommés biomarqueurs de réponse étant donné qu'ils indiquent la réponse de l'individu à l'exposition à des substances chimiques ou suite à un traitement. Cette réponse est montrée par les niveaux d'expression des gènes, la fonction des gènes, les altérations des miARN, etc.

Suite à l'exposition aux particules atmosphériques, des biomarqueurs potentiels liés aux maladies respiratoires ont été proposés tels que les gènes *CYP1A1* et *OGG1* impliqués dans les processus de stress oxydatif et de l'inflammation et liés spécifiquement au cancer des poumons et à l'asthme. Nous pouvons également citer un biomarqueur indicatif du dommage à l'ADN, le 8-OHdG, causé par le stress oxydant pouvant être induit par les métaux entrant dans la composition des particules (Kim et al., 2017a).

Les mutations des gènes spécifiques sont les seuls biomarqueurs d'effet à long terme caractéristiques d'une exposition passée. La mutation du gène suppresseur de tumeur TP53, est spécifique aux mutations directement associées à la cancérogenèse (IARC, 2017).

2.3. Biomarqueurs de susceptibilité

Les biomarqueurs de susceptibilité sont des indicateurs de la capacité inhérente ou acquise d'un organisme à répondre à l'exposition à une substance xénobiotique spécifique. Ce type de biomarqueurs est le moins bien compris.

La détermination de ces biomarqueurs prend en considération les facteurs influençant la cinétique du xénobiotique (son absorption, sa distribution, sa métabolisation et son excrétion) ainsi que sa dynamique (ses effets biologiques). Les différences génétiques dans l'expression des gènes codants les enzymes de métabolisation peuvent être une source majeure de la variation de susceptibilité observée entre les individus. Plusieurs enzymes de

métabolisation sont polymorphes chez l'homme tel que les cytochromes CYP1A1, CYP1A2, CYP2A6, CYP2D6, CYP2E1 et également la glutathionne S-transférase GST, la GSTM1 et la GSTT1.

Les biomarqueurs sont prometteurs pour la détection précoce des effets des xénobiotiques. Pour ce faire, des études de validation sont nécessaires pour que les biomarqueurs atteignent leur potentiel prédictif complet.

3. La validation des biomarqueurs : une étape critique

La validité est une caractéristique complexe qui décrit dans quelle mesure un biomarqueur reflète un événement spécifique (exposition, effet, susceptibilité) dans un système biologique. Il est admis que les marqueurs biologiques validés peuvent apporter une contribution importante à la recherche toxicologique et épidémiologique et également à l'évaluation du risque.

La recherche de biomarqueurs fait inclure presque toute mesure reflétant une interaction entre un système biologique et un agent environnemental tel qu'un xénobiotique. Toutefois pour être validé, les biomarqueurs devraient respecter certains critères. Un biomarqueur doit être :

- *Robuste et persistant*, capable d'être détecté le plus longtemps possible dans la matrice biologique utilisée (cellule, sang, urine...).
- *Non invasif / accessible*, facile à collecter en utilisant des procédures non ou peu-invasives telles que les prélèvements sanguins, les échantillons urinaires, les condensats d'air exhalé ou les sputa.
- *Spécifique*, lié à l'effet cherché. Suite à l'exposition à la pollution atmosphérique, le biomarqueur doit indiquer une exposition ou un effet en lien avec la pollution.
- *Sensible*.
- *Représentatif* de mécanismes biochimiques et des expositions à des doses réalistes.

Suite à la découverte d'un biomarqueur, la technique utilisée pour sa détermination doit être validée. Cette étape de validation analytique consiste à déterminer avec quelle

précision et fiabilité le test utilisé est capable de mesurer le biomarqueur d'intérêt. Afin d'adapter une méthodologie validée, plusieurs paramètres doivent être vérifiés ; la méthode doit être sensible, sélective, précise, exacte, reproductible et stable (Kollipara et al., 2011).

Les biomarqueurs sont des outils indispensables pour prévenir les maladies induites par l'environnement. L'incidence croissante de l'exposition humaine aux polluants environnementaux nécessite l'utilisation de biomarqueurs pour la détection et la prévention précoce des maladies. Toutefois, la pollution atmosphérique est un mélange de différents composés auxquels nous pouvons être exposés. Les modifications observées suite à l'exposition peuvent être liées à la présence des composés présents au sein de la pollution atmosphérique mais aussi par leur pénétration dans l'organisme par d'autres voies comme le tabagisme. Il convient également de noter que même les biomarqueurs couramment utilisés sont loin d'être idéaux et ne vérifient pas la totalité des critères de sélection et de validation. Une combinaison de plusieurs biomarqueurs pour le même composé peut fournir des informations plus précises.

Problématique et objectifs

La pollution atmosphérique est un problème majeur de santé publique. Ce constat confirmé par les nombreuses études menées révèle la lourdeur des conséquences de la pollution atmosphérique sur la santé de l'homme. Parmi les polluants de l'air extérieur, les particules forment un mélange hétérogène avec des caractéristiques physiques, chimiques et biologiques variables. La toxicité des particules atmosphériques dépend majoritairement de ces caractéristiques. Ces particules pénètrent profondément dans le système respiratoire où les plus fines d'entre elles sont capables de se retrouver au niveau des alvéoles et même au niveau de la circulation sanguine. Les systèmes les plus affectés suite à une exposition aiguë ou chronique sont ainsi le système respiratoire et le système cardiovasculaire. Différentes études épidémiologiques ont établi un lien de causalité entre l'exposition aux particules, notamment les particules fines, et l'augmentation du risque de mortalité et morbidité par causes respiratoires et cardiovasculaires.

La question du potentiel toxique des particules fines devient un enjeu majeur de santé publique. Cet enjeu est particulièrement important notamment au niveau des sites identifiés comme étant des « points noirs environnementaux ». Etant influencée par des activités urbaines, le trafic routier, le transport maritime et une zone industrielle importante comprenant une quinzaine d'établissements SEVESO, l'agglomération de Dunkerque représente un site de référence.

Bien que la pollution atmosphérique affecte l'ensemble de la population, son effet est d'autant plus prégnant pour les populations sensibles, telles que les personnes âgées. Différents changements liés à l'âge notamment au niveau du système immunitaire, connus sous le terme d'immunosénescence, augmentent la vulnérabilité de cette population face à la pollution. De ce fait, le vieillissement de la population nous confronte à l'accroissement de l'incidence des pathologies chroniques d'ordre inflammatoire ou tumoral.

L'augmentation de l'incidence de l'exposition à la pollution atmosphérique particulière fine de la population humaine, y compris les populations vulnérables, suscite l'importance de

déterminer des biomarqueurs liés à cette exposition dans le but d'améliorer la détection précoce des changements. Pourtant à l'heure actuelle, il n'existe pas de biomarqueur idéal et validé.

Face à ces constats, deux questions importantes nous semblent émerger :

Les particules fines sont-elles susceptibles de causer des effets toxiques au niveau des lymphocytes ? L'âge possède-t-il une influence sur la réponse des lymphocytes face aux particules fines ?

Ainsi, deux objectifs ont été définis. Dans un premier temps, nous avons cherché à déterminer les changements liés à l'exposition des lymphocytes aux particules fines dans le but d'identifier des biomarqueurs d'effet et/ou d'exposition. Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'influence de l'âge sur la réponse des lymphocytes exposés.

Une stratégie scientifique a été mise en place dans le cadre de ce travail de Doctorat (Figure I.17). Nous avons prélevé des particules fines à Dunkerque pendant un an. Cet échantillon a bénéficié d'une caractérisation physico-chimique détaillée. Par la suite, et afin d'étudier les effets toxiques de ces particules, nous avons exposé ex vivo des lymphocytes isolés de prélèvements sanguins de sujets appartenant à trois classe d'âge contrastées. La recherche des effets liés à l'exposition a été menée sur trois niveaux : (i) l'évaluation de l'activité métabolique des lymphocytes, par détermination de l'expression des enzymes du métabolisme des xénobiotiques ainsi que la réponse au stress oxydant, (ii) le profilage immunologique des lymphocytes via la sécrétion de cytokines et (iii) l'étude de variations épigénétiques telles que l'expression et la modulation d'un panel de miARN.

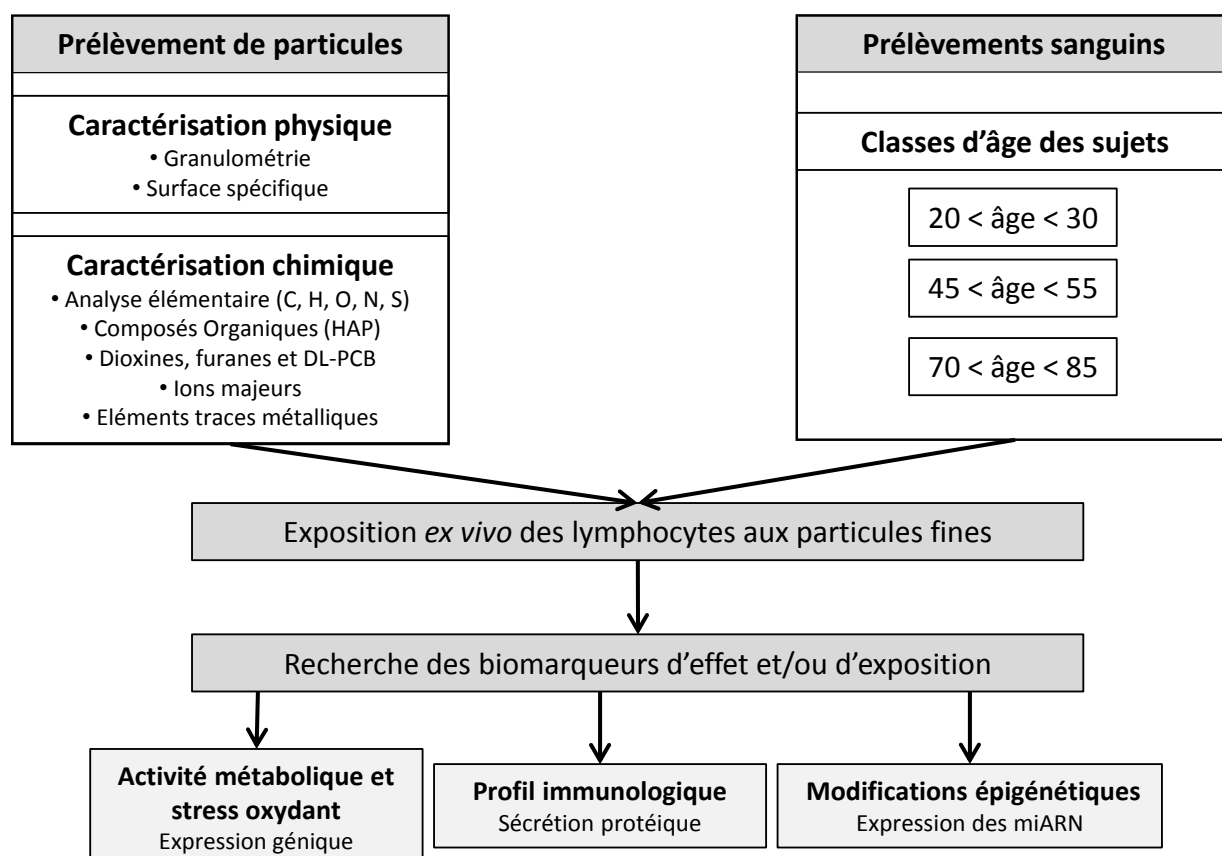


Figure I.17 : Méthodologie générale de l'étude.

CHAPITRE 2 :

MATERIELS ET METHODES

1. Prélèvements des particules

1.1. Site de prélèvement

L'échantillonnage des particules a été effectué à Dunkerque (51°04'N, 2°38'E) (Figure II.18). Cette ville située sur la côte sud de la mer du Nord regroupe environ 90 721 habitants répartis sur 43,89 km² (données de 2014) (Insee, 2016). Toutefois le site d'échantillonnage n'est pas seulement influencé par les activités urbaines. Cette zone est caractérisée d'une part par sa localisation à l'interface France - Belgique - Royaume-Uni avec deux autoroutes fortement fréquentées, A16 (65 000 véhicules/jour) et A25 (153 000 véhicules/jour) (données INSEE, 2006), et d'autre part par sa proximité avec la mer de Nord. Classé comme troisième port en France, le trafic maritime au large de Dunkerque et au niveau du détroit du Pas de Calais est l'un des plus importants au monde pouvant atteindre 800 navires par jour, ce qui correspond à près de 20% du trafic mondial de marine marchande et passagers.

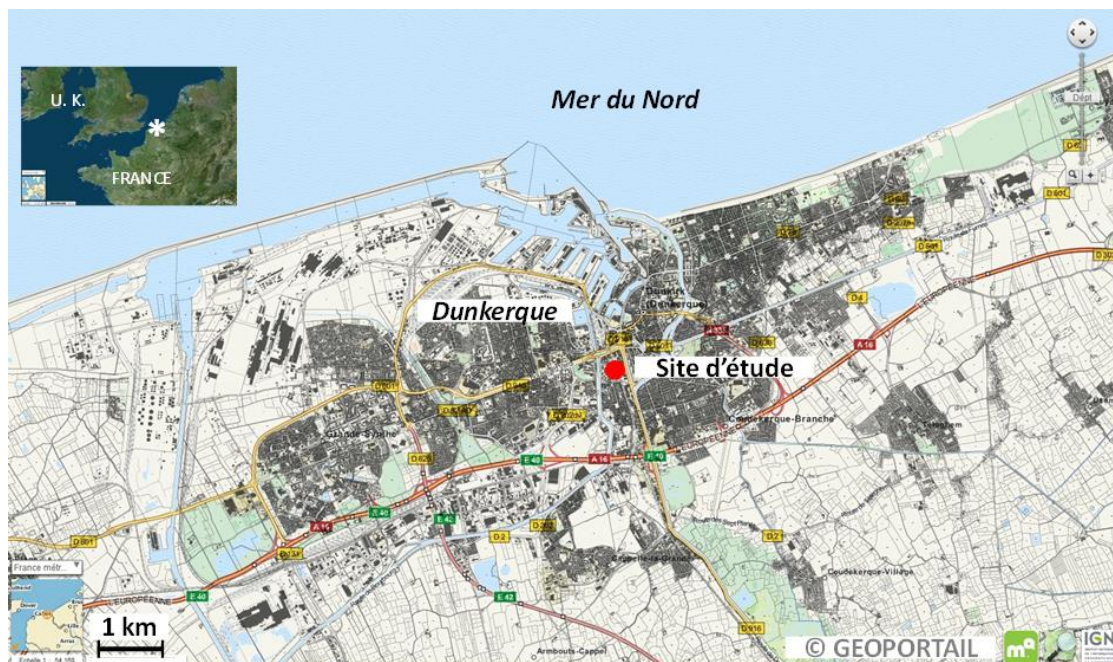


Figure II.18 : Localisation du site de prélèvement des particules atmosphériques (www.geoportail.gouv.fr).

Cette ville dispose également d'une des plus importantes zones industrielles de France. Celle de Dunkerque s'étale sur 7 000 hectares et présente une spécialisation dans le domaine énergétique (pétrole et pétrochimie, gaz, charbon, énergie nucléaire et éolienne), la métallurgie et la sidérurgie. Les activités industrielles offrent près de 20 000 emplois directs et indirects. La zone d'étude comprend une centrale nucléaire et 15 sites classés SEVESO de haut seuil (MEDDE, 2017), présentant des risques d'accidents majeurs impliquant des substances dangereuses. Ces industries se situent sur les communes de Dunkerque, Grande-Synthe, Loon-Plage, Fort-Mardyck, Saint-Pol-sur-Mer et Gravelines (Figure II.19). Elles forment le secteur qui représente près des deux tiers (65%) des émissions de particules PM_{2,5} sur le territoire de la Communauté Urbaine de Dunkerque (CUD), ce qui représente 1219 tonnes émises dans l'atmosphère en 2010 (Figure II.20a) (ATMO, 2012). Tandis qu'au niveau régional, le secteur des industries manufacturières, du traitement des déchets et de la construction forment à eux trois 21% des émissions en deuxième place après la contribution de 41% du secteur résidentiel, tertiaire, commercial et institutionnel (Figure II.20b). L'ensemble de ces données fait de Dunkerque un site d'intérêt particulier en matière de surveillance de la pollution atmosphérique et d'étude de l'évaluation de ses effets sur la santé.

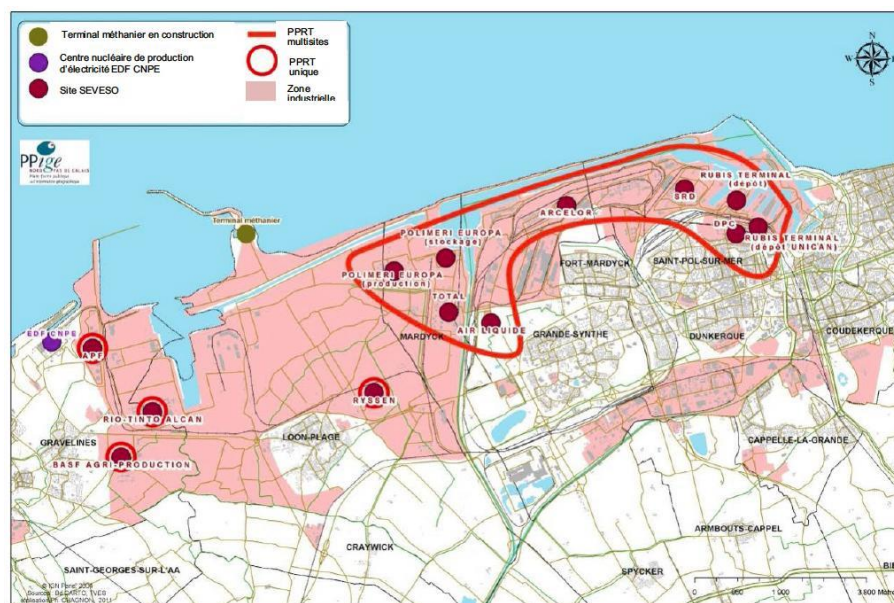


Figure II.19 : Les sites industriels classés SEVESO dans l'agglomération de Dunkerque (Frère and Zwarterook, 2016).

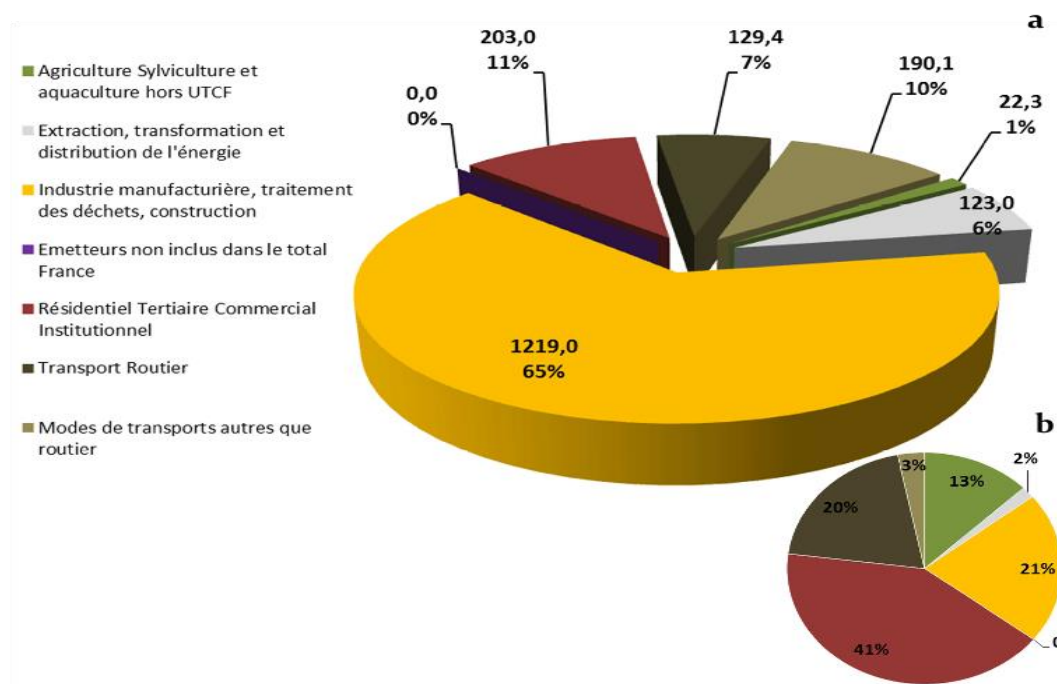


Figure II.20 : Emissions de $PM_{2.5}$ en 2010 sur (a) le territoire de la CUD et (b) comparées avec la région Nord-Pas-de-Calais par secteur et en t/an (ATMO, 2012).

1.2. Les prélèvements de particules atmosphériques

La technique de prélèvement des particules atmosphériques utilisée est basée sur l'impaction en cascade. Elle permet une collecte sélective des particules en fonction de leur diamètre aérodynamique. L'impacteur comporte 5 étages d'impaction (plaques) munis de fentes calibrées dont la largeur diminue en passant d'un étage à l'autre. Un filtre d'arrêt (back up) en fibre de quartz est placé après le cinquième étage et la plaque support afin de collecter les particules inférieures à $0,33 \mu m$. Ces particules, fixées au niveau du filtre, n'ont pu être intégrées dans l'étude toxicologique. Chaque impacteur est lié à une pompe aspirante à haut débit ($68 m^3/h$) modèle TFIA (Staplex, New York, USA) asservie aux conditions de pluviométrie (arrêt de la pompe en cas de pluie) via un système électronique de contrôle. En parallèle, les données météorologiques (direction et vitesse de vent, pluviométrie, température, humidité) ont été enregistrées.

L'impaction en cascade est basée sur le principe de l'inertie des aérosols. Cette méthode repose sur le fait que les particules ayant une inertie supérieure à une certaine

valeur limite ne restent pas dans les lignes de courant de l'air échantillonné. Dans le dispositif, le diamètre de la fente impose une vitesse du flux d'air étant donné que l'on opère à débit constant. Les particules ayant un grand diamètre aérodynamique équivalent D_{ae} petit et une grande inertie vont s'impacter sur la plaque ; les autres, de diamètre plus petit, vont continuer leur trajectoire jusqu'aux étages suivants. D'un étage à l'autre, des particules de plus en plus fines sont donc recueillies (Figure II.21). Le filtre final est destiné à collecter la fraction la plus fine des particules.

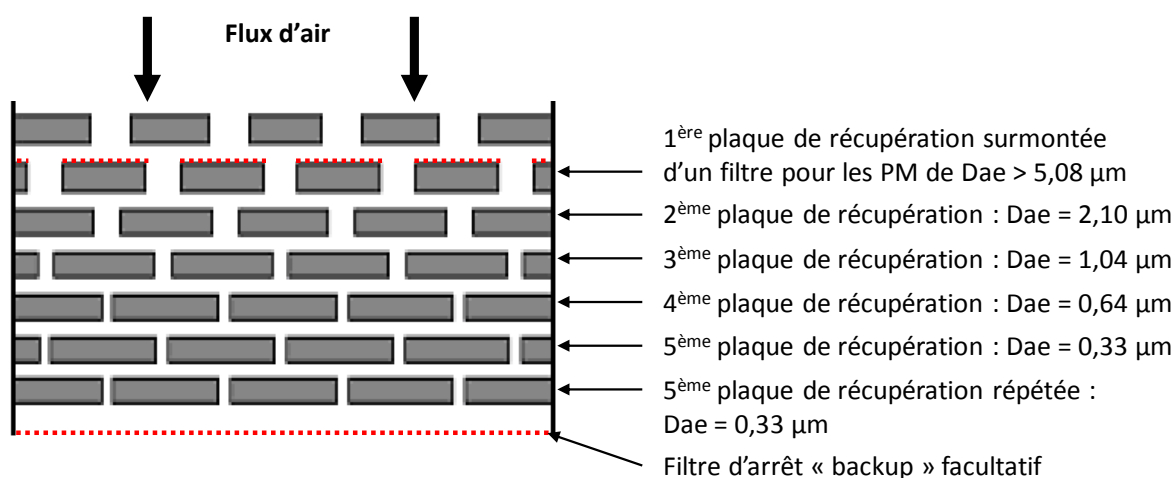


Figure II.21 : Schéma du principe d'impaction en cascade pour le prélèvement de particules atmosphériques. La première plaque de récupération est surmontée d'un filtre qui capte les PM de Diamètre aérodynamique (D_{ae}) supérieur à $5,08 \mu m$ et évite leur rebond sur les plaques suivantes. La cinquième plaque est fréquemment doublée afin d'augmenter le rendement de collecte des particules de diamètre de coupure le plus fin. Un filtre d'arrêt peut également être ajouté afin de collecter les PM dont le D_{ae} trop faible les empêche de s'impacter sur les plaques de récupération.

L'échantillonnage des particules a été réalisé sur une durée d'un an (19 Mars 2014 – 18 Mars 2015). Cette durée de prélèvement assure la représentativité de l'échantillon en intégrant des épisodes de pollution importante et des périodes de plus faibles concentrations en particules atmosphériques. Deux impacteurs de type Sierra 235 (Sierra Anderson, Smyrna, USA), fonctionnant à haut débit (Pompe Staplex $68 m^3/h$) ont été utilisés en alternance (avec une récupération des échantillons tous les 15 jours).

Avant chaque prélèvement, les plaques d'impaction sont lavées au détergent pour bain à ultrason (*Nettoyant Microson*, Thermofisher Scientifique, France), rincées plusieurs fois

à l'eau ultra pure et puis séchées. Chaque système d'impaction est scellé dans un sachet hermétique avant d'être transporté sur le site de prélèvement.

A chaque remplacement du système de plaque d'impaction, une vérification du débit de chaque pompe est effectuée. Un débit supérieur à 68 m³/h doit toujours être maintenu pour assurer le respect des diamètres de coupure des plaques d'impaction. La tête de l'impacteur est ramenée au laboratoire où les plaques et les filtres sont mis à sécher sous la hotte à flux laminaire pendant 48h. Après séchage, les particules sont récupérées à l'aide d'un pinceau, placées dans des tubes puis conservées à -20°C jusqu'à utilisation. Un échantillon annuel moyen a été préparé à partir des échantillons recueillis en vue de la caractérisation physico-chimique et de l'étude toxicologique.

Durant un an d'échantillonnage, une masse totale de 4,3 g de particules fines PF a été prélevée. Sur la même période, la concentration moyenne de PF était de 16,6 µg/m³, selon les données recueillies dans une station de typologie urbaine à Dunkerque du réseau de mesures Atmo Nord-Pas-de-Calais. Cette concentration moyenne est inférieure à la limite annuelle de 25 µg/m³ en vigueur en France depuis le 1^{er} Janvier 2015, même si des épisodes de pollution plus intenses ont entraîné des pics de concentration.

1.3. *Caractéristiques physico-chimiques*

La caractérisation physico-chimique de l'échantillon moyen annuel de particules fines PF a été réalisée par le Centre Commun de Mesure (CCM) de l'ULCO et par l'équipe de Chimie et Toxicologie des Emissions Atmosphériques (CTEA) de l'UCEIV. Les principales caractéristiques physico-chimiques des échantillons de PF sont décrites par la suite ainsi que les techniques utilisées.

1.3.1. *Caractéristiques physiques*

1.3.1.1 *Granulométrie des particules*

Afin de vérifier la sélectivité de la méthode d'échantillonnage, en particulier au niveau du diamètre des particules ciblées, la distribution en taille des particules a été mesurée par granulométrie laser, une technique basée sur la diffraction de la lumière. La taille de la

particule peut être déterminée en mesurant l'intensité du rayonnement diffracté et l'angle de diffraction lorsqu'un rayon laser éclaire la particule.

La distribution en taille des particules prélevées représentée sur la Figure II.22 montre que 98,0% des particules présentent un diamètre $< 1 \mu\text{m}$ et 99,8% d'entre elles un diamètre $< 2,5 \mu\text{m}$. Ces résultats vérifient la sélectivité de notre technique d'échantillonnage qui nous a permis de récupérer les particules au diamètre désiré ($D_{ae} < 2,5 \mu\text{m}$).

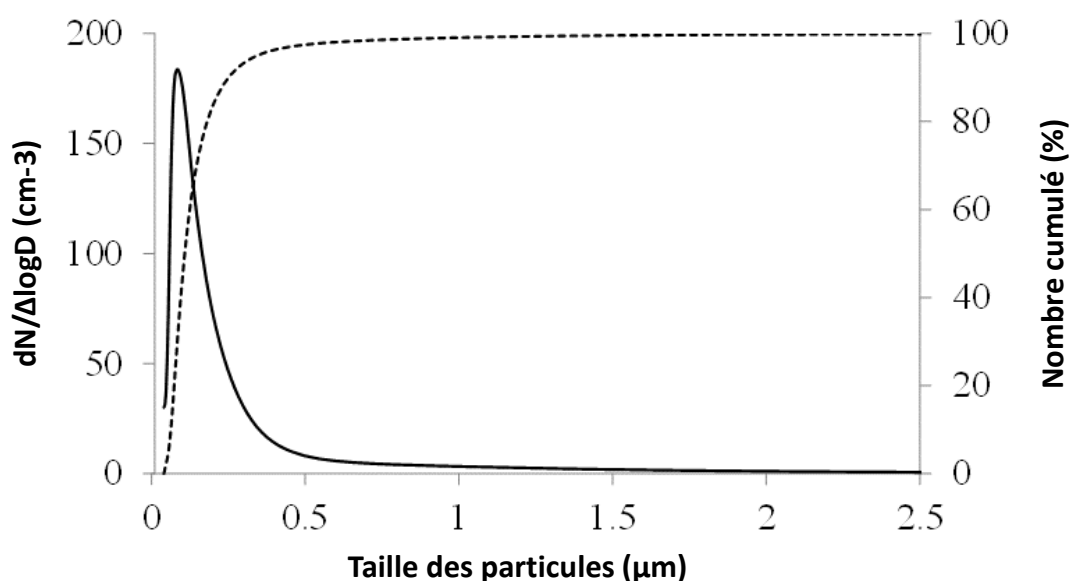


Figure II.22 : Distribution en taille de l'échantillon de PF collecté à Dunkerque de Mars 2014 à Mars 2015.

1.3.1.2 Surface spécifique

La surface spécifique constitue un indicateur de la capacité d'adsorption des particules. Elle a été déterminée par la méthode de Brunauer, Emmett et Teller (BET) basée sur la mesure de la quantité d'azote qui peut être physisorbée à basse température sur la surface d'un solide.

La valeur d'aire spécifique des PF atteint $2 \text{ m}^2/\text{g}$. Cette valeur peut apparaître faible, toutefois, cette mesure est réalisée sur des particules de la gamme de taille allant de $0,3$ à $2,5 \mu\text{m}$. Les particules ultrafines, qui contribuent le plus à la surface spécifique des particules, ne

sont par conséquent pas prises en compte dans cette mesure. Par ailleurs, comme sera présenté ci-dessous, l'échantillon contient également des particules riches en espèces minérales, connues pour présenter une faible aire spécifique alors qu'en revanche, le noir de carbone présent dans les particules devrait contribuer dans le sens d'une augmentation de la surface spécifique. Néanmoins, il a été montré que les composés organiques fortement liés à la surface des particules occupaient des sites d'adsorption, abaissant de ce fait la surface spécifique (Billet et al., 2007).

1.3.2. Caractéristiques chimiques

Afin d'identifier les teneurs en espèces ioniques hydrosolubles, une lixiviation de l'échantillon a été réalisée sur une prise d'essai de 30 mg de particules pour 15 mL d'eau ultrapure. L'extrait obtenu a été filtré et analysé par chromatographie ionique (modèle ICS 5000, ThermoElectron).

Concernant la détermination de la teneur en éléments majeurs et éléments traces métalliques, une minéralisation acide de l'échantillon a été réalisée sur une prise d'essai de 30 mg de particules afin de déterminer la teneur totale en éléments. La solution obtenue a été analysée par ICP-AES (modèle 6300 DUO, ThermoElectron). La fraction hydrosoluble a également été étudiée en utilisant l'extrait aqueux réalisé pour le dosage des ions.

Les concentrations des espèces ioniques hydrosolubles, des éléments majeurs et éléments traces identifiés dans l'échantillon de PF sont données dans le Tableau II.6.

Dans l'échantillon de PF, les ions nitrates (NO_3^-), sulfates (SO_4^{2-}), chlorure (Cl^-), calcium (Ca^{2+}) et sodium (Na^+) présentent les teneurs les plus élevées, suivis par les éléments métalliques Fe et Al. On note une assez forte solubilité des éléments suivants : Mn, Mo et Sr. La solubilité des autres éléments majeurs que sont Al, Fe, P, Zn, Cu est faible et ne dépasse pas 2%. Ces composés pourraient alors demeurer sous forme particulaire dans les fluides biologiques.

Les espèces NO_3^- , SO_4^{2-} et NH_4^+ représentent essentiellement des ions inorganiques secondaires qui proviennent respectivement de la conversion des espèces gazeuses NO_x , SO_2 et NH_3 reliées principalement aux activités humaines (processus de combustion utilisant des énergies fossiles dans l'automobile ou l'industrie, agriculture,...).

Les espèces Na^+ , Mg^{2+} et Cl^- sont connues pour être associées aux aérosols marins, dont la contribution peut être significative sur le site d'étude en raison de sa proximité avec l'espace Manche-Mer du Nord. La valeur du ratio Cl^-/Na^+ observé ici de 1,41 (contre 1,8 dans l'eau de mer), ce qui tend à montrer que des aérosols marins fraîchement émis ont été majoritairement collectés sur notre site d'étude, en lien avec la proximité de la façade maritime (Seinfeld and Pandis, 2006).

Les ions K^+ identifiés ont également en partie une origine marine, mais peuvent aussi être produits par certaines activités industrielles, comme l'agglomération de minerais dans l'industrie sidérurgique (Hleis et al., 2013).

En ce qui concerne les éléments métalliques mesurés, Al et Fe peuvent provenir d'émissions industrielles issues des activités sidérurgiques, métallurgiques ou cimentières. Toutefois ces éléments, avec le Ca^{2+} peuvent avoir des origines crustales traduisant en particulier l'exposition du site d'études à des réenvols de particules issues du sol. Les métaux Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, V et Zn sont très majoritairement associés à des origines anthropiques. Les éléments Ni, Co et V peuvent être considérés comme des traceurs de la combustion de fioul lourd (Mazzei et al., 2008), tandis que les éléments Zn, Pb, Cr et Cu sont davantage associés à l'usure de pièces des véhicules comme les freins et les pneus (Gietl et al., 2010; Thorpe and Harrison, 2008b). La présence de Ba peut trouver son origine dans les émissions des véhicules, ce métal étant retrouvé dans les huiles moteur. Dans le cadre d'une étude réalisée sur le dunkerquois sur l'origine des éléments métalliques retrouvés dans les particules, la présence des espèces Pb, Zn, Cr et Mn a pu également être reliée à l'activité sidérurgique, et en particulier pour le Zn, à la présence d'une aciérie électrique (Kfoury et al., 2016b), et pour le Mn, à la métallurgie du manganèse (Hleis, 2010).

Tableau II.6 : Teneurs en éléments majeurs, traces métalliques et espèces ioniques dans la fraction totale de l'échantillon de PF collecté à Dunkerque de Mars 2014 à Mars 2015 et dans la fraction hydrosoluble.

	Concentration (µg/g)	
	Fraction totale	Fraction soluble
Fe	37 530	<5
Al	28 026	11,2
Mn	1 767	627
P	1 345	9,9
Zn	1 293	24,2
Cu	639	14,2
Ti	369	<5
Ba	331	41,5
Pb	234	<5
Cr	144	<5
Sr	126	97,2
Ni	116	4,7
V	108	<5
Sn	78,3	<5
Mo	30,3	9,9
As	13,9	<5
Co	8,7	<5
Cd	6,3	<5
NO ₃ ⁻		100 400
SO ₄ ²⁻		75 200
Cl ⁻		60 900
Ca ²⁺		44 600
Na ⁺		43 300
NH ₄ ⁺		16 400
Mg ²⁺		6 500
K ⁺		4 500
F ⁻		200

1.3.2.1 Identification des phases cristallines

Des éléments associés l'un à l'autre dans l'état solide peuvent se retrouver dans un état cristallisé. La diffraction des rayons X est alors une technique non destructive et appropriée pour l'identification des phases cristallines. Le recours à ce type d'analyse est une façon d'obtenir une information sur la forme chimique des éléments détectés et selon la nature des phases identifiées, de déduire l'origine et le mode de formation de certaines particules. La Figure II.23 représente le diffractogramme de l'échantillon de particules fines. L'analyse par diffraction de rayons X a été réalisée sur un diffractomètre BRUKER D8 Advance utilisant la radiation Cu K α ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$) dans une gamme de 2θ allant de 10° à 70° , un temps par pas de $0,02^\circ$ et un temps d'intégration de 15 s.

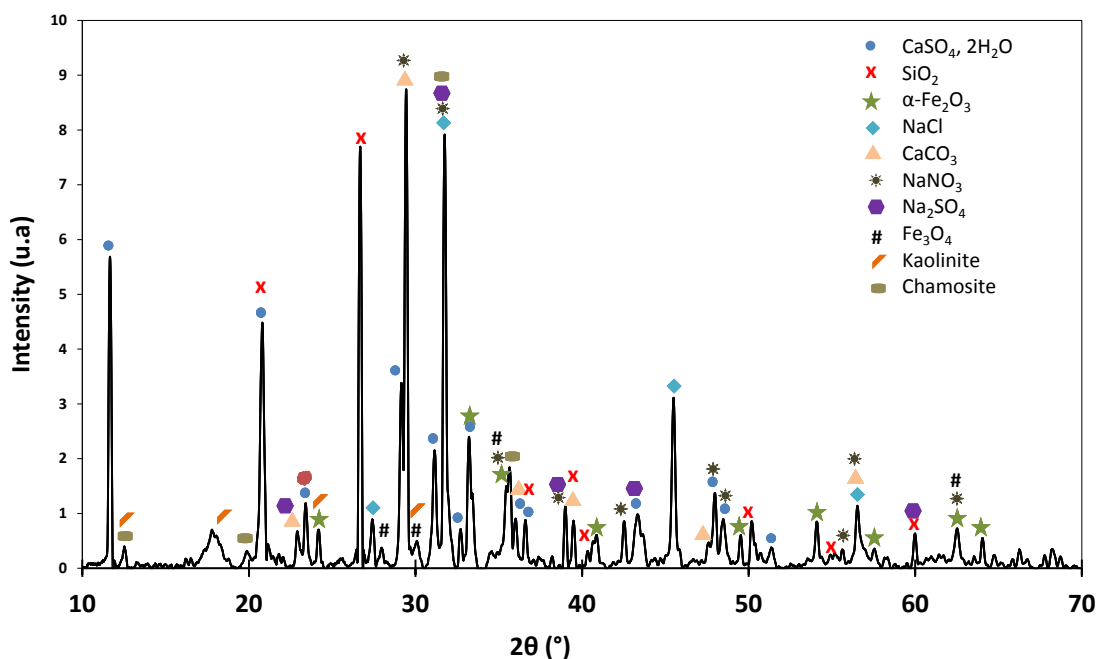
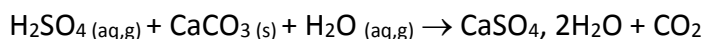


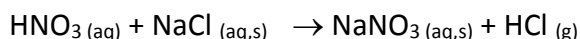
Figure II.23 : Diffractogramme de rayons X de l'échantillon de PF collecté à Dunkerque entre mars 2014 et mars 2015.

En premier lieu pour les phases contenant du calcium, le carbonate de calcium CaCO_3 est un composé ayant une origine essentiellement crustale et se retrouverait dans les particules atmosphériques suite à une remise en suspension des particules de sol. Il peut être précisé que la zone littorale de notre région est caractérisée par la présence de sols riches en carbonate de calcium. Rappelons également que notre site d'étude possède une zone

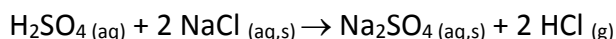
industrielle dans laquelle ce même carbonate de calcium est une matière première utilisée dans l'industrie sidérurgique. L'origine du gypse $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ peut être multiple. Celui-ci peut provenir d'une part de poussières issues de matériaux de construction (Sturges and Harrison, 1989), il est également une matière première dans l'industrie cimentière et d'autre part, il peut être formé par l'intermédiaire de réactions dans l'atmosphère entre la calcite CaCO_3 et l'acide sulfurique ou le dioxyde de soufre SO_2 (Mori et al., 1998) selon la réaction suivante :



La détection de chlorure de sodium (NaCl), de thermadite (Na_2SO_4) et de nitratine (NaNO_3) s'explique par la présence de sels marins primaires (NaCl) et anthropisés (NaNO_3 , Na_2SO_4) dans les particules atmosphériques selon la réaction suivante :



Selon un mécanisme assez similaire, l'oxydation de SO_2 , essentiellement d'origine industrielle, et la condensation de vapeurs de H_2SO_4 sur des sels marins conduisent à la formation de Na_2SO_4 selon la réaction suivante :



Deux oxydes de fer ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ et Fe_3O_4) ont été détectés dans les particules. Le premier correspond à l'hématite $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$, qui est la phase cristalline d'oxyde de Fe la plus fréquemment rencontrée dans des échantillons de particules atmosphériques (Querol et al., 1996). Il s'agit d'un composé qui est, d'une part rencontré à l'état naturel dans des sols ferrugineux et, d'autre part présent dans des émissions anthropiques provenant de l'usure de pièces métalliques comme les freins des véhicules (Gietl et al., 2010), dans les cendres (Winburn et al., 2000) ou encore dans des particules d'origine sidérurgique (Hleis et al., 2013). La magnétite Fe_3O_4 correspond à une forme partiellement réduite de l'oxyde de fer (présence de Fe(II) et Fe(III)) et son origine est essentiellement anthropique. En particulier, il a été montré dans une étude antérieure menée au laboratoire sur les caractéristiques des émissions sidérurgiques, la présence de cette phase dans des émissions reliées à des procédés à très haute température, comme les émissions issues de hauts-fourneaux et d'aciérie (Hleis et al., 2013). Cette question sera décrite de manière plus approfondie dans la partie présentant les résultats de microscopie électronique à balayage.

Enfin, trois phases cristallines contenant du silicium ont été mises en évidence : SiO_2 , $\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$ et $(\text{Fe}_5\text{Al})(\text{AlSi}_3)\text{O}_{10}(\text{OH})_8$. La silice et les aluminosilicates sont des composés

majoritaires du sol et la détection de ces phases révèle la présence de particules d'origine crustale mises en suspension dans l'air et se retrouvant dans les PF. Néanmoins, le composé $(\text{Fe}_5\text{Al})(\text{AlSi}_3)\text{O}_{10}(\text{OH})_8$ n'est pas recensé en tant que phase principale du sol de la région Hauts de France. En revanche, on ne peut exclure que sa présence s'explique par sa manipulation en tant que matière première utilisée en sidérurgie.

1.3.2.2 Taille, morphologie et degré d'agglomération des particules

L'échantillon PF a été examiné en microscopie électronique à balayage de façon à retirer des informations sur la taille des différents types de particules, leur morphologie, ou encore leur degré d'agglomération. Les principales observations sont présentées sur la Figure II.24.

Deux types de particules contenant le sodium ont été mis en évidence, avec dans le premier, une association avec l'élément Cl (Figure II.24a) et dans le second une association avec l'élément S (Figure II.24b). Les particules correspondantes présentent une forme anguleuse de type parallélépipédique ou hexagonale avec une taille comprise entre 1 et 2 μm . Dans les deux cas, la forme géométrique des particules est cohérente avec un état cristallisé de ces particules comme cela a été mis en évidence par DRX. Ces particules correspondent aux sels marins primaires (NaCl) et marins anthropisés (Na_2SO_4), comme précédemment décrit. Les clichés c et d de la Figure II.24 montrent la présence de particules sans forme particulière, de composition riche en Si (Figure II.24c) ou associant les éléments Si et Al, de même que les éléments Ca et Fe dans de moindres proportions. Ces observations sont compatibles avec la présence de particules crustales riches en SiO_2 et en aluminosilicates, également en accord avec les données de DRX. Les clichés e et f correspondent tous deux à des particules riches en Fe, de type oxyde de fer, mais présentent une morphologie très différente. Les particules riches en Fe de forme anguleuse peuvent être attribuées à des particules crustales, de minerais de fer ou encore reliée à l'usure de pièces métalliques. La présence de particules de forme sphérique est reliée à un mode de formation spécifique faisant appel à un procédé à haute température (Machemer, 2004). Des microsphères et nanosphères se forment lors du refroidissement et de la condensation des émissions dans l'air. La présence de ces particules sur notre site d'étude s'explique majoritairement par la proximité de sources d'émissions sidérurgiques (hauts-fourneaux et aciérie) mais une

contribution de cendres domestiques ne peut cependant être exclue. Le cliché g présente des particules de forme anguleuse, compactes et riches en Ca et S, de taille comprise entre 2 à 5 μm et pouvant être attribuées au gypse $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Figure II.24g). Enfin, le cliché h montre des particules riches en carbone de taille proche de 100-200 nm liées entre elles pour former des chaînes de particules. Ces particules anthropiques sont caractéristiques des suies. Elles peuvent avoir une origine industrielle mais il est bien connu que le trafic routier utilisant le diesel est un émetteur principal de ce type de particules (Ambrogio et al., 2002).

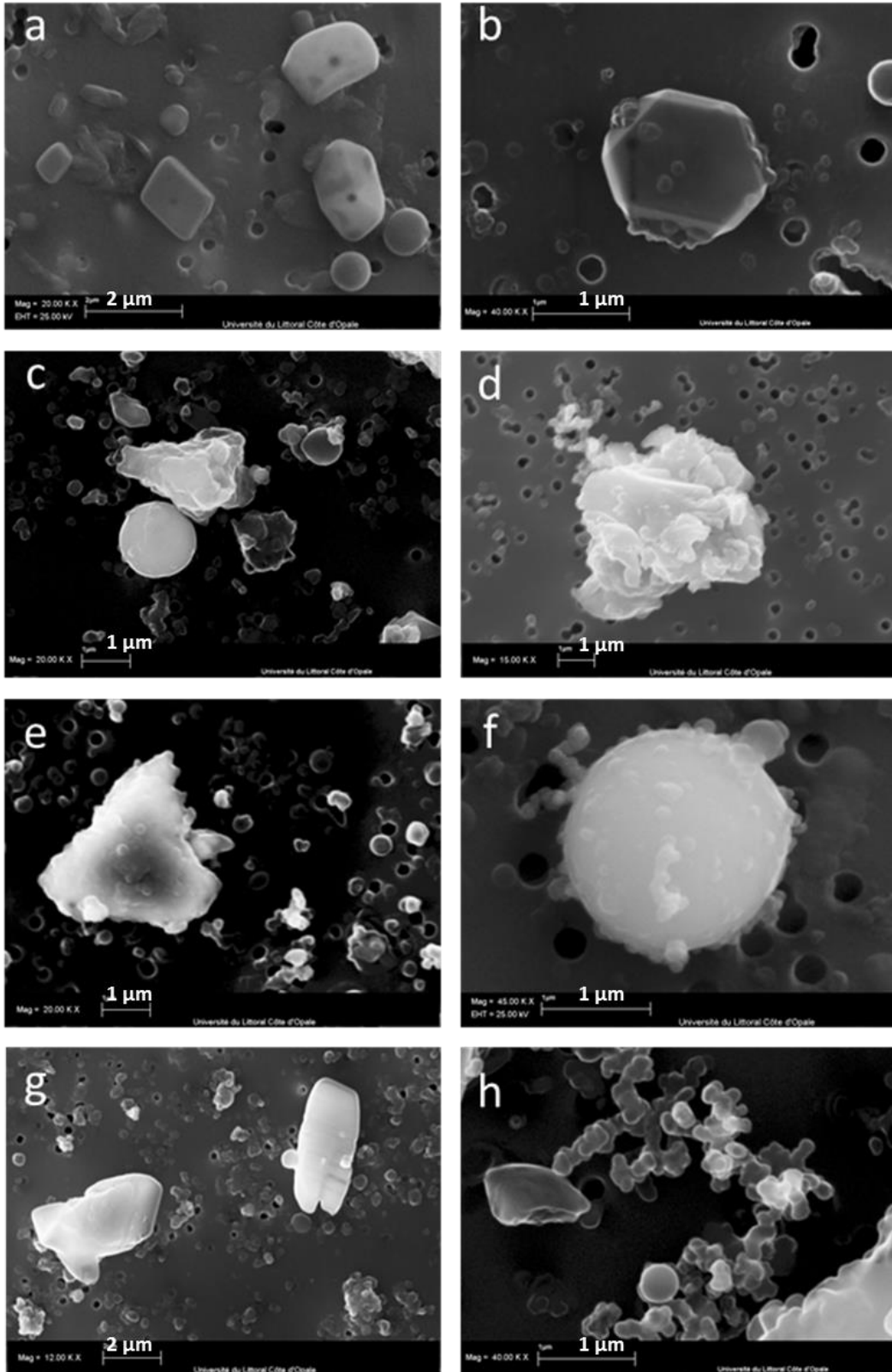


Figure II.24 : Images de microscopie électronique à balayage des PF collectées à Dunkerque entre mars 2014 et mars 2015 (cliché a : Association Na avec Cl ; b : Association Na avec S ; c : particules riches en Si ; d : association Si avec Al ; e et f : particules riches en Fe ; g : particules riches en Ca et S ; h : particules riches en carbone).

1.3.2.3 Dioxines, furanes et polychlorobiphényles

Les analyses de dioxines, furanes et polychlorobiphényles ont été réalisées par GC/MS haute résolution par Micropolluants Technologies SA (Saint Julien lès Metz, France).

Les 209 congénères de PCB sont répartis selon 2 catégories établies en prenant en compte uniquement leurs effets tératogènes : les PCB de type dioxine (PCB Dioxine-Like ou encore DL-PCB), et les autres PCB (PCB Non Dioxin-Like ou encore NDL-PCB). Les DL-PCB ont une configuration plane, très comparable aux dioxines. Parmi ceux-ci, 12 congénères sont considérés comme étant les plus toxiques (4 composés ortho : 77, 81, 126 et 169 ; et 8 composés non-ortho : 105, 114, 118, 123, 156, 157, 167 et 189).

En 1982, 7 PCB, appelés PCB indicateurs (PCBi) ont été sélectionnés parmi les 209 congénères par le Bureau Communautaire de Référence de la Commission Européenne (Bruxelles) comme étant les composés à rechercher en priorité dans les analyses de matrices organiques (sédiment, sang, chair et graisse) en raison de leur persistance et de leur abondance dans l'environnement ainsi que pour leurs propriétés toxicologiques. Les « PCB indicateurs » représentent près de 80 % des PCB totaux : le plus souvent les 118, 138, 153 et 180 mais aussi les 28, 52 et 101. Parmi les PCBi, seul le PCB 118 est un PCB-DL.

Les concentrations en dioxines, furanes et PCB mesurées dans l'échantillon de PF collecté sont présentées dans le

Tableau II.7. Les concentrations en PCB, dioxines et furanes dans les divers compartiments de l'environnement sont en général exprimées en équivalent toxique (I-TEQ : International Toxic Equivalent) défini par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Pour un mélange donné, le calcul en équivalent toxique (TEQ) consiste à multiplier la concentration de chaque molécule par son facteur d'équivalent toxique (TEF) puis à sommer l'ensemble des contributions.

Tableau II.7 : Teneurs en dioxines, furanes et polychlorobiphényles de l'échantillon de PF collecté à Dunkerque de Mars 2014 à Mars 2015 (<LD : concentration inférieure à la limite de détection).

	Composé	Concentration (pg/g)	TEF	TEQ fg/m ³
PCB-DL	PCB81	<LD	0,0003	<LD
	PCB77	451	0,0001	0,00082
	PCB123	52	0,00003	0,00003
	PCB118	5 752	0,00003	0,00314
	PCB114	<LD	0,00003	<LD
	PCB105	3 044	0,00003	0,00166
	PCB126	154	0,1	0,28028
	PCB167	615	0,00003	0,00034
	PCB156	1 651	0,00003	0,00090
	PCB157	408	0,00003	0,00022
	PCB169	<LD	0,03	<LD
	PCB189	<LD	0,00003	<LD
	Total	12 127		
	I-TEQ / g PM	15,8 pg		0,2874
PCBi	PCB28	1 297		
	PCB52	2 827		
	PCB101	4 014		
	PCB138	9 419		
	PCB153	11 570		
	PCB180	8 390		
	Total	37 517		
Dioxines	2,3,7,8 TCDD	<LD	1	<LD
	1,2,3,7,8PeCDD	84	1	1,5288
	1,2,3,4,7,8HxCDD	<LD	0,1	<LD
	1,2,3,6,7,8HxCDD	81	0,1	0,14742
	1,2,3,7,8,9HxCDD	1 864	0,1	3,39248
	1,2,3,4,6,7,8HpCDD	3 587	0,01	0,65283
	OCDD	8 521	0,0003	0,04653
	Total	14 137		
Furanes	2,3,7,8 TCDF	116	0,1	0,21112
	1,2,3,7,8PeCDF	225	0,03	0,12285
	2,3,4,7,8PeCDF	456	0,3	2,48976
	1,2,3,4,7,8HxCDF	<LD	0,1	<LD
	1,2,3,6,7,8HxCDF	<LD	0,1	<LD
	2,3,4,6,7,8HxCDF	312	0,1	0,56784
	1,2,3,7,8,9HxCDF	166	0,1	0,30212
	1,2,3,4,6,7,8HpCDF	678	0,01	0,12340
	1,2,3,4,7,8,9HpCDF	850	0,01	0,15470
	OCDF	1 051	0,0003	0,00574
	Total	3 855		
Dioxines et Furanes	I-TEQ / g PM	534,9		9,7456

1.3.2.4 Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

Après extraction Soxhlet des PF au dichlorométhane, puis concentration de l'extrait sous flux d'azote et analyse par GC-MS (model 1200 TQ, Varian, USA), nous avons recherché les teneurs en HAP de cet échantillon. Les concentrations déterminées pour les 16 HAP prioritaires listés par l'United States Environmental Protection Agency (USEPA) sont données dans le Tableau II.8.

Les composés majoritairement détectés sont le dibenz[a,h]anthracène (8,9 µg/g), devant l'indéno[1,2,3-c,d]pyrène, le chrysène et le benzo[b]fluoranthène, avec des concentrations très proches et comprises entre 5,3 et 6,0 µg/g. Les autres composés montrent des concentrations inférieures à 5 µg/g, et les 6 HAP les plus légers sous 1 µg/g. La principale source de dibenz[a,h]anthracène tout comme celle de benzo[b]fluoranthène est constituée des fumées d'échappement des moteurs Diesel (Duval and Friedlander, 1981). On retrouve également ce composé dans la fumée de cigarette ou encore les émissions de cokerie (INERIS, 2006). L'indéno[1,2,3-c,d]pyrène est lui aussi principalement présent dans les combustibles fossiles. Il peut se retrouver dans l'atmosphère lors de la combustion incomplète de bois, de charbon, de carburant essence ou diesel (INERIS, 2005). Le chrysène, quant à lui, est formé avec d'autres HAP lors de la distillation du charbon et lors de la distillation ou pyrolyse de graisses et d'huiles. Le chrysène est présent à des concentrations plus élevées que la plupart des autres HAP dans les combustibles fossiles tels que l'huile brute. Il fait aussi partie des HAP prédominants dans les émissions particulières provenant des incinérateurs d'ordures ménagères, des appareils ménagers à gaz naturel et des dispositifs de chauffage domestique, en particulier ceux utilisant la combustion du bois (INERIS, 2011).

Rappelons que parmi les activités industrielles présentes autour de l'agglomération dunkerquoise, figurent la sidérurgie intégrée (comprenant une cokerie), le raffinage de pétrole (en particulier spécialisé dans la production de combustibles marins assimilables à des huiles lourdes), un incinérateur de déchets. Les composés majoritairement détectés sont donc en cohérence avec l'implantation industrielle sur le territoire.

Le calcul du ratio CPAH/TPAH (HAP liés à la combustion / HAP Totaux) donne une valeur de 0,76. La littérature donne les valeurs de référence suivantes : 0,7 pour une zone urbaine et 0,96 pour une zone hautement industrialisée (Gogou et al., 1996; Yue and Fraser, 2004). Les

valeurs calculées pour nos échantillons sont donc plutôt caractéristiques d'un environnement urbain.

Le calcul de ratios de HAP plus spécifiques ne contredit pas les hypothèses avancées pour expliquer l'origine des HAP avec un ratio $\text{InPy}/(\text{InPy}+\text{B[ghi]P}) = 0,58$, compatible avec les émissions diesel (0,35-0,70) (Ravindra et al., 2008), mais aussi avec les émissions associées à la combustion du charbon ($>0,50$) (Chen et al., 2014a). Le ratio $\text{B[a]P}/\text{B[ghi]P} = 0,87$ est, quant à lui, dans la gamme 0,6-1,7 caractéristique de l'activité de raffinage (Masclét et al., 1986). Le ratio $\text{Fla}/(\text{Fla}+\text{Pyr}) = 0,55$ est lui aussi compatible avec la combustion de charbon (De La Torre-Roche et al., 2009). En conclusion l'étude des ratios HAP met en évidence la contribution majoritaire des émissions des moteurs diesel, ainsi que celles de l'activité industrielle relative à la sidérurgie (cokerie) et au raffinage de pétrole.

Les niveaux de concentration mesurés apparaissent en accord avec une précédente étude réalisée à dunkerque au printemps 2011 (Landkocz et al., 2017). Néanmoins, les ratios caractéristiques à l'époque étaient quelque peu différents sans toutefois remettre en cause les sources identifiées. Les particules caractérisées dans l'étude citée ont en effet été prélevées durant une plus courte durée et ne représentent pas une année complète contrairement aux PF étudiées dans le présent travail.

Tableau II.8: Teneurs en Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques ($\mu\text{g/g}$) de l'échantillon de PF collecté à Dunkerque de Mars 2014 à Mars 2015 (<LD : inférieur à la limite de détection).

	Concentration ($\mu\text{g/g}$)
Naphtalène (Nap)	0,20
Acénaphthylène (Acy)	0,11
Acénaphthène (Ace)	<LD
Fluorène (Flu)	0,18
Phénanthrène (Phe)	0,99
Anthracène (Ant)	0,28
Fluoranthène (Fla) ¹	2,12
Pyrène (Pyr) ¹	1,76
Benz[a]anthracène (B[a]A) ¹	1,91
Chrysène (Chr) ¹	5,45
Benzo[b]fluoranthène (B[b]F) ¹	5,30
Benzo[k]fluoranthène (B[k]F) ¹	1,66
Benzo[a]pyrène (B[a]P) ¹	3,85
Indeno[1,2,3-c,d]pyrène (InPy) ¹	6,06
Dibenz[a,h]anthracène (D[ah]A)	8,88
Benzo[g,h,i]pérylène (B[ghi]P) ¹	4,43

¹HAP associé à la combustion

2. **Prélèvements sanguins**

2.1. **Recrutement des sujets**

Ce travail s'inscrit dans le cadre du projet de recherche Aerotox 2, une étude prospective pilote des effets *ex vivo* de la pollution atmosphérique particulaire. L'investigateur principal est le Dr Pierre Gosset (UCEIV et Service d'anatomie pathologique, Hôpital Saint Vincent de Paul, Groupement des Hôpitaux de l'Institut Catholique de Lille, GHICL). Le Responsable scientifique est le Dr Sylvain Billet (UCEIV). Suite à l'accord du Comité pour la Protection des Personnes Nord-Ouest (CPP) (ECH 15/39 du 10/09/2015), le recrutement de 105 volontaires a été déclenché par le Centre Nutrition Clinique Naturalpha, installé au sein de l'Hôpital Saint Vincent de Paul (GHICL), parmi les sujets présents dans sa base de données, sous l'encadrement des Dr Xavier Deplanque, Philippe CLADET et Antonio CUENCA, puis pour des raisons organisationnelles directement dans les services du GHICL, notamment le Service de médecine interne et gériatrie de l'Hôpital Saint Philibert, sous l'encadrement des Dr Céline Delecluse et Fabien Visade.

Le recrutement des volontaires s'est fondé sur des critères d'inclusion et d'exclusion précis, que rappelle le Tableau II.9. L'objectif du projet de recherche étant d'une part de déterminer les changements liés à l'exposition des L_T aux particules fines dans le but d'identifier des biomarqueurs d'effet et/ou d'exposition, puis d'autre part d'évaluer l'influence de l'âge sur la réponse des lymphocytes exposés, les volontaires recrutés appartiennent à trois classes d'âge : 20-30, 45-55 et 70-85 ans (35 sujets / classe). Leur inclusion a été réalisée de manière homogène selon le sexe des sujets. L'influence du tabagisme n'étant pas étudiée dans le présent projet, les patients inclus étaient non-fumeurs afin d'éviter ce potentiel biais de confusion.

Une fois le respect de l'ensemble des critères vérifié par le médecin investigateur lors de l'entretien précédant le prélèvement, les échantillons ont ensuite été anonymisés avant d'être transportés à l'UCEIV par la société spécialisée AreaTime. Chaque prélèvement était donc codé et fourni avec les seuls renseignements suivants : âge et sexe des volontaires, ceci afin de pouvoir assigner chaque prélèvement à une classe d'âge.

Les différents tests réalisés sur les échantillons sanguins, ainsi que le plan d'analyse statistique défini par le biostatisticien Yann Landkocz (UCEIV) ont été déposés dans la demande auprès du CPP. Concernant l'analyse statistique des données, le choix des tests utilisés (paramétriques ou non-paramétriques) a été réalisé après vérification de la normalité et de l'homoscédasticité des distributions. En cas d'absence de normalité ou d'égalité des variances d'au moins un échantillon, le test de Kruskal-Wallis et le test U de Mann Whitney, au risque $\alpha=5\%$, en bilatéral ont été utilisés comme tests de référence. Tous les traitements statistiques ont été réalisés avec le logiciel SPSS pour Windows (SPSS 20.0, IBM, France) et le logiciel Graphpad Prism 7.00 pour Windows (Graphpad Software, La Jolla, USA).

Tableau II.9 : Critères d'inclusion et d'exclusion des sujets.

Critères d'inclusion	Critères d'exclusion
• Age du volontaire compris dans une des trois classes : 20-30, 45-55 ou 70-85 ans • Signature du consentement éclairé • Non-fumeur ou ancien fumeur depuis plus de 10 ans	• Age du volontaire non compris dans une des trois classes attendues • Absence de signature du consentement éclairé • Patient traité par corticoïdes, immunosuppresseurs, radiothérapie, chimiothérapie • Fumeur ou ancien fumeur depuis moins de 10 ans • Consommation d'alcool moyenne supérieure à 3 unités par jour • Exposition professionnelle (métallurgie, pétrochimie, peintre)

Le recrutement des sujets a permis d'initier le processus de prélèvements sanguins. Un volume de 50 mL de sang a été prélevé sur tubes EDTA. Une Numération Formule Sanguine (NFS) et un dosage de la protéine C-réactive (CRP) ont été réalisés pour chaque sujet, permettant d'éliminer les prélèvements caractérisés par une inflammation aiguë ou des perturbations de NFS. Les échantillons sanguins ont été traités dans un délai de 4 à 6 heures

après le prélèvement. En raison du nombre élevé de prélèvements sanguins à réaliser dans cette étude, nous avons testé la cryopréservation des lymphocytes suite à leur isolement du sang total dans le but de limiter le nombre d'expositions à réaliser. Nous avons tenté de congeler des cellules dans une solution composée de 10% de diméthylsulfoxyde (DMSO), 40% RPMI-1640 et 50% SVF et de les conserver dans de l'azote liquide pendant 3 mois. Le comptage cellulaire suite à la décongélation a montré une viabilité de 51%. Cette perte importante de cellules élimine le choix de congélation des cellules en vue de mettre en place notre protocole d'exposition.

2.2. Caractérisation de la population

2.2.1. Numération Formule Sanguine et dosage de la CRP

2.2.1.1 Principe

La Numérisation Formule Sanguine (NFS) ou hémogramme constitue l'exploration hématologique de base. Elle comprend :

- Un examen quantitatif avec :
 - La numération des éléments figurés du sang (hématies, leucocytes et plaquettes),
 - La détermination de l'hématocrite,
 - Le dosage de l'hémoglobine (Hb),
 - L'établissement de la formule leucocytaire (lymphocytes, monocytes, neutrophiles, éosinophiles et basophiles).
- Les calculs des indices érythrocytaires : le Volume Globulaire Moyen (V.G.M), la Teneur Corpusculaire Moyenne en Hb (T.C.M.H) et la Concentration Corpusculaire Moyenne en Hb (C.C.M.H).

Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes intéressés à la formule leucocytaire et plus précisément au pourcentage de lymphocytes dans le sang. Les valeurs de référence pour les différentes cellules sanguines sont représentées dans le Tableau I.4.

La Protéine C-Réactive (CRP) est une glycoprotéine synthétisée par le foie, initialement décrite dans la pneumonie à pneumocoque et portant son nom du fait qu'elle réagit avec le

C-polysaccharide de la paroi du pneumocoque. Elle a pour rôle de mobiliser les défenses immunitaires de l'organisme par activation de la voie du complément et stimulation de la phagocytose. C'est la protéine la plus sensible de l'inflammation aiguë, caractérisée par une cinétique rapide. Au cours de la réponse à la phase aiguë des états inflammatoires, le taux plasmatique de cette protéine s'élève très rapidement (dès la 6^{ème} heure) et peut être multipliée par 500 ou 1000 lors d'une inflammation aiguë. Une normalisation rapide a lieu après la disparition de la source d'inflammation (7 à 14 jours). Le dosage de la CRP est un examen sensible, rapide et considéré comme un marqueur précoce d'une réaction inflammatoire aiguë. La valeur normale de la CRP est inférieure à 8 mg/L de sang.

2.2.1.2 Protocole

Afin de réaliser la Numération Formule Sanguine (NFS) et le dosage de la CRP, un tube de 8 mL a été prélevé. Ces analyses ont été effectuées par le laboratoire de biologie médicale de l'Hôpital Saint Philibert (GHICL).

Pour le dosage des éléments figurés, l'analyse des globules blancs a été réalisée par cytométrie en flux. Après l'analyse des globules rouges et des plaquettes, l'hémoglobine est convertie pour sa détection au moyen du Sodium Lauryl Sulfate (SLS), un réactif qui lyse les globules rouges et les globules blancs de l'échantillon. Les groupes hydrophiles SLS peuvent désormais se lier à l'hème, contenant un atome de fer, et former un complexe coloré stable (SLS-Hb) qui est analysé à l'aide d'une méthode photométrique. L'absorbance est mesurée par un capteur photosensible et est inversement proportionnelle à la concentration en hémoglobine de l'échantillon. Finalement, le VGM, la TCMH et la CCMH sont calculés à partir de la quantification des Globules Rouges, de l'hémoglobine et de l'hématocrite.

Le dosage de la CRP a été réalisé par néphélométrie, une technique utilisée en immunologie pour déterminer la concentration sérique d'une protéine. Une solution diluée de l'échantillon est mélangée avec des particules en latex recouvertes d'anticorps monoclonal de souris anti-CRP. La CRP présente dans l'échantillon forme un complexe antigène-anticorps avec la particule en latex. La diffusion de la lumière suite à la rencontre de la particule est mesurée après 6 minutes par néphélométrie. Cette diffusion est proportionnelle à la concentration de CRP présente dans l'échantillon. Une courbe d'étalonnage est tracée pour déterminer les concentrations de CRP.

2.2.1.3 Analyse

Le traitement et l'analyse des données de NFS et CRP ont été réalisés suivant le plan d'analyse statistique déposé auprès du CPP. Dans un premier temps, les variables mesurées ont été décrites par leur moyenne accompagnée de l'intervalle interquartile. Après détermination des conditions de normalité (test de Shapiro-Wilk) et d'homoscédasticité (test de Levene), les variations des paramètres en fonction de l'âge ont été mis en évidence grâce au test de Kruskal-Wallis et au test U de Mann-Whitney, au risque $\alpha=5\%$.

2.2.2. Marquage anti-CD45

2.2.2.1 Principe

L'étude des deux isoformes du marqueur de surface CD45 présent chez les L_T a été réalisée par cytométrie en flux. Le pourcentage de l'isoforme exprimé suite au marquage donne une idée sur le stade de stimulation et d'activation des L_T . Les L_T au repos, L_T naïfs, expriment l'isoforme CD45RA. Suite à leur activation, ces cellules expriment l'isoforme CD45RO et forment alors les L_T à mémoire.

2.2.2.2 Protocole

L'identification des deux isoformes a été réalisée sur du sang total de chacun des sujets prélevés. Un volume de sang a été transféré dans 10 volumes de solution de lyse pour les érythrocytes (15,5mM de NH_4Cl , 1mM de $KHCO_3$ et 0,01mM d'EDTA) pendant 5 min suivie d'une centrifugation à 300xg, 10 min, 4°C permettant la récupération des cellules. Le reste du sang a été centrifugé à 1300xg, 10 min, 4°C pour récupérer le sérum sanguin. Le culot cellulaire a été remis en suspension dans du PBS à 3% de sérum du donneur pour limiter les réactions non spécifiques. Chaque tube a été divisé en deux, dans un premier tube, un marquage avec l'anticorps anti-CD45RA (CD45RA-PerCP, clone HI100, Milipore) et anti-CD45RO (CD45RO-FITC, clone UCHL1, Milipore) a été réalisé. Pour le second tube, 5µL de chaque contrôle isotypique (Mouse IgG1-FITC 1/100 et Mouse IgG1-Per-CP 1/100) a été ajouté. Après l'incubation à l'obscurité pendant 60 minutes, l'échantillon est analysé par cytométrie en flux (cytomètre Attune®, Life Technologies, Saint Aubin, France). La mesure des paramètres de granulométrie (SSC et FSC) a permis de différencier trois populations cellulaires faisant référence à trois lignées leucocytaires (lymphocytes, monocytes et granulocytes). Les

populations ont été vérifiées par un marquage spécifique des monocytes (anti-CD14-FITC, clone MEM-15, Abcam) et des lymphocytes (anti-CD3-PerCP, clone MEM-57, Abcam). L'identification des deux isoformes (CD45RA et CD45RO) a été réalisée sur les lymphocytes (CD3⁺).

2.2.2.3 Analyse

Le pourcentage de cellules CD3⁺CD45RA⁺ et CD3⁺CD45RO⁺ a été relevé pour chaque échantillon. Afin d'identifier les différences significatives dans les proportions de CD3⁺CD45RA⁺ et CD3⁺CD45RO⁺, un test de Kruskal-Wallis a été réalisé ($p < 0.05$) puis les différences entre les différentes catégories ont été évaluées par le test U de Mann-Whitney ($p < 0.05$).

2.3. *Isolement, purification et activation des lymphocytes T*

Afin d'optimiser les étapes d'isolement des lymphocytes, une poche de sang de 500 mL provenant de l'Etablissement Français du Sang (EFS) a été utilisée. Les autres étapes du protocole (isolement, activation et exposition) ont été réalisées et optimisées en parallèle sur cinq prélèvements sanguins de 50 mL inclus dans la base AEROTOX 2 et fournis par Naturalpha.

2.3.1. *Isolement des lymphocytes*

La technique d'isolement des lymphocytes utilisée est celle décrite par Bøyum en 1968 et qui consiste à séparer les constituants du sang en se basant sur le gradient de densité. La méthode consiste à déposer le sang dilué dans une solution saline (1:1, v/v) sur un milieu de densité 1,077 et à réaliser une centrifugation. Les érythrocytes et les granulocytes (densité $> 1,077$) traversent le milieu de séparation et sédimentent au fond du tube tandis que les cellules mononuclées (monocytes et lymphocytes) forment un anneau au-dessus de la solution de séparation (Bøyum, 1968).

Deux solutions de densité 1,077 ont été testées : le *Lymphoprep*[™] (ProteoGenix, France), qui est un mélange de diatrizoate de sodium et de polysaccharide et le *Nycoprep*[™] (ProteoGenix, France) qui est une solution de nycodenz® en absence de polysaccharide.

L'isolement des lymphocytes en utilisant le *Lymphoprep™ tube* (ProteoGenix, France) a également été testé. Ce tube pré-rempli avec la solution de *Lymphoprep™* dispose d'une membrane en plastique permettant à l'échantillon de sang d'être versé plus facilement dans le tube.

Dans le but de choisir le meilleur milieu de séparation, nous avons utilisé une poche de sang total de 500 mL provenant de l'EFS Nord. Le sang a été divisé en trois échantillons, pour tester chacun des milieux de séparation. Le protocole utilisé était celui indiqué par le fournisseur et est identique pour les 3 tests. Le sang a été dilué par du PBS (1:1, v/v), puis déposé sur le milieu de séparation adéquat pour chaque essai. Une centrifugation à 800xg pendant 20 min en absence de frein a été réalisée afin de séparer les différents constituants sanguins. L'anneau des cellules mononucléées (PBMC) a été récupéré, dilué dans du PBS et centrifugé à 250xg pendant 10 minutes. Le culot cellulaire a été remis en suspension dans le milieu de culture RPMI-1640 (Gibco, Cergy Pontoise, France) supplémenté de 10% de Sérum de Veau Fœtal décomplémenté (HI-SVF), 1% de L-Glutamine et 1% de solution d'antibiotiques (Pénicilline Streptomycine Néomycine, Gibco, Cergy Pontoise, France).

Afin de déterminer le milieu de séparation le plus adapté à notre étude, nous avons observé l'aspect des différents éléments après la centrifugation (culot d'érythrocytes, anneau de PBMC, etc.) et nous avons réalisé un comptage des éléments cellulaires présents dans l'anneau, par exclusion au bleu de Trypan.

L'observation des tubes après la centrifugation a montré que l'anneau de PBMC était moins visible et moins défini en utilisant le *Nycoprep™* comme milieu de séparation, en comparaison avec les deux autres techniques (*Lymphoprep™* et *Lymphoprep™ tube*). Au niveau du comptage, nous avons récupéré une concentration équivalente de PBMC : $0,92 \times 10^6$ PBMC/mL de sang total pour *Lymphoprep™* et *Lymphoprep™ tube* et $1,2 \times 10^6$ PBMC / mL de sang total pour le *Nycoprep™*. En raison du rendement d'isolement proche et du nombre élevé d'échantillons de sang à traiter dans cette étude (105 échantillons sanguins de 50 mL), nous avons logiquement choisi d'utiliser la technique la plus rapide, c'est à dire le *Lymphoprep™ tube*.

2.3.2. Purification des lymphocytes T

Cinq sujets tests ont été recrutés par Naturalpha en respectant les critères d'inclusion et d'exclusion afin d'obtenir cinq échantillons sanguins de 50 mL. Cela nous a permis d'une part, de tester la chaîne de prélèvement comportant l'étape de prélèvement sanguin à Lille, de transport jusqu'au laboratoire à Dunkerque ainsi que la durée nécessaire pour ces deux étapes. D'autre part, ces prélèvements ont servi pour continuer l'optimisation du protocole. La première étape qui consiste à isoler les PBMC, a été réalisée en utilisant les *tubes Lymphoprep™* avant de procéder à l'étape de purification des lymphocytes T.

Suite à la récupération de l'anneau de PBMC, les cellules ont été comptées puis mises en culture dans des flacons de culture dans un milieu RPMI 1640 supplémenté à 10% de SVF, 1% de L-Glutamine et 1% de PSN. Cette culture permet la séparation des lymphocytes des monocytes en se basant sur la capacité d'adhésion de ces derniers sur le plastique du flacon. Les lymphocytes, cellules non adhérentes, présents dans le milieu de culture ont par la suite été récupérés. Une heure et demie de culture à 37°C, 5% CO₂ est suffisante pour réaliser cette séparation.

Deux comptages cellulaires ont donc été réalisés : un premier avant la mise en culture correspondant au nombre de PBMC récupérés, et un deuxième suite à l'adhésion des monocytes, faisant référence au nombre de lymphocytes récupérés (Tableau II.10). Les lymphocytes récupérés suite à l'adhésion des monocytes représentent 85% des PBMC ce qui est conforme avec le pourcentage attendu de lymphocytes dans les PBMC (entre 70 et 90%).

Les lymphocytes T ont été ensuite isolés des autres populations lymphocytaires par sélection négative. Cette technique permet d'éliminer toutes les cellules non désirées de la suspension cellulaire de départ et de récupérer les cellules non marquées dans un état viable. Le principe du tri négatif à l'aide de billes magnétiques repose sur un marquage de la sous-population à éliminer par un anticorps spécifique couplé à une bille magnétique. La population cellulaire d'intérêt est ensuite séparée des autres populations sous l'effet d'un champ magnétique. Nous avons recours à cette technique de sélection surtout lorsqu'il y a un risque de modification de la fonction cellulaire par l'anticorps. On utilise alors une technique de déplétion en marquant toutes les cellules non désirées, et en récupérant des cellules dépourvues d'anticorps et de billes.

Pour réaliser cette séparation, nous avons utilisé le kit *Dynabeads® Untouched™ Human T Cells* (Life Technologies, Cergy Pontoise, France). Dans un premier temps, le milieu contenant les lymphocytes a été centrifugé et les cellules ont été remises en suspension dans un tube de 15 mL. Ensuite, un anticorps reconnaissant les cellules à éliminer (Lymphocytes B, Natural Killer, monocytes, granulocytes, érythrocytes, cellules dendritiques...) a été ajouté ; une période d'incubation de 20 minutes entre 2-8°C permet la fixation de cet anticorps sur les cellules. Durant ce temps, des billes magnétiques capables de se fixer aux cellules marquées par l'anticorps ont été préparées à la bonne concentration (4×10^6 billes pour 10^6 cellules) et lavées. La séparation se fait en ajoutant ces billes au tube contenant le couplage cellules anticorps. Suite à une incubation courte de 15 minutes à température ambiante, le tube a été introduit pendant 2 minutes dans une colonne que traverse le champ magnétique créé par un aimant. Les cellules entourées de billes métalliques sont retenues sur la colonne par cet aimant, alors que les L_T non marqués sont élués et récupérés. Cette étape a été répétée une deuxième fois pour assurer une récupération maximale de L_T . Une centrifugation à 300xg pendant 10 min a été réalisée pour remettre ces L_T en culture dans du RPMI 1640 à 10% de SVF, 1% de L-Glutamine et 1% de PSN pendant une nuit.

Deux comptages cellulaires ont eu lieu : le premier suite à l'étape du tri négatif et le deuxième après une culture des L_T pendant une nuit permettant de vérifier l'absence de mort cellulaire importante (Tableau II.10). Les résultats ont montré une viabilité de 93%.

Tableau II.10 : Concentration des cellules rapportée au millilitre de sang total suite aux étapes d'isolement et de purification. Les valeurs de concentration cellulaire pour les cinq sujets étant très proche, la moyenne a été représentée dans ce tableau.

ETAPES	CELLULES (par mL sang total)
Après isolement des PBMC	$1,07 \times 10^6$ PBMC
Après adhésion des monocytes	$0,91 \times 10^6$ lymphocytes
Après tri négatif des L_T	$0,42 \times 10^6$ L_T
Après culture des L_T pendant une nuit	$0,39 \times 10^6$ L_T

Un échantillon de sang total a été analysé par cytométrie en flux après lyse des globules rouges. Les diagrammes de la Figure II.25 représentent la granularité des cellules en fonction de leur taille. L'échantillon de sang total hémolysé passé en cytométrie en flux a montré trois populations cellulaires distinctes (a). Afin d'identifier chacune des populations, deux types de marquage ont été réalisés : un marquage anti-CD3⁺ spécifique aux lymphocytes ainsi qu'un marquage anti-CD14⁺ pour identifier les monocytes. Les marquages spécifiques ont été utilisés pour définir la fenêtre (gate) relative à chaque lignée cellulaire et permettant alors d'identifier trois populations : les lymphocytes représentant environ 30% de la population leucocytaire totale, les monocytes et les granulocytes. Suite au tri négatif, un échantillon de cellules a été passé en cytométrie en flux (b), 90 % des cellules récupérées après tri sont des lymphocytes ce qui valide l'efficacité de cette technique de sélection négative des L_T.

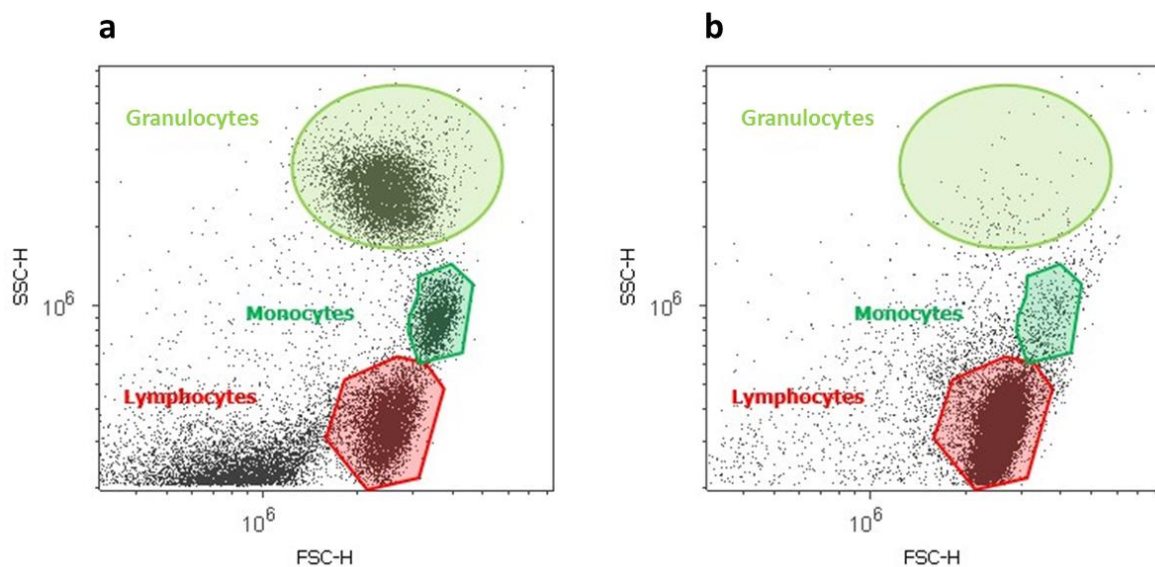


Figure II.25 : Les différentes populations cellulaires identifiées par cytométrie en flux (a) dans un échantillon de sang total hémolysé (b) dans un échantillon de culture cellulaire suite à la sélection négative.

2.3.3. Activation des lymphocytes T

Après une culture d'une nuit, les lymphocytes T ont été mis en contact avec des billes enrobées d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28 du kit *Dynabeads® Human T-Expander CD3/CD28* (Life Technologies, Cergy Pontoise, France). Ce système mime l'activation des L_T *in vivo* où la Cellule Présentatrice de l'Antigène (CPA) se lie aux marqueurs CD3 et CD28 présents à la

surface du L_T au repos déclenchant de ce fait l'activation de la cellule. Une fois liées aux marqueurs CD3 et CD28 du L_T , les billes fournissent à la fois les signaux primaires et ceux de co-stimulation nécessaires à l'activation et à l'expansion des L_T .

Afin de déterminer le temps d'activation nécessaire, des L_T ont été activés pendant 24h, 48h, 72h et 96h. Des L_T non activés ont été utilisés comme témoin négatif. Une fois les billes préparées à la bonne concentration (3×10^6 billes pour 1×10^6 lymphocytes), les L_T ont été mis en culture en présence des billes dans du RPMI 1640 à 10% de SVF, 1% de L-Glutamine et 1% de PSN à 37°C, 5% CO_2 . Différents tests ont été réalisés suite aux temps d'activation dans le but de s'assurer de la nécessité de l'activation et de son efficacité.

2.3.3.1 Test de prolifération cellulaire

2.3.3.1.1. Principe

La prolifération cellulaire a été suivie en cytométrie en flux à l'aide du kit *Violet CellTrace™* (Invitrogen, Thermofisher, France). Cette technique d'analyse de la prolifération par dilution de la fluorescence repose sur le marquage fluorescent par un colorant capable de traverser la membrane plasmique de la cellule et de se lier de façon covalente aux protéines. Suite à ce couplage, le colorant fluoresce. Avec chaque division cellulaire, l'intensité de la fluorescence diminue de moitié. Parmi les avantages que présente le *Violet CellTrace™*, la stabilité de la coloration fluorescente permet de visualiser jusqu'à dix générations de cellules en prolifération avant que le signal n'interfère avec celui lié à l'auto-fluorescence des cellules. Cette technique permet également de mesurer des marqueurs d'activation de manière simultanée.

2.3.3.1.2. Protocole

L'étude de la prolifération cellulaire a été réalisée sur les lymphocytes T après leur culture pendant une nuit. Les cellules ont été réparties à une concentration de $10^6 L_T / mL$ et ensuite marquées par le *Violet CellTrace™* préparé dans du DMSO à une concentration finale de 5 μM . Des L_T non marqués ont servi de contrôle reflétant l'auto-fluorescence des cellules.

Suite au marquage avec le *Violet CellTrace™*, les cellules ont été incubées pendant 20 min dans l'obscurité et à 37°C. Cette étape est suivie par un lavage au milieu complet afin d'éliminer toute présence de reste du colorant dans la solution. Les L_T ont été activés ou non

par les billes anti- CD3/CD28 et incubées pendant 96h à 37°C, 5% CO₂ pour être ensuite exposés aux PF pour une durée de 72h (paragraphe 2.3.4). Le Tableau II.11 résume les différentes conditions testées.

Tableau II.11 : Conditions du test de prolifération cellulaire.

Condition	Marquage (Violet CellTrace™)	Activation (billes anti-CD3/CD28)	Exposition (PF)
C1	+	-	-
C2	+	-	+
C3	+	+	-
C4	+	+	+
Contrôle	-	+	-

Pour chacune des conditions, des cellules ont été prélevées et analysées au cours de différents temps de culture par cytométrie en flux (Attune®, Life Technologies, Saint Aubin, France) en mode haute sensibilité et à une vitesse d'acquisition de 25 µL/minute. Les flèches indiquent les temps auxquels un prélèvement de cellules a été réalisé (Figure II.26).

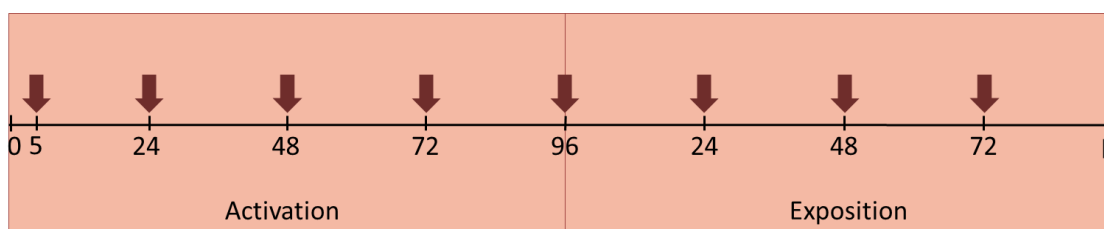


Figure II.26 : Temps de mesure utilisés lors du test de prolifération cellulaire.

2.3.3.1.3. Analyse

Après acquisition, les résultats obtenus pour le test CSFE ont été analysés par le logiciel FlowJo v10.0 (FlowJo LLC, USA), en utilisant l'algorithme d'analyse de prolifération du logiciel en mode automatique.

2.3.3.2 Détection des marqueurs d'activation

2.3.3.2.1. Principe

Deux marqueurs de surface témoins d'une activation des L_T ont été testés par cytométrie en flux. Le CD69 est un marqueur précoce lié à la stimulation. Il est de ce fait exprimé suite à cette étape et subit une diminution rapide une fois la stimulation terminée. Le deuxième marqueur testé est le CD25, un marqueur tardif lié au cycle cellulaire. La surexpression de ce marqueur signale une activation et le déclenchement de la division cellulaire.

2.3.3.2.2. Protocole

Ces deux marqueurs ont été testés pour chacune des conditions du Tableau II.11. Le volume prélevé pour l'analyse de la prolifération par le *Violet CellTrace™* a été divisé sur trois tubes. Dans le premier tube, un marquage anti-CD25 (CD25-FITC, clone BC96, Biolegend) a été réalisé. Dans le deuxième, un marquage anti-CD69 (CD69-FITC, clone FN50, Biolegend) et pour le dernier tube le contrôle isotypique FITC 1/100 (Mouse IgG1-FITC, Invitrogen) ont été effectués. Après incubation à l'obscurité pendant 30 minutes, l'échantillon a été analysé.

2.3.3.2.3. Analyse

Après passage des échantillons en cytométrie en flux, l'analyse des résultats a été réalisée en utilisant le logiciel Flowing Software v.2.4.1 (Turku Centre for Biotechnology, Finlande). Pour chacun des échantillons et chacun des deux marqueurs (CD25 et CD69), une normalisation par rapport au contrôle isotypique a été appliquée afin d'éliminer le bruit de fond de la fluorescence :

$$\Delta MFI_{\text{échantillon}} = MFI_{\text{CD25 ou CD69}} - MFI_{\text{contrôle_isotypique}}.$$

Ensuite le ratio $\Delta MFI_{\text{CD25}}/\Delta MFI_{\text{CD69}}$ a été calculé permettant d'exprimer les résultats sous forme de ratio CD25/CD69.

2.3.3.3 Analyse du cycle cellulaire

2.3.3.3.1. Principe

Le cycle cellulaire a été étudié en cytométrie en flux suite à un marquage spécifique de l'ADN par le *FxCycle DNA stain* (LifeTechnology, France), colorant fluorescent qui reconnaît

spécifiquement l'ADN double brin. L'ADN a été quantifié dans les cellules afin d'analyser le cycle cellulaire et ses différentes phases (G_0/G_1 , S, G_2/M).

2.3.3.3.2. Protocole

Suite aux différents temps d'activation testés (24, 48, 72 et 96h), les L_T ont été récupérés par centrifugation à 200xg pendant 5 min à 4°C. Afin de les fixer et de conserver la structure de la cellule, le culot a été remis en suspension dans du PBS contenant 2% (v/v) de formaldéhyde. Après une incubation de 20 min à température ambiante, les cellules ont été mises sur la glace pendant une minute avant d'être centrifugées (300xg, 5 min à 4°C). Les cellules ont ensuite été perméabilisées. Un volume de 900 µL de surnageant a été remplacé par 900 µL de méthanol froid qui assure la perméabilisation des cellules déjà fixées en dissolvant les lipides membranaires. Les cellules ont été incubées sur de la glace pendant 30 min. Suite à une centrifugation (300xg, 5 min à 4°C), les cellules ont été remises en suspension dans 500 µL de PBS et marquées avec 0,5 µL du *FxCycle DNA stain*. Après une incubation d'au moins 30 minutes à l'obscurité, les cellules ont été passées en cytométrie en flux.

2.3.3.3.3. Analyse

Les données ont été analysées en utilisant le logiciel Flowing Software v.2.4.1 afin de déterminer la proportion des cellules dans chacune des phases du cycle cellulaire.

Concernant la durée d'activation à appliquer durant le traitement des prélèvements sanguins, nous avons décidé d'activer les L_T pendant 96 heures (voir le chapitre 3, partie 0) dans le but d'obtenir un nombre de lymphocytes suffisant et une quantité d'ADN et d'ARN suffisante pour réaliser les différents tests toxicologiques détaillés dans la partie 3.

2.3.4. Exposition des lymphocytes T

2.3.4.1 Préparation des particules

Les particules ont été mises en suspension à une concentration de 9 mg PF / mL de PBS. Pour éviter la formation d'agrégats et recueillir un échantillon homogène, les suspensions de particules ont été traitées par ultrason pendant 5 minutes.

2.3.4.2 Test de cytotoxicité

2.3.4.2.1. Principe

La cytotoxicité de l'échantillon de PF a été évaluée en mesurant l'activité de l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH) dans le surnageant de culture. Celle-ci reflète la perte d'intégrité membranaire. Le test se base sur le fait que les cellules mortes ou ayant subi des dommages auront une membrane cellulaire endommagée qui laisse s'échapper des enzymes normalement localisées dans le cytoplasme. En mesurant la quantité d'enzymes LDH relâchées, il est possible de connaître la proportion de cellules ayant subi une lyse. La LDH provenant de la cellule catalyse la conversion du lactate en pyruvate, entraînant en même temps la réduction du NAD^+ en NADH/H^+ . La diaphorase transfère alors les protons du NADH/H^+ au sel de tétrazolium INT (couleur jaune), le réduisant par ce fait même en formazan (couleur rouge). La concentration en formazan est déterminée par spectrophotométrie.

2.3.4.2.2. Protocole

Le test a été réalisé sur des L_T exposés ou non pendant 24, 48 ou 72h aux PF à des concentrations de 0 ; 5 ; 15 ; 45 ; 135 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Des cellules exposées au Triton-X100 2% (v / v) ont servi de témoin positif avec 100% de mortalité.

Le dosage de la LDH a été réalisé en utilisant le kit *Cytotoxicity Detection LDH* (Roche Diagnostics, Meylan, France) selon les instructions du fabricant. A la fin du temps d'exposition, 100 μL du surnageant ont été transférés dans une plaque 96 puits. 100 μL / puits du réactif LDH ont été ajoutés. Après 30 min d'incubation à 37°C, l'absorbance a été mesurée en utilisant un lecteur de microplaques de type Multiskan (Thermo Fisher Scientific). La concentration en formazan a été déterminée à la longueur d'onde de 490 nm et une mesure à 600 nm a été prise comme référence.

2.3.4.2.3. Analyse

Afin d'éliminer le bruit de fond, les valeurs d'absorbance à la longueur d'onde de référence ont été soustraites à celles obtenues à la longueur d'onde d'intérêt pour chaque puits. Pour déterminer le pourcentage de cytotoxicité, la formule suivante a été utilisée :

$$\text{Cytotoxicité (\%)} = \frac{\text{échantillon} - \text{contrôle solvant}}{\text{contrôle positif} - \text{contrôle solvant}} \times 100$$

La valeur de l'échantillon utilisée est obtenue en utilisant la médiane d'absorbance 490-600 nm des huit réplicats biologiques par concentration de PF. Dans un deuxième temps, ces résultats de cytotoxicité ont été modélisés pour chaque temps d'exposition pour obtenir les concentrations d'effet à 10 % (CE₁₀).

2.3.4.3 Exposition aux PF

Les lymphocytes T ont été exposés aux PF à une concentration de 45 µg/mL pendant 72h (voir le chapitre 3, partie 2). Des cellules non-exposées ont été utilisées comme témoin dans chaque expérience. Pour chaque volontaire, 2 conditions ont été testées :

- L_T non exposés aux PF,
- L_T exposés aux PF.

2.3.4.4 Contrôles positifs

Les contrôles positifs suivants ont été réalisés sur des L_T exposés pendant 72h à :

- 10 µg/mL d'oxyde de cuivre (CuO), connu pour ses effets cytotoxiques et génotoxiques (Di Bucchianico et al., 2013) ;
- 2 mM de Benzo[a]Pyrène (B[a]P), un HAP souvent pris comme modèle pour l'étude de l'activation métabolique des composés organiques (Billet et al., 2008).

2.3.4.5 Récupération des cellules et des surnageants

Des prélèvements de 200 µL de surnageant ont été réalisés à 24, 48 et 72h après exposition aux PF et à 72h après exposition des contrôles positifs et ont servi pour le profilage immunologique réalisé en ELISA multiplex (voir la partie 3.2)

Après 72h d'exposition, les L_T ont été centrifugés (250xg ; 15 min ; 20°C). Les surnageants ont été récupérés dans des cryotubes de 4,5 mL et placés à -80°C.

Une partie de ces cellules a été fixée dans du formaldéhyde et perméabilisée avec du méthanol pour les études en cytométrie de flux. Le reste des culots cellulaires a été conservé à -80°C jusqu'à leur utilisation.

La Figure II.27 représente les différentes étapes optimisées ainsi que le protocole final appliqué.

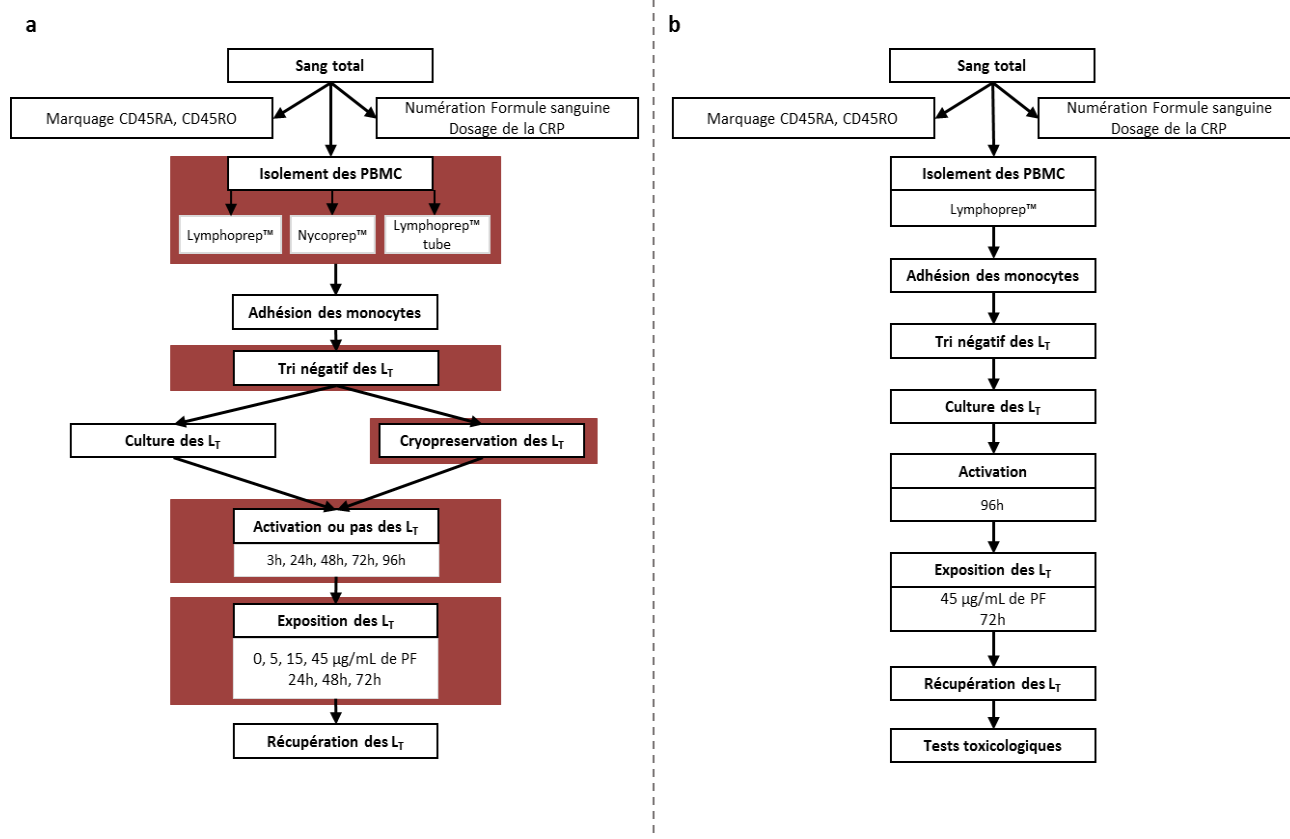


Figure II.27 : Protocole développé dans cette étude (a) ensemble des conditions testées avec en rouge les étapes optimisées (b) le protocole final optimisé.

2.3.5. Extraction et dosage de l'ADN, de l'ARN et des protéines

L'extraction de l'ADN, de l'ARN et des protéines a été réalisée en utilisant le kit *Nucleospin® TriPrep* (Macherey-Nagel, France). L'ADN, l'ARN et les protéines sont isolés sans division de l'échantillon antérieurement à l'extraction ce qui est particulièrement intéressant pour les échantillons uniques et précieux comme dans le cas de cette étude.

La première étape consiste à lyser les cellules par un tampon de lyse qui inactive immédiatement les enzymes présentes (DNases, RNases, proteases, and phosphatases) et crée des conditions de liaison appropriées favorisant l'adsorption de l'ADN et de l'ARN sur la membrane de silice et permet aux protéines de traverser la colonne. Après deux étapes de lavage, l'ADN est élué avec un tampon à faible teneur en sels (DNA Elute) qui élue sélectivement l'ADN et maintient l'ARN sur la colonne. L'ADN résiduel lié à la membrane de

silice est éliminé par une solution de DNase. Des étapes de lavage avec deux tampons différents éliminent les sels, les métabolites et les composants cellulaires macromoléculaires. L'ARN pur est finalement élué avec de l'eau ne contenant pas de RNase (RNase free water). Quant aux protéines, elles sont isolées par précipitation sous forme dénaturée en milieu tamponné (Protein Precipitator). Après une étape de lavage, le culot de protéines est dissous dans un tampon de resolubilisation des protéines contenant l'agent réducteur TCEP. Les acides nucléiques concentrés ADN et ARN, ont été dosés par spectrophotométrie en utilisant la μ drop™ plate (ThermoFisher, France), puis conservés à 4°C (ADN) et -20°C (ARN). Les protéines ont été quantifiées par le *Protein Purification Assay Kit* (Machery Nagel, France) et conservées à -80°C. La quantité et la qualité de l'ARN ont également été évaluées grâce au bioanalyseur (puce *Agilent RNA 6000 Nano Chips*, Agilent Technologies, France). Le pic du marqueur ainsi que les deux pics de ribosomes 18S et 28S étaient bien définis sur l'électrophorégramme, avec un ratio ribosomal [28S/18S] supérieur à 2 et un RNA Integrity Number (RIN) supérieur à 9.

3. Tests toxicologiques

3.1. Expression génique par RT-qPCR

3.1.1. Principe

La détermination du niveau d'expression des gènes dans les lymphocytes a été réalisée par la méthode de Transcription inverse (Reverse transcription, RT) suivie par une PCR quantitative en temps réel, qPCR (real-time quantitative Polymerase Chain Reaction). Cette technique se base sur la détection et la quantification d'un fluorochrome pendant le processus d'amplification. Chaque cycle d'amplification se déroule en trois étapes : la dénaturation du double brin d'ADNc par chauffage, l'hybridation des amorces et finalement l'élongation permettant la synthèse de la séquence complémentaire au brin matrice. Dans ce cas, le fluorochrome émetteur est libéré du suppresseur ce qui permet l'émission de la fluorescence proportionnelle au nombre de copies formées durant chaque cycle. Ce cycle est répété n fois. La PCR est précédée par une étape de Retro-Transcription RT durant laquelle une ADN

polymérase ARN-dépendante synthétise, à l'aide des dNTP, un brin d'ADN complémentaire (ADNc) de l'ARNm obtenu après l'extraction.

3.1.2. Protocole

La RT a été réalisée à partir de 13 µL d'ARN (2 000 ng) auxquels ont été ajoutés 7 µL de mélange réactionnel du kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Thermo Fischer, France) contenant :

- 2 µL de RT Buffer 10X,
- 2 µL de RT Random Primer 10X,
- 1 µL de RT Enzyme Superscribe,
- 0,8 µL de dNTP 100mM,
- 1 µL de Rnase inhibitor,
- 0.2 µL d'eau ultra-pure.

La RT a été effectuée en utilisant le thermocycleur PTC-100® (PTC-100™ Programmable Thermal Controller, MJ Research, INC) programmé comme suit :

- 90 min à 37°C (rétro-transcription de l'ARNm en ADNc),
- 5 min à 95°C (inactivation de l'enzyme de la RT),
- maintien à 4°C.

L'ADNc simple brin formé a été conservé à 4°C avant d'être amplifié en PCR en temps réel. Nous avons quantifié les ARNm dans les cellules exposées ou non aux PF et aux contrôles positifs. Des duplicats techniques ont été réalisés pour chaque échantillon. Concernant la normalisation, quatre gènes de référence candidats ont été comparés. Les gènes testés ainsi que la référence de leurs amorces sont présentés dans le Tableau II.12.

La PCR a été réalisée à partir de 4,5 µL d'ADNc et de 5,5 µL du mélange suivant :

- 0,5 µL de l'amorce à tester
- 5 µL du TaqMan® Fast Advanced Master Mix (2X)

Chaque plaque a été couverte par un film adhésif et centrifugée brièvement. L'appareil utilisé pour la PCR est le thermocycleur 7500 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies, France) programmé selon le protocole suivant :

- activation de l'enzyme à 95°C pendant 20 s,
- 40 cycles de PCR : dénaturation à 95°C pendant 3 s suivie de l'hybridation et de l'élongation à 60°C pendant 30 s.

Tableau II.12 : Amorces des gènes de référence et des gènes cibles utilisées pour la RT-qPCR.

GENE DE REFERENCE	AMORCE	GENE CIBLES	AMORCE
18S	Hs99999901_s1	AhR	Hs00169233_m1
RPL13A	HS04194366_g1	CYP1A1	Hs01054797_g1
IPO8	HS00914059_m1	CYP2S1	Hs00258076_m1
B2M	HS00187842_m1	CYP2E1	Hs00559368_m1
		NQO1	Hs02512143_s1
		SOD2	Hs00167309_m1
		Catalase	Hs00156308_m1
		HMOX1	Hs01110250_m1

3.1.3. Analyse

Le cycle seuil Ct (Cycle threshold) correspond au nombre de cycles d'amplification pour lequel une augmentation significative de l'intensité de fluorescence au-delà du seuil de fluorescence est atteint. Pour chaque échantillon, cette valeur a été déterminée par le logiciel « Sequence Detection 7500 Software v2.0.3 » (Life Technologies). La moyenne des valeurs de Ct des duplicats a été calculée obtenant ainsi une valeur Ct cible. Cette valeur est rapportée à celle du gène de référence par la formule suivante, et permet d'obtenir une ΔCt pour chaque échantillon de cellules (Livak and Schmittgen, 2001).

$$\Delta Ct_{\text{échantillon}} = Ct_{\text{cible}} - Ct_{18s}$$

Puis, pour chaque condition d'exposition, nous avons rapporté la valeur de ΔCt à celle du témoin, ce qui correspond dans notre cas, à l'expression relative par rapport aux cellules non exposées :

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{expo}} - \Delta Ct_{\text{témoin}}$$

Par la suite, la quantification relative RQ pour chaque échantillon a été déterminée :

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

3.2. Quantification des cytokines par le MAGPIX®

3.2.1. Principe

La technique MILLIPLEX® MAP est une technologie qui allie les compétences de la cytométrie en flux et celles du test d'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). En immunologie, elle est utilisée pour quantifier des cytokines. Cette méthodologie fait appel à l'utilisation de billes sur lesquelles sont liés des anticorps de capture. Deux fluorochromes sont incorporés à l'intérieur des billes. Il existe pour chaque bille un ratio précis de la quantité de ces deux fluorochromes. Une fois les billes ajoutées à l'échantillon à tester, l'analyte d'intérêt est capturé par une bille. Durant leur passage au niveau des faisceaux laser, chaque bille émet une fluorescence qui est détectée. L'intensité moyenne de fluorescence MFI est utilisée comme base pour l'analyse des échantillons.

Cette technique présente des avantages par rapport au test d'ELISA. Elle est plus sensible, nécessite moins de temps de manipulation et présente la capacité de multiplexer les analytes. Elle permet de détecter et de quantifier simultanément jusqu'à 50 analytes (cytokines, chimiokines, facteurs de croissance etc.) dans 25 µL d'échantillon.

3.2.2. Protocole

Les cytokines d'intérêt ont été quantifiées en utilisant le kit commercial *Millipore MILLIPLEX® MAP Human cytokine/chemokine kit* (MilliporeCorp., Billerica, MA) basé sur la technologie Luminex xMAP®. Les cytokines suivantes ont été analysées : IL-4, IL-10, IL-12p40, IL-13, IL-17A et IFN-γ. Dans le but de quantifier ces cytokines, nous avons utilisé des surnageants prélevés à 24, 48 et 72h des cultures de L_T exposés ou non aux PF. Les surnageants de 8 sujets par catégorie d'âge ont été inclus dans ce test.

Une gamme étalon a été préparée et déposée dans chacune des plaques 96 puits. Après le dépôt de 25 µL / puits des différents échantillons, un volume de 25 µL de mélange d'anticorps des 6 cytokines à tester a été ajouté. Suite à l'incubation pendant une nuit à 4°C,

les plaques ont été lavées 2 fois avant d'ajouter 25 µL / puits de chacun des anticorps de détection. Après une incubation d'une heure à température ambiante, 25 µL de Streptavidine-phycoérythrine ont été ajoutés par puits et les plaques incubées pendant 30 minutes. Suite à une étape de lavage, la lecture permet de mesurer les intensités médianes de fluorescence.

3.2.3. Analyse

Le niveau des cytokines a été quantifié en utilisant le système MAGPIX® et le logiciel « xPONENT software ». La quantification des différentes cytokines est obtenue par comparaison avec une gamme d'étalonnage et l'utilisation d'une droite de régression polynomiale d'ordre 2.

3.3. Etude transcriptomique des miARN

3.3.1. Extraction d'ARN total contenant les miARN

Pour l'analyse des miARN, les ARN totaux des cellules ont été extraits à l'aide du kit *Nucleospin® TriPrep* (Macherey-Nagel, France) comme décrit précédemment (paragraphe 2.3.5), puis quantifiés avec la *µdrop™* plate (ThermoFisher, France). La qualité et la quantité des ARN ont été ensuite vérifiées à l'aide du bioanalyseur (puce *Agilent RNA 6000 Nano Chips*, Agilent Technologies, France).

Parmi les 30 volontaires (10 individus par catégorie d'âge) formant notre population d'étude, 6 individus (3 hommes et 3 femmes) ont été choisis dans chacune des trois classes d'âge (exposés et non exposés aux particules). Les échantillons d'ARN ayant un RIN supérieur à 9, provenant de 18 sujets ont été analysés en puce à miARN.

3.3.2. Puce à miARN

L'analyse de la puce à miARN ainsi que le traitement statistique des résultats obtenus ont été réalisés par la plate-forme de génomique de l'Institut Cochin à Paris.

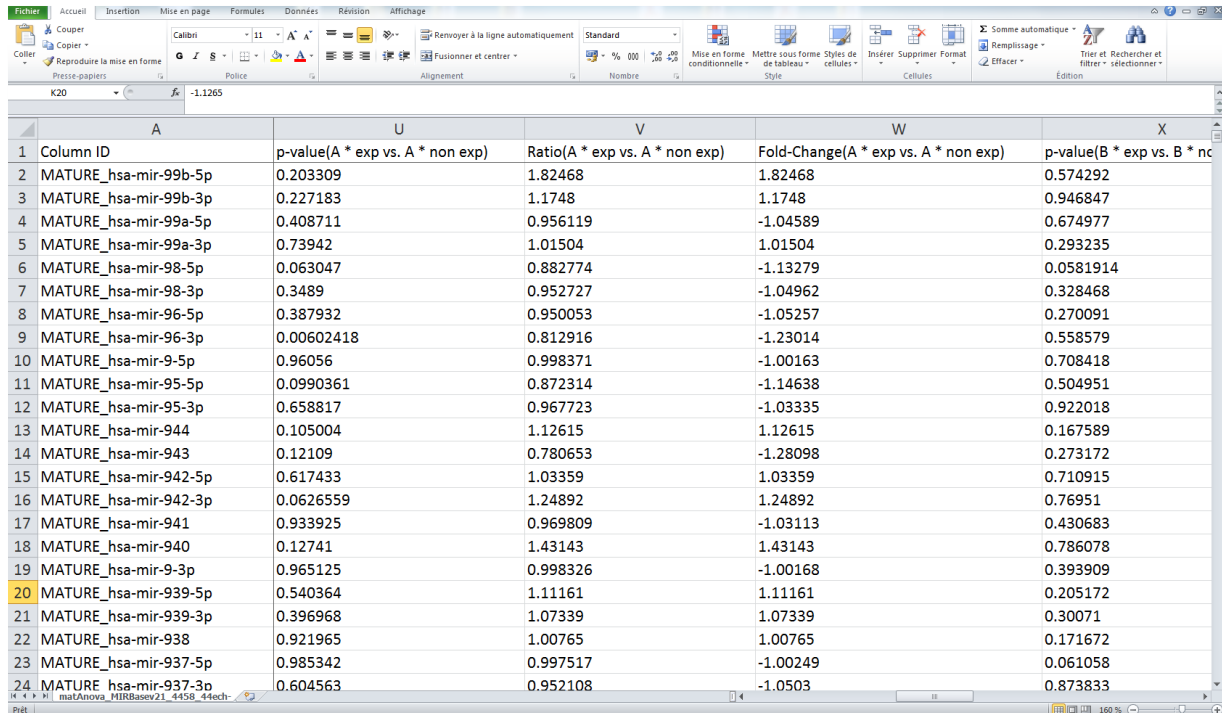
La puce Affymetrix® GeneChip® miRNA Arrays (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA, USA) a été utilisée pour le criblage des miARN en utilisant le FlashTag™ Biotin HSR RNA Labeling Kit. La normalisation de la puce a été réalisée à l'aide de l'algorithme RMA (Robust Multi-Chip Average) en utilisant le fichier d'annotation miARN humains du site Brain array.

Cette puce de dernière génération correspondant à la base de données miRbase 2014 (v21) a permis d'analyser 4 459 miARN dont 2 579 miARN matures (Figure II.28).

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	ID	01-A_016-1.CEL	02-A_016-2.CEL	03-A_068-1.CEL	04-A_068-2.CEL	05-A_076-1.CEL	06-A_076-2.CEL	07-A_006-1.CEL
2	MATURE_hsa-mir-99b-5p	3.35804	4.34983	0.988966	1.20524	3.80583	4.43977	2.81932
3	MATURE_hsa-mir-99b-3p	0.737861	1.01715	0.713259	0.534352	0.990546	1.38517	0.67045
4	MATURE_hsa-mir-99a-5p	0.698319	0.84343	0.873552	0.827842	0.81473	0.772278	0.537688
5	MATURE_hsa-mir-99a-3p	0.592651	0.609879	0.612412	0.606926	0.641219	0.653846	0.667024
6	MATURE_hsa-mir-98-5p	0.917346	0.578142	0.738365	0.615279	0.802237	0.459307	0.861508
7	MATURE_hsa-mir-98-3p	0.81978	0.732926	0.722178	0.642118	0.563872	0.72233	0.905154
8	MATURE_hsa-mir-96-5p	0.750308	0.615027	0.76096	0.724639	0.678222	0.787332	0.534563
9	MATURE_hsa-mir-96-3p	1.02321	0.430494	0.912031	0.410023	0.859609	0.504471	0.741508
10	MATURE_hsa-mir-9-5p	0.580671	0.568302	0.606172	0.61218	0.73581	0.65532	0.449687
11	MATURE_hsa-mir-95-5p	0.716059	1.03027	0.921869	0.686714	0.745245	0.295821	0.599909
12	MATURE_hsa-mir-95-3p	0.906673	0.93937	0.842602	0.72404	0.796303	0.731313	0.65968
13	MATURE_hsa-mir-944	0.53084	0.82274	0.563087	1.16728	0.558201	0.549125	1.00865
14	MATURE_hsa-mir-943	1.60157	0.871456	2.08563	0.876027	1.1714	1.09775	0.610359
15	MATURE_hsa-mir-942-5p	0.573069	0.488511	0.655587	0.645049	0.69194	0.507219	0.71395
16	MATURE_hsa-mir-942-3p	0.938437	1.24687	0.646588	1.05492	1.04627	0.986538	0.530427
17	MATURE_hsa-mir-941	1.01358	2.00838	1.40576	0.97058	3.69857	3.34307	3.0181
18	MATURE_hsa-mir-940	2.88136	2.08395	3.56614	3.13271	2.26398	3.20343	1.67488
19	MATURE_hsa-mir-9-3p	0.711662	0.819422	0.623618	0.826119	0.628698	0.807751	0.914104
20	MATURE_hsa-mir-939-5p	5.58872	5.67456	6.41545	6.88096	5.60864	5.90135	6.17594
21	MATURE_hsa-mir-939-3p	0.582746	0.824881	0.733215	0.561693	0.706931	0.585441	0.768266
22	MATURE_hsa-mir-938	0.806622	1.02135	0.801194	0.75463	0.741905	0.731313	0.845826
23	MATURE_hsa-mir-937-5p	8.69866	8.53678	9.39962	9.34295	8.74672	9.09497	8.69476
24	MATURE_hsa-mir-937-3p	0.652927	0.682598	0.889607	0.535733	0.778904	0.643431	1.05289

Figure II.28 : Extrait des résultats générés par la puce à miARN.

Après l'analyse de la puce, un traitement statistique matAnova a été réalisé afin de déterminer les différences significatives des niveaux d'expression des miARN entre les cellules témoins et celles exposées aux particules pour chaque classe d'âge, ainsi qu'entre les différentes classes d'âge pour les cellules témoins d'une part et les cellules exposées aux particules d'autre part. Suite à l'analyse statistique, une « p-value », un « ratio » et un « fold change » ont été calculés pour chaque miARN et pour chaque comparaison effectuée (Figure II.29).



	A	U	V	W	X
1	Column ID	p-value(A * exp vs. A * non exp)	Ratio(A * exp vs. A * non exp)	Fold-Change(A * exp vs. A * non exp)	p-value(B * exp vs. B * nc
2	MATURE_hsa-mir-99b-5p	0.203309	1.82468	1.82468	0.574292
3	MATURE_hsa-mir-99b-3p	0.227183	1.1748	1.1748	0.946847
4	MATURE_hsa-mir-99a-5p	0.408711	0.956119	-1.04589	0.674977
5	MATURE_hsa-mir-99a-3p	0.73942	1.01504	1.01504	0.293235
6	MATURE_hsa-mir-98-5p	0.063047	0.882774	-1.13279	0.0581914
7	MATURE_hsa-mir-98-3p	0.3489	0.952727	-1.04962	0.328468
8	MATURE_hsa-mir-96-5p	0.387932	0.950053	-1.05257	0.270091
9	MATURE_hsa-mir-96-3p	0.00602418	0.812916	-1.23014	0.558579
10	MATURE_hsa-mir-9-5p	0.96056	0.998371	-1.00163	0.708418
11	MATURE_hsa-mir-95-5p	0.0990361	0.872314	-1.14638	0.504951
12	MATURE_hsa-mir-95-3p	0.658817	0.967723	-1.03335	0.922018
13	MATURE_hsa-mir-944	0.105004	1.12615	1.12615	0.167589
14	MATURE_hsa-mir-943	0.12109	0.780653	-1.28098	0.273172
15	MATURE_hsa-mir-942-5p	0.617433	1.03359	1.03359	0.710915
16	MATURE_hsa-mir-942-3p	0.0626559	1.24892	1.24892	0.76951
17	MATURE_hsa-mir-941	0.933925	0.969809	-1.03113	0.430683
18	MATURE_hsa-mir-940	0.12741	1.43143	1.43143	0.786078
19	MATURE_hsa-mir-9-3p	0.965125	0.998326	-1.00168	0.393909
20	MATURE_hsa-mir-939-5p	0.540364	1.11161	1.11161	0.205172
21	MATURE_hsa-mir-939-3p	0.396968	1.07339	1.07339	0.30071
22	MATURE_hsa-mir-938	0.921965	1.00765	1.00765	0.171672
23	MATURE_hsa-mir-937-5p	0.985342	0.997517	-1.00249	0.061058
24	MATURE_hsa-mir-937-3p	0.604563	0.952108	-1.0503	0.873833

Figure II.29 : Extrait de l'analyse statistique des résultats générés par la puce.

A partir du traitement statistique des résultats de la puce, 13 miARN matures ont été choisis (voir le chapitre 3, partie 3, paragraphe 3) afin que leurs niveaux d'expression génique soient testés par PCR : miR-124-3p, miR-1246, miR-1290, miR-132-3p, miR-16-5p, miR-212-3p, miR-212-5p, miR-324-5p, miR-3613-5p, miR-373-5p, miR-378a-3p, miR-605-5p et miR-99b-5p.

Les miARN de référence candidats miR-191-3p et miR-25-3p ainsi que le petit ARN nucléaire U6 (small nuclear RNA ou snRNA) ont aussi été analysés par PCR afin d'identifier lequel devait être utilisé pour la normalisation des résultats de PCR (voir le chapitre 3, partie 3, paragraphe 3.1).

3.3.3. RT-qPCR (miARN et U6 snRNA)

La RT et PCR ont été réalisées pour les échantillons témoins et exposés des 30 sujets de la population d'étude.

3.3.3.1 RT pour les miARN

Les ARN totaux extraits des cellules ont été dilués dans de l'eau RNase free jusqu'à une concentration d'ARN_{total} de 5 ng/μL. Le protocole appliqué pour la RT est celui du kit *TaqMan*®

Advanced miRNA Assays (Applied Biosystems™, California, USA). La RT spécifique aux miARN se déroule en 4 étapes principales :

- Réaction d'ajout de la queue Poly(A),
- Réaction de ligation,
- Réaction de retro-transcription,
- Réaction d'amplification des miRNA.

La RT a été réalisée en utilisant le thermocycleur (PTC-100™ Programmable Thermal Controller, MJ Research, INC).

3.3.3.2 *PCR pour les miARN*

La PCR a été réalisée en utilisant le protocole du kit *TaqMan® Advanced miRNA Assays*. Les amorces des gènes testés sont représentées dans le Tableau II.13.

La PCR a été réalisée à partir de 2,5 µL du produit de RT dilué au dixième et de 7,5 µL du mélange réactionnel contenant :

- 0,5 µL du TaqMan® Advanced miARN Assay (20X),
- 5 µL du TaqMan® Gene Advanced Master Mix (2X),
- 2 µL d'eau ultra-pure.

L'appareil de PCR en temps réel utilisé est le thermocycleur 7500 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies, France) programmé selon le protocole suivant :

- activation de l'enzyme à 95°C pendant 20 s,
- 40 cycles de PCR : dénaturation à 95°C pendant 3 s suivie de l'hybridation et de l'élongation à 60°C pendant 30 s

Tableau II.13: Amorces des miARN quantifiés par PCR

GENE	AMORCE	GENE	AMORCE
miR-124-3p	477879_mir	miR-25-3p	477994_mir
miR-1246	477881_mir	miR-324-5p	478024_mir
miR-1290	477895_mir	miR-3613-5p	479424_mir
miR-132-3p	477900_mir	miR-373-5p	478073_mir
miR-16-5p	477860_mir	miR-378a-3p	478349_mir
miR-191-3p	477951_mir	miR-605-5p	478174_mir
miR-212-3p	478318_mir	miR-99b-5p	478343_mir
miR-212-5p	478767_mir		

3.3.3.3 RT pour U6 snRNA

Les ARN totaux extraits des cellules ont été dilués dans de l'eau RNase free jusqu'à une concentration d'ARN_{total} de 40 ng / μ L. Le kit *TaqMan® Small RNA assays* (Applied biosystems™, California, USA) a été utilisé. Le mélange réactionnel est composé de :

- 0,15 μ L de dNTP à 100 mM,
- 1 μ L de l'enzyme MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U/ μ L),
- 1,50 μ L du Reverse Transcription buffer (10X),
- 0,19 μ L de RNase inhibitor (20 U/ μ L),
- 4,16 μ L d'eau ultra-pure.

Aux 7 μ L du mélange sont ajoutés 3 μ L de l'amorce U6 snRNA (5X) et 5 μ L de l'ARN total. La RT a été effectuée en utilisant le thermocycleur PTC-100® selon le programme suivant :

- 30 minutes à 16°C,
- 30 minutes à 42°C,
- 5 minutes à 85°C,
- maintien à 4°C.

3.3.3.4 PCR pour U6 snRNA

La PCR du gène U6 [001973] a été effectuée avec 2 μ L du produit de la RT auquel est ajouté un volume de 8 μ L du mélange suivant :

- 5 μ L du TaqMan® Fast Advanced Master Mix (2X),

- 0,5 µL du TaqMan™ microRNA Control Assays [U6 snRNA (20X)],
- 2,5 µL d'eau ultra-pure.

La plaque a été couverte par un film adhésif et analysée par PCR en temps réel (7500 Fast Real-Time PCR) selon le programme ci-dessous :

- 1 cycle de 20 s à 95°C,
- 40 cycles de 3 s à 95°C et de 30 s à 60°C.

3.3.4. Choix des miARN pour l'analyse fonctionnelle

Parmi les 13 miARN testés en PCR, seulement 8 miARN ont été retenus pour l'analyse fonctionnelle : miR-124-3p, miR-1246, miR-1290, miR-132-3p, miR-16-5p, miR-324-5p, miR-378a-3p et miR-99b-5p (voir le chapitre 3, partie 3, paragraphe 3.2).

3.3.4.1 Analyse fonctionnelle

Une analyse fonctionnelle a été réalisée à l'aide du logiciel Ingenuity Pathway Analysis (IPA®) (Ingenuity Systems, California, USA) afin de pouvoir identifier les cibles potentielles des miARN choisis. IPA® est un puissant outil d'analyse et de recherche qui révèle l'importance des données « omiques » et identifie de nouvelles cibles ou des biomarqueurs candidats dans le contexte des systèmes biologiques. Ce logiciel a été largement adopté par la communauté de la recherche en sciences de la vie et se retrouve cité dans plusieurs milliers d'articles pour l'analyse, l'intégration et l'interprétation des données issues d'expériences d'omiques, telles que le séquençage de l'ARN (RNA-seq), le séquençage des petits ARN (small RNA-seq), l'analyse des puces (microarrays) y compris les miARN et le polymorphisme nucléotidique (SNP, Single-Nucleotide Polymorphism), la métabolomique, la protéomique et les expériences à petite échelle.

L'outil « miARN Target Filter » du logiciel IPA® nous a permis de prédire les cibles potentielles des miARN dont le niveau d'expression a été retrouvé modifié en fonction de l'âge et/ou suite à l'exposition aux particules. Afin de sélectionner les cibles dont l'interaction miARN-gène a été observée expérimentalement, seule la catégorie « cibles validées expérimentalement » a été considérée en utilisant miRecords, Tarbase, TargetScan et la base de connaissances Ingenuity® comme sources. Le logiciel IPA® a également été utilisé pour

identifier les voies biologiques concernées par les interactions miARN-cible(s) et choisir les voies les plus significativement enrichies dans les L_T exposés aux PF.

3.3.4.2 RT et PCR des ARN cibles

Suite à l'analyse IPA®, 13 gènes cibles semblent pertinents. Il s'agit des gènes suivants : *Bax*, *Bcl-2*, *BMI1*, *CDK2*, *CDKN1A*, *CDKN2A*, *CDKN2D*, *CHP1*, *CTNND1*, *DFFB*, *RASSF5*, *RB1* et *TLN1*. Le niveau d'expression génique de ces cibles sera évalué en PCR en temps réel. Le protocole de la RT-qPCR pour les gènes cibles a été préalablement décrit (voir le paragraphe 3.1.2). Les références des amorces des gènes cibles sont présentées dans le Tableau II.14.

Tableau II.14 : Amorces des gènes cibles testés et des deux gènes de référence mesurés par RT-qPCR.

GENE DE REFERENCE	REFERENCE	GENE DE REFERENCE	REFERENCE
RPL13A	HS04194366_g1	IPO8	HS00914059_m1
GENE CIBLES	AMORCE	GENE CIBLES	AMORCE
Bax	Hs00180269_m1	CHP1	Hs00819122_m1
Bcl-2	Hs00608023_m1	CTNND1	Hs00609738_g1
BMI1	Hs00995536_m1	DFFB	Hs00237077_m1
CDK2	Hs01548894_m1	RASSF5	Hs00739098_m1
CDKN1A (P21)	Hs00355782_m1	RB1	Hs01078066_m1
CDKN2A (P16)	Hs00923894_m1	TLN1	Hs00196775_m1
CDKN2D (P19)	Hs00176481_m1		

CHAPITRE 3 :

RESULTATS ET DISCUSSION

Dans ce troisième chapitre, nous présenterons les résultats obtenus au cours de ce travail de thèse. Il sera divisé en trois parties. La partie 1 portera sur les travaux d'optimisation qui ont été menés afin de valider notre modèle d'étude ainsi que le protocole expérimental mis en place. Dans la partie 2, les caractéristiques de la population d'étude seront présentées. Enfin, la partie 3 sera consacrée aux résultats des impacts toxiques et des effets causés par l'exposition des L_T aux PF. L'ensemble sera suivi d'une discussion générale.

Notation des échantillons

Afin de faciliter la lecture, une notation sera adoptée pour tous les paramètres testés. Elle désignera les différentes catégories d'âge, la population d'étude ainsi que les conditions expérimentales.

Des codes couleurs sont récapitulés dans le Tableau III.15.

Tableau III.15 : Notation des échantillons de L_T .

	Non exposés	Exposés aux PF	Exposés au contrôle positif
« A » 20-30 ans			
« B » 45-55 ans			
« C » 70-85 ans			
« ABC » population d'étude			

Partie 1 : Validation du modèle d'étude

1. *Vérification de la nécessité et de l'efficacité de l'étape d'activation*

Dans le but de vérifier la nécessité de l'étape d'activation des lymphocytes T dans leur maintien en culture, différents tests ont été menés. Dans un premier temps, un test de prolifération cellulaire a été réalisé. Ensuite, l'efficacité des billes anti-CD3/CD28 dans l'activation des L_T a été vérifiée via le suivi de l'expression de deux marqueurs témoins de l'activation ainsi qu'à travers l'analyse du cycle cellulaire.

1.1. *Test de prolifération cellulaire*

Nous avons réalisé un suivi de la prolifération cellulaire chez des L_T isolés du sang total et mis en culture pendant 7 jours. Cette analyse a eu pour but de vérifier la nécessité de l'étape d'activation. Dans un deuxième temps, nous avons testé la capacité des PF à activer notre modèle cellulaire en absence de tout autre moyen de stimulation.

Une technique souvent utilisée pour suivre la prolifération cellulaire chez les lymphocytes en réponse à la stimulation consiste à utiliser un marquage fluorescent. Le marquage des L_T par le fluorochrome du *Violet CellTrace™* avant la mise en culture permet de différencier les cellules n'ayant pas subi une division. Ces dernières présentent toujours une fluorescence élevée, tandis que des L_T divisés sont caractérisés par une fluorescence plus faible. Après chaque division cellulaire, la fluorescence diminue de moitié et peut être suivie par cytométrie en flux.

Dans un premier temps, des L_T marqués par le fluorochrome du *Violet CellTrace™* et activés par les billes anti-CD3/CD28 (conditions C3 et C4) ont été comparés aux L_T non stimulés (conditions C1 et C2). L'absence de stimulation a pour but de tester le pouvoir des L_T à démarrer leur cycle cellulaire en absence d'activation. A partir de ces cellules non stimulées, la fluorescence maximale des cellules sans division a pu être déterminée. En parallèle, des L_T non marqués

(contrôle) ont été mis en culture pendant 96h. La fluorescence détectée représente l'auto-fluorescence des L_T . Des lectures de la fluorescence ont été réalisées pour chacune des conditions à 5h, 24h, 48h, 72h et 96h de culture. La Figure III.30 représente les résultats obtenus 96h sans activation (a) ou après activation des L_T par les billes anti-CD3/CD28 (b).

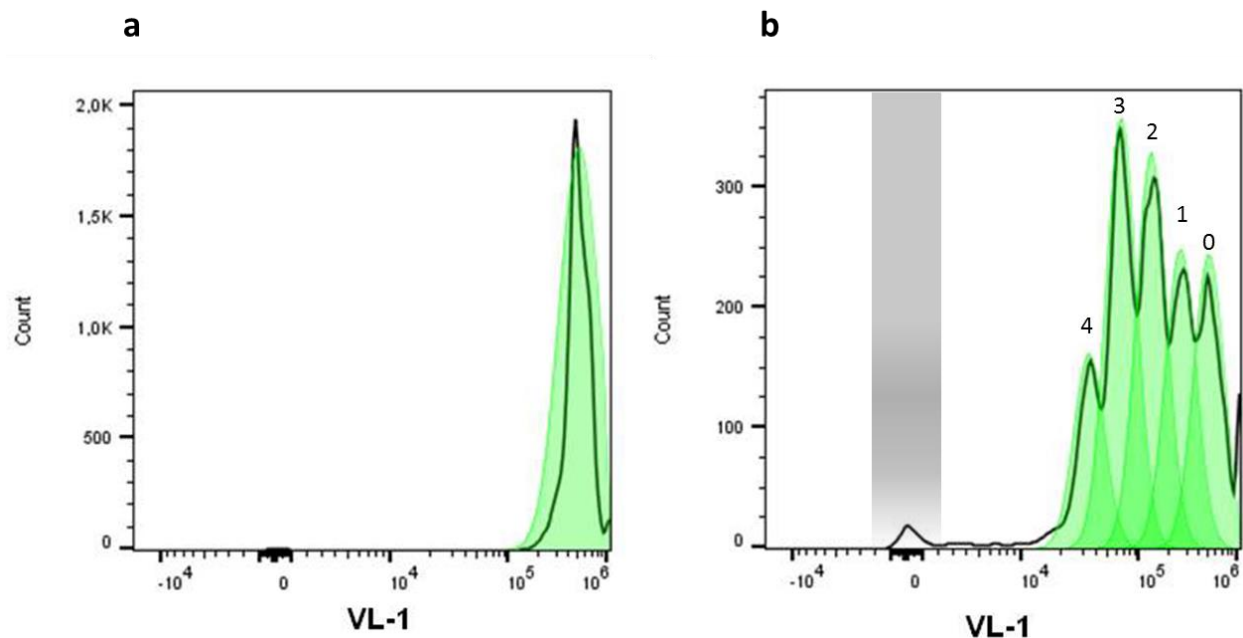


Figure III.30 : Test de prolifération cellulaire suivi par cytométrie en flux révélant la réponse des L_T après 96h : en absence d'une activation par les billes anti-CD3/CD28 (a) ; suite à l'activation par les billes anti-CD3/CD28 (b) déterminé par le marquage Violet CellTrace™. Le pic gris de gauche (b) correspond à l'auto-fluorescence des L_T non marqués.

En absence d'activation, le marquage donne un seul pic (Figure III.30a). Ce pic regroupe les L_T de la génération 0 n'ayant pas subi de division. Suite à l'activation des L_T par les billes anti-CD3/CD28, l'histogramme met en évidence cinq pics (pic 0 à pic 4) (Figure III.30b). Le pic 0 regroupe les cellules non divisées. Les pics 1 à 4 font référence aux 4 divisions cellulaires successives qui ont eu lieu. 96h après activation, 51,7% des L_T sont entrés en division (résultat non représenté).

Dans un deuxième temps, et après 96h de culture en absence d'activation, nous avons exposés des L_T aux PF pendant 72h (voir la partie 2). Une comparaison du suivi de la prolifération pendant 72h chez les L_T exposés et les L_T non exposés permet d'évaluer l'effet potentiel des PF sur la prolifération des L_T non activés. Nos résultats n'ont pas montré de déclenchement d'une division cellulaire ce qui suggère que les PF, sont incapables à elles seules de déclencher une activation des L_T .

Le *Violet CellTrace™* est un nouveau colorant de suivi de la prolifération cellulaire ayant un mode d'action similaire au colorant de référence, le CFSE (Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester). Une étude comparative des deux colorants suite à l'activation des L_T pendant 8 jours, a montré qu'au jour 5 après activation, plusieurs générations de lymphocytes ont pu être détectées. Des résultats similaires quant à la prolifération et la viabilité des cellules ont été obtenus avec les deux marqueurs. Ceci permet alors de comparer les résultats des études ayant utilisé des traceurs différents pour marquer les L_T (Zolnierowicz et al., 2013). Une étude récente a montré une augmentation progressive du nombre de L_T et des générations prolifératives du jour 3 au jour 7 qui ont suivi l'activation des $CD3^+$ par des billes anti-CD2/3/28 et leur marquage par CFSE. Un temps de culture de 5 jours est considéré optimal. Cette durée reflète la moyenne d'accroissement de la population des $CD3^+$ la plus importante ainsi que le temps convenable pour avoir une prolifération uniforme (Dock et al., 2017). Avec le même modèle d'activation que celui utilisé dans notre étude (billes anti-CD3/CD28), Li et Kurlander ont détecté, par le CFSE, un début de division cellulaire des L_T entre les 40 et 60 heures qui suivaient l'activation avec une expansion cellulaire mesurable vers 60 heures (Li and Kurlander, 2010). Une autre étude a également montré un déclenchement de la division cellulaire, chez des L_T activés pendant 72h par des billes anti-CD3/CD28 (Liamin et al., 2017). Les résultats obtenus lors de notre étude sont donc cohérents avec d'autres études menées dans le même modèle cellulaire et utilisant le même moyen d'activation.

1.2. Détection des marqueurs d'activation CD25 et CD69

Nous avons mesuré l'expression des deux marqueurs d'activation CD25 et CD69 à la surface des L_T en culture pendant 7 jours, en présence et en absence d'activation et/ou d'exposition aux PF. Les résultats sont représentés sous forme du ratio CD25/CD69 permettant de suivre l'évolution de l'expression de chacun des marqueurs en fonction du temps (intervalle de 24h).

La Figure III.31 représente l'évolution du ratio CD25/CD69 en absence d'activation chez des L_T témoins ainsi que chez des L_T exposés aux PF après 96h de culture. Les résultats montrent un ratio stable tout au long de la culture. Ce profil a été observé chez les L_T qu'ils soient exposés ou non aux PF. Les valeurs obtenues étant proche de 1, ne mettent pas en évidence une surexpression de l'un des deux marqueurs par rapport à l'autre. Toutefois, nous remarquons une tendance à la baisse à partir de 120h de culture chez les L_T témoins ainsi que chez des L_T exposés. Nous suspectons un début de mort cellulaire des lymphocytes au-delà de 5 jours de culture en absence d'activation.

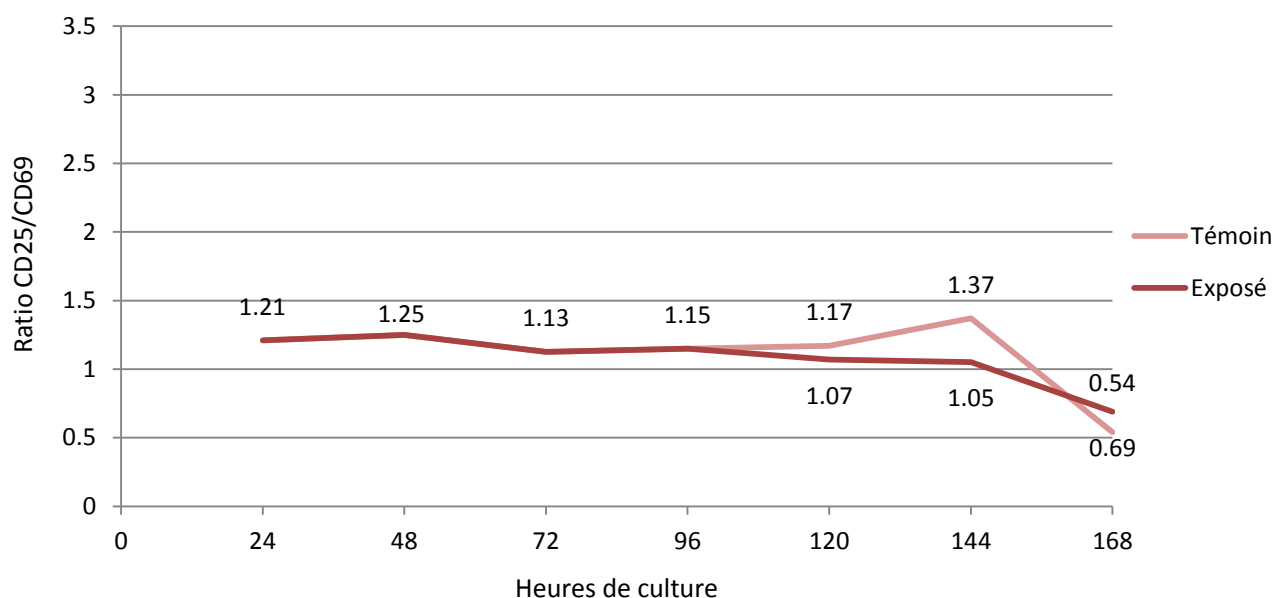


Figure III.31 : Variation du ratio CD25/CD69 en fonction du temps chez les L_T non activés et exposés ou non aux PF pendant 96h

Nous avons ensuite comparé ce ratio à celui obtenu après activation des L_T par les billes couplées aux anticorps anti-CD3/CD28 (Figure III.32). Suite à la stimulation (0h), les résultats ont montré des ratios croissants mais inférieurs à 1 jusqu'à 72h après activation. Le ratio CD25/CD69 le plus faible de 0,18 a été mesuré à 24h, mettant en évidence une surexpression précoce du marqueur CD69 non observée en l'absence d'activation. Une inversion du ratio a lieu entre 72h et 96h, où le ratio est passé de 0,70 à 1,55 à 96h soulignant une expression importante du marqueur CD25 associée à une faible expression du CD69. Les L_T exposés ce jour-là ont présenté la même tendance que celle des L_T témoins tout au long de la culture. Le ratio a continué à augmenter pour atteindre la valeur maximale 6 jours (144h) après la stimulation, 2,75 pour les L_T témoins et 3,19 pour les L_T exposés. Une faible diminution a été observée le 7^{ème} jour (168h) dans les deux conditions.

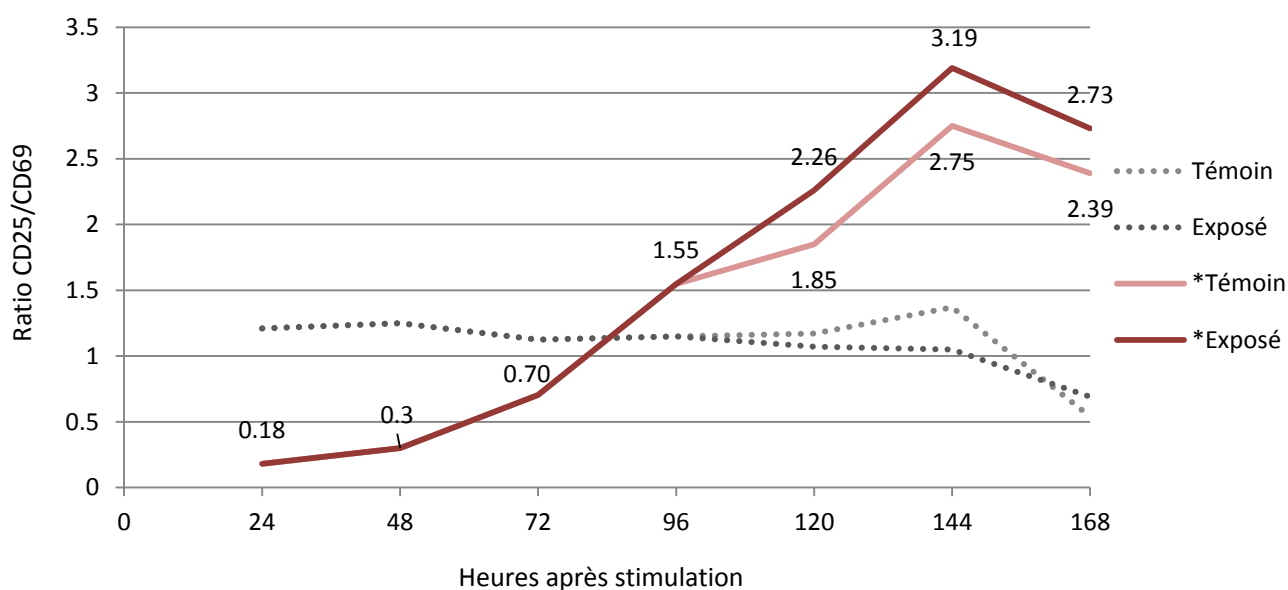


Figure III.32 : Variation du ratio CD25/CD69 en fonction des heures d'activation chez les L_T exposés aux PF après 96h d'activation et chez les L_T témoins non exposés. L'astérisque (*) représente l'activation. Les courbes en gris représentant les ratios chez les L_T non activés ont été ajoutées au graphique afin de faciliter la comparaison.

CD25 et CD69 sont deux marqueurs d'activation exprimés suite à une stimulation antigénique qui cause l'activation des L_T . L'expression stable de ces marqueurs tout au long de la

culture en absence d'activation montre que les L_T sont incapables de s'auto-activer. Cette hypothèse peut être confirmée et validée lorsque l'on observe l'augmentation de l'expression de ces marqueurs suite à l'activation des L_T par les billes anti-CD3/CD28. D'autre part, la comparaison des ratios chez les L_T exposés aux PF en absence et en présence d'activation confirme aussi l'incapacité des particules seules à activer les L_T . Peu de variations du ratio CD25/CD69 ont été détectées entre les L_T témoins et les L_T exposés aux PF.

L'évaluation de l'expression du marqueur CD69 nous a permis de mettre en évidence une surexpression précoce, 24h après la stimulation, suivie d'une diminution rapide. CD69 est un marqueur lié à la stimulation et dont l'expression diminue très rapidement une fois la stimulation du TCR est finie. L'expression de ce marqueur est normalement perdue 4-5 jours après la stimulation indiquant un effet de mitose. Trickett et Kwan ont signalé que l'activation des L_T , évaluée par l'expression du CD69, commence à se produire 1h après la stimulation avec des billes anti-CD3/CD28 (Trickett and Kwan, 2003). Une autre étude a montré que 24h après la stimulation de L_T par les anticorps anti-CD3 et anti-CD28, 80% des cellules exprimaient ce marqueur. Des stimulations répétées réalisées tous les 3-4 jours de culture causaient à nouveau des pics de CD69 peu de temps après la stimulation du TCR (Hedfors and Brinchmann, 2003). Une étude plus récente a montré que 90% des $CD4^+$ et des $CD8^+$ exprimaient le marqueur CD69 48h après la stimulation par les billes anti-CD3/CD28. Toutefois la prolongation de la stimulation jusqu'à 72h, a entraîné une diminution de l'expression du CD69 de 90% à 50% chez les $CD4^+$ et 25% chez les $CD8^+$ (Motamedi et al., 2016).

L'activation du L_T se caractérise également par l'expression de CD25, la chaîne α du récepteur d'IL-2. Ce marqueur amplifie la prolifération des L_T via une boucle autocrine d'IL-2, une cytokine décrite comme un facteur de croissance indispensable pour la prolifération des L_T (Boyman and Sprent, 2012). Une étude a montré que 90% des $CD4^+$ et $CD8^+$ exprimaient le marqueur CD25 après 72h d'activation par les billes anti-CD3/CD28 (Motamedi et al., 2016). Nos résultats ont signalé une augmentation de l'expression du CD25 au 4^{ème} jour d'activation. Ils sont en accord avec le déclenchement du cycle cellulaire entre 72h et 96h, et vérifié par le test de

prolifération cellulaire (voir le paragraphe 1.1) et l'analyse du cycle cellulaire (voir le paragraphe 1.3).

Un début de perte d'expression du CD25 au 7^{ème} jour a été observé chez les L_T activés. Hedfors et Brinchmann ont montré qu'après l'expression importante de CD25 observé au jour 4 après activation, une diminution de l'expression a commencé au 8^{ème} jour de la culture malgré la division cellulaire en cours (Hedfors and Brinchmann, 2003). Le récepteur de l'IL-2 est constitué de 3 sous chaines dont la chaine α (IL-2R α ou CD25), la chaine β (IL-2R β) et une chaine γ (CD132). Ensemble, ces trois chaines lient IL-2 à son récepteur avec une grande affinité. La diminution du niveau de CD25 durant la prolifération suggère la non-nécessité d'une forte affinité pour maintenir la prolifération des L_T (Hedfors and Brinchmann, 2003).

1.3. Analyse du cycle cellulaire

L'analyse des différentes phases du cycle cellulaire suite à l'activation des L_T a été réalisée en cytométrie en flux pendant plusieurs heures qui suivaient l'activation par les billes anti-CD3/CD28. La Figure III.33 représente le pourcentage de L_T dans chacune des phases du cycle cellulaire 96 heures après l'activation.

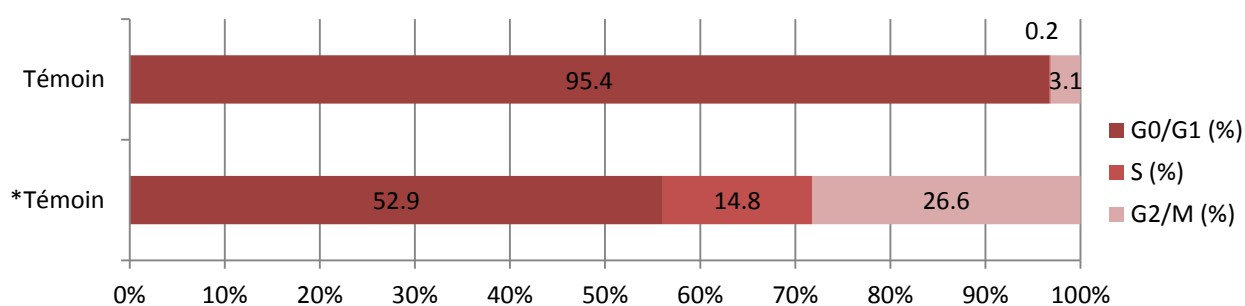


Figure III.33 : Pourcentage de L_T dans les différentes phases du cycle cellulaire (G₀/G₁, S et G₂/M) en présence et en absence d'une étape d'activation. L'astérisque (*) fait référence à une activation.

La comparaison du pourcentage de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire entre les L_T activés (*) et ceux non activés montre qu'en absence d'activation, 95,4% des cellules sont en phase G0/G1. Par contre suite à l'activation, ce pourcentage diminue et les cellules entrent en stade S (14,8%) et G2/M (26,8%).

Le passage des L_T des phases G0/G1 - durant lesquelles les cellules sont hors cycle cellulaire ou en préparation à la réplication - aux phases S de réplication de l'ADN et G2/M de croissance et de préparation à la mitose, mettent en évidence l'efficacité de la stimulation par les billes.

Le comptage de L_T en parallèle à l'analyse du cycle cellulaire a montré une croissance cellulaire proportionnelle à la durée d'activation (résultats non présentés). Ces résultats valident le système d'activation utilisé constitué de billes couplées aux anticorps CD3/CD28, capables de déclencher le cycle cellulaire des L_T.

2. Etude de la cytotoxicité

Afin d'évaluer les différents effets liés à l'exposition des L_T aux PF, une évaluation préalable de la cytotoxicité des particules est nécessaire dans le but de déterminer des concentrations de travail pertinentes.

La cytotoxicité des PF a été évaluée après 24, 48 et 72h d'exposition à des concentrations de 5 ; 15 ; 45 ; 135 µg/mL grâce au dosage de l'activité extracellulaire de la Lactate DésHydrogénase (LDH). La LDH étant une enzyme cytosolique, son activité dans le milieu extracellulaire peut être directement corrélée à la quantité de cellules lysées. Les résultats donnés dans le Tableau III.16 ont été normalisés par rapport au témoin et représentent le pourcentage de viabilité cellulaire suite à l'exposition aux différentes concentrations de PF et pour les 3 temps.

Tableau III.16 : Pourcentage de viabilité des L_T exposés pendant 24, 48 et 72h à des concentrations croissantes de PF en utilisant le test LDH. Les résultats sont décrits par les médianes accompagnées de l'intervalle interquartile de 8 réplicats ($n=8$). [Test U de Mann-Whitney ; comparaison par rapport au témoin ; en gras, $p<0.05$].

PF [$\mu\text{g/mL}$]	0	5	15	45	135
24h	100,0 [98,1-100,7]	102,4 [96,6-103,6]	98,2 [94,1-100,1]	100,0 [98,9-100,3]	98,2 [95,7-99,7]
48h	100,0 [97,1-101,2]	98,6 [96,4-100,4]	96,9 [96,1-100,6]	93,2 [91,8-94,6]	75,0 [71,6-77,2]
72h	100,0 [98,1-106,6]	100,9 [91,6-112,7]	98,5 [97,0-100,0]	89,7 [83,1-96,5]	85,6 [82,0-89,3]

Comme le montre le Tableau III.16, aucune différence significative n'a été observée entre les témoins et les cellules exposées à 5 et 15 $\mu\text{g/mL}$ quelle que soit la durée d'exposition. Par contre, les L_T exposés à des concentrations plus élevées, de 45 et 135 $\mu\text{g/mL}$, révèlent des diminutions significatives et dose-dépendantes de la viabilité par rapport aux cellules non exposées mais uniquement après 48 et 72h d'exposition. Nous pouvons donc constater que la viabilité des L_T diminue avec la concentration en PF et la durée de l'exposition.

L'exposition des L_T pendant 72h à 45 $\mu\text{g/mL}$ provoque une diminution de la viabilité de 10,3 %, se plaçant ainsi aux environs de la CE_{10} . Dans ces conditions d'exposition, il n'existe pas d'effet majeur sur la viabilité des cellules. L'ensemble de ces résultats nous a permis de choisir une concentration de 45 $\mu\text{g/mL}$ de PF et une durée d'exposition de 72h pour l'étude finale.

Au cours des étapes d'optimisation, nous avons pu valider notre protocole expérimental qui consiste à activer les cellules par des billes anti-CD3/CD28 avant de les exposer à 45 $\mu\text{g/mL}$ de PF, une dose non cytotoxique. Le test de prolifération cellulaire met en évidence la nécessité d'activer notre modèle cellulaire afin de déclencher une prolifération. D'après nos résultats, les billes magnétiques couplées aux anticorps anti-CD3/CD28 permettent une stimulation efficace des L_T vérifiée par la surexpression des deux marqueurs spécifiques à la stimulation (CD69) et à

l'activation (CD25) ainsi que par le déclenchement du cycle cellulaire et les différentes générations de L_T détectées. Une activation pendant 96h, représente un temps idéal au cours duquel les premières divisions cellulaires ont lieu

Partie 2 : Caractéristiques des populations étudiées

1. *Population totale échantillonnée*

Dans le cadre du projet de recherche PACATox, 91 sujets ont participé à l'étude. Suite à l'accord du CPP du Nord-Ouest (le 10/09/2015, ECH 15/39), l'inclusion des sujets a été menée par le centre de nutrition clinique « Naturalpha » et le Groupement de Hôpitaux de l'Institut Catholique de Lille. Les sujets ont été recrutés selon les critères d'inclusion et d'exclusion définis dans Tableau II.9. La campagne de prélèvement a débuté le 3 février 2016 et s'est terminée le 8 décembre 2016. A la fin des 10 mois d'échantillonnage, nous avons pu recueillir des échantillons de 91 sujets répartis sur les 3 catégories d'âge selon les proportions suivantes : 34 sujets entre 20 et 30 ans, catégorie « A » ; 31 sujets âgés de 40 à 55 ans, catégorie « B » et 26 personnes âgées de 70 à 85 ans, catégorie « C ».

1.1. *Caractéristiques des Numérations Formules Sanguines et dosage de la protéine C-réactive CRP*

Pour chaque prélèvement, une Numération Formule Sanguine (NFS) ainsi qu'un dosage de la protéine C-réactive (CRP) ont été réalisés pour chaque sujet permettant l'élimination des prélèvements caractérisés par une inflammation aiguë (une anomalie dans la NFS et une CRP > 10 mg/L). Le Tableau III.17 représente la NFS de la population totale échantillonnée ainsi que celle de chacune des trois catégories d'âge.

Afin de choisir le meilleur test statistique pour la comparaison des valeurs, la normalité (test de Shapiro-Wilk, $p > 0.200$) et l'homoscédasticité (test de Levene, $p > 0.200$) ont été testées. Si certains paramètres sont distribués de façon normale, on constate que nous avons rarement des distributions normales dans les trois catégories d'âge. Nous avons par conséquent utilisé les tests non paramétriques que sont le test de Kruskal-Wallis et le test U de Mann Whitney pour

mettre en évidence les différences entre les paramètres. De plus, les conditions d'égalité des variances (homoscédasticité) ne sont pas respectées pour les monocytes, les leucocytes, les hématies, les plaquettes et les basophiles dans au moins une des catégories d'âge.

Tableau III.17: Numération Formule Sanguine de la population totale échantillonnée et des trois catégories d'âge. Les résultats sont décrits par les médianes accompagnées de l'intervalle interquartile. [Comparaisons Inter-classes test U de Mann-Whitney ; a : $p < 0.05$ entre les catégories « A » et « B », b : $p < 0.05$ entre les catégories « B » et « C », c : $p < 0.05$ entre les catégories « A » et « C »].

Médiane [Q1-Q3]	Population totale n=91	« A » n=34	« B » n=31	« C » n=26
Age	51,00 [28,00-71,00]	26,00 [24,00-28,00]	52,00 [50,00-53,00]	72,50 [72,00-75,00]
Erythrocytes ($10^{12}/\text{mL}$)	4,94 [4,61-5,18]	5,05 [4,81-5,23] c	4,86 [4,61-5,13]	4,76 [4,36-5,19] c
Plaquettes ($10^9/\text{mL}$)	258,00 [220,00- 290,00]	263,50 [234,00-290,00]	258,00 [227,00-281,00]	246,00 [190,00-287,50]
Leucocytes ($10^9/\text{mL}$)	5,90 [5,20-7,00]	5,70 [5,20-6,50]	5,80 [5,40-6,80]	6,00 [5,10-7,95]
Lymphocytes (%)	32,20 [26,30-35,90]	36,65 [30,50-42,50] b, c	34,40 [27,35-35,90]	30,45 [20,70-33,00] b, c
Monocytes (%)	8,10 [6,90-9,80]	8,00 [6,35-9,85] c	7,50 [6,85-8,40] b	9,00 [8,15-10,75] b, c
Neutrophiles (%)	55,00 [51,50;60,50]	50,45 [45,45-58,4] a, c	54,40 [52,50-61,1] a	56,95 [54,00-62,60] c
Basophiles (%)	0,70 [0,50-0,90]	0,60 [0,50-0,90]	0,70 [0,60-0,85]	0,60 [0,50-1,00]
Eosinophiles (%)	2,70 [1,60-3,80]	2,40 [1,60-3,90]	2,70 [1,82-3,60]	2,90 [1,90-4,10]

Les valeurs de la NFS pour la population totale de 91 sujets correspondent aux normes décrites dans le Tableau I.4. Afin de détecter la présence de différence significative entre les trois classes d'âge, nous avons réalisé dans un premier temps, le test de Kruskal-Wallis. Concernant

les trois constituants sanguins (érythrocytes, plaquettes et leucocytes), aucune différence significative n'a été détectée entre les populations « A », « B » et « C » pour les plaquettes et les leucocytes. Toutefois, nous constatons qu'il existe, au seuil $\alpha=5\%$, au moins une différence significative entre les trois populations au niveau des érythrocytes. Le taux d'érythrocytes diminue significativement entre les personnes âgées et les plus jeunes (« C » vs « A ») (test U de Mann Whitney, $p<0.05$) tout en restant dans les normes. Quant aux constituants de la population leucocytaire, le test de Kruskal-Wallis a mis en évidence au moins une différence significative entre les classes d'âge « A », « B » et « C » pour les lymphocytes, monocytes et neutrophiles. Nous avons par la suite réalisé le test U de Mann Whitney qui a mis en évidence des différences significatives ($p<0.05$) au niveau des pourcentages de lymphocytes, de monocytes et de neutrophiles. Le pourcentage de lymphocytes diminue significativement chez les personnes âgées par rapport aux plus jeunes ($p<0.05$ entre les 75-85 ans et les 20-30 ans et entre les 75-85 ans et les 45-55 ans). Toutefois ce pourcentage reste dans les normes chez les personnes âgées. Quant à l'augmentation du pourcentage de neutrophiles, elle est significative entre les jeunes et les personnes âgées (« A » vs « C ») ainsi qu'entre les jeunes et classe d'âge intermédiaire (« A » vs « B »). Egalement le pourcentage de monocytes croît avec l'âge ($p<0.05$ entre les 75-85 ans et les 20-30 ans et entre les 75-85 ans et les 45-55 ans). Les valeurs restent néanmoins normales pour les neutrophiles et les monocytes malgré le faible dépassement observé au niveau des monocytes. Le taux de monocytes est décrit en pourcentage de monocytes par rapport aux leucocytes totaux. Les leucocytes ne présentant aucune variation significative en fonction de l'âge, nous pourrions alors constater que ce dépassement de normes observé au niveau des monocytes n'est pas significatif. Concernant les autres cellules leucocytaires, à savoir les basophiles et les éosinophiles, aucune variation significative liée à l'âge n'a été enregistrée.

La CRP dosée chez les 91 sujets est $<10\text{mg/L}$ pour 91,2% des sujets avec 51,65% de ces sujets ayant une CRP $\leq 1\text{ mg/L}$. Les valeurs de CRP enregistrées inférieures à la valeur limite pour la majorité des sujets permettent de vérifier l'absence d'inflammation aigüe chez les sujets participant à l'étude.

Les résultats de la NFS ainsi que le dosage de la CRP n'ont pas révélé de valeurs hors normes. Ceci nous a permis d'inclure tous les sujets prélevés dans notre base de données (collection biologique Aerotox 2, selon l'accord du CPP Nord-Ouest N°ECH 15/39).

1.2. Distribution des sous-populations de lymphocytes T en fonction de l'âge

Pour chacun des échantillons sanguins, nous avons évalué par la cytométrie en flux la distribution des L_T $CD3^+$ naïfs et $CD3^+$ à mémoire, en se basant sur l'expression des marqueurs de surfaces isoformes $CD45RA$ (naïf) et $CD45RO$ (mémoire) (Figure III.34).

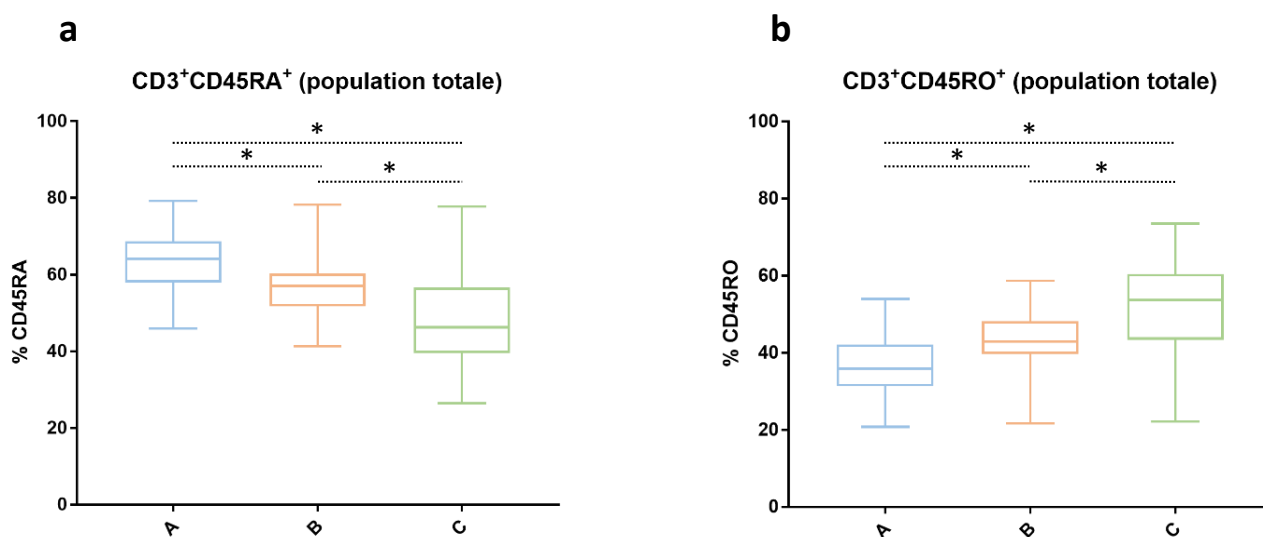


Figure III.34 : Pourcentage des L_T ($CD3^+$) exprimant le marqueur $CD45RA$ (a) et $CD45RO$ (b) dans chacune des trois catégories d'âge de la population totale échantillonnée ($n=91$). L'astérisque (*) indique une différence significative ($p < 0.05$) entre les catégories.

Les boîtes à moustaches de la Figure III.34 représentent le pourcentage de chacun des deux isoformes $CD45RA$ et $CD45RO$ au sein de la population de L_T ($CD3^+$) en fonction des trois catégories d'âge. Les résultats montrent une diminution du pourcentage des $CD3^+CD45RA^+$

(Figure III.34a) accompagné par l'augmentation du pourcentage des CD3⁺CD45RO⁺ (Figure III.34b) en passant de la catégorie « A » à la catégorie « C ». Les analyses statistiques montrent que la distribution des paramètres CD45RA et CD45RO suit une loi Normale, mais l'égalité des variances n'est pas respectée. Nous avons donc réalisé des tests non-paramétriques. Le test de Kruskal-Wallis montre qu'il existe au moins une différence significative entre les catégories « A », « B » et « C » pour les paramètres CD45RA et CD45RO. Des différences significatives au niveau de ces profils ont été observées entre les catégories « A » et « B », « A » et « C », « B » et « C » ($p < 0.05$, test U de Mann Whitney).

L'expression en majorité d'une des deux isoformes du marqueur CD45 dépend de la sous-population des L_T. L'isoforme CD45RA est exprimé en majorité chez les L_T au repos. Ces L_T naïf CD45RA⁺, activées par une variété de stimuli différents peuvent être amenées à se différencier en L_T à mémoire CD45RO⁺. Il a été montré que les proportions de ces deux isoformes varient avec l'âge. Une réduction de l'export de L_T naïfs du thymus est enregistrée avec le vieillissement (Hirokawa and Makinodan, 1975). L'analyse des changements liés à l'âge au niveau des L_T CD4⁺ et CD8⁺ a montré que la réduction des L_T naïfs était importante dans ces deux sous-ensembles de L_T accompagnée par une augmentation simultanée des L_T à mémoire (Fagnoni et al., 2000; Sansoni et al., 2008). Ceci est en accord avec nos résultats mettant en évidence la même distribution des sous populations de L_T en fonction de l'âge. Les sujets jeunes présentent plus de L_T naïfs tandis que chez les personnes âgées une population de L_T à mémoire prédomine.

L'existence d'une différence significative au niveau du profil CD45 entre les différentes catégories d'âge valide l'intervalle de 15 ans choisi entre les 3 catégories permettant de former trois classes d'âge contrastées sur les L_T à mémoire et les L_T naïfs.

2. Population d'étude

Pour la suite de l'étude, et vu le nombre important de sujets recrutés, nous avons sélectionné 10 sujets par catégorie d'âge, formant ainsi une sous-population d'étude de 30 sujets au total. Afin d'obtenir une population la plus homogène possible et représentative de la population échantillonnée, des critères de sélection ont été appliqués :

- Les prélèvements sanguins appartenaient à différents jours de prélèvement,
- La majorité des sujets choisis avaient une CRP ≤ 1 ,
- Une distribution égale entre les deux sexes a été respectée pour chaque catégorie d'âge (5 femmes et 5 hommes).

2.1. Caractéristiques des Numérations Formules Sanguines et dosage de la CRP

La population d'étude choisie présente des valeurs de NFS (Tableau III.18) qui respectent les pourcentages et les normes des différents constituants sanguins (Tableau I.4).

Partie 2 : Caractéristiques des populations étudiées

Tableau III.18 : Numération Formule Sanguine de la population d'étude et des trois catégories d'âge. Les résultats sont décrits par les médianes accompagnées de l'intervalle interquartile. [Comparaisons Inter-classes test U de Mann-Whitney ; a : $p < 0,05$ entre les catégories « A » et « B », b : $p < 0,05$ entre les catégories « B » et « C », c : $p < 0,05$ entre les catégories « A » et « C »].

Médiane [Q1-Q3]	Population totale n=30	« A » n=10	« B » n=10	« C » n=10
Age	51,50 [27,00-71,50]	25,00 [25,00-26,00]	51,50 [27,00-71,50]	72,00 [71,00-74,00]
Erythrocytes ($10^{12}/\text{mL}$)	4,91 [4,65-5,19]	5,14 [4,72-5,19]	4,85 [4,71-4,95]	4,84 [4,63-5,19]
Plaquettes ($10^9/\text{mL}$)	255,00 [215,00-278,50]	263,00 [234,00-276,00]	263,00 [247,00-281,00]	232,50 [190,00-257,00]
Leucocytes ($10^9/\text{mL}$)	5,70 [5,25-6,05]	5,50 [5,20-5,80]	5,70 [5,40-6,40]	5,90 [5,10-6,70]
Lymphocytes (%)	35,20 [28,70-37,75]	40,10 [34,90-46,90] c	35,60 [28,80-36,00]	30,45 [23,90-33,30] c
Monocytes (%)	8,20 [7,30-9,95]	8,30 [7,50-9,40]	7,50 [6,90-8,10] b	9,20 [7,90-11,00] b
Neutrophiles (%)	53,30 [49,45-57,25]	49,30 [44,20-52,50] a, c	53,20 [52,50-55,10] a	56,95 [53,40-57,30] c
Basophiles (%)	0,65 [0,50-0,90]	0,60 [0,50-0,90]	0,70 [0,60-0,70]	0,70 [0,50-1,20]
Eosinophiles (%)	2,75 [1,75-3,90]	1,90 [1,30-3,10]	2,70 [2,20-3,40]	3,15 [2,20-4,40]

Le test de Kruskal-Wallis a montré qu'il existe, au seuil $\alpha=5\%$, au moins une différence significative entre les catégories « A », « B » et « C » uniquement pour les lymphocytes, les monocytes et les neutrophiles. L'analyse statistique que nous avons réalisée nous permet de mettre en évidence de différences significatives ($p < 0.05$, test U de Mann Whitney) au niveau du pourcentage de lymphocytes uniquement entre les jeunes et les personnes âgées (« A » vs « C »). Malgré la diminution observée, le pourcentage de lymphocytes reste dans les normes. Concernant les monocytes, une augmentation significative a été enregistrée entre les moyens « B » et les personnes âgées « C » en ayant toujours les valeurs dans les normes malgré un

pourcentage qui dépasse de 1% la norme. Les neutrophiles ont également subi une élévation de leurs pourcentages entre les jeunes et chacune des deux autres catégories d'âge. Les valeurs restent normales chez les sujets âgés. Aucune différence significative n'est observée entre les trois classes d'âge pour les plaquettes, les leucocytes, les basophiles et les éosinophiles.

Les analyses statistiques ont révélé l'absence de différences significatives pour tous les paramètres dosés en NFS entre la population d'étude (n=30) et la population totale échantillonnée (n=91). Notre sous-population d'étude est donc homogène et représentative de la population totale échantillonnée.

Tous les sujets sélectionnés dans cette population d'étude ont une CRP inférieure à 10 mg/L avec 63,3% de ces sujets ayant une CRP ≤ 1 mg/L.

2.2. *Distribution des sous populations de L_T en fonction de l'âge*

Nous avons déterminé le pourcentage de chacun des deux isoformes du marqueur de surface CD45 (CD45RA et CD45RO) au sein des 30 sujets de notre population d'étude.

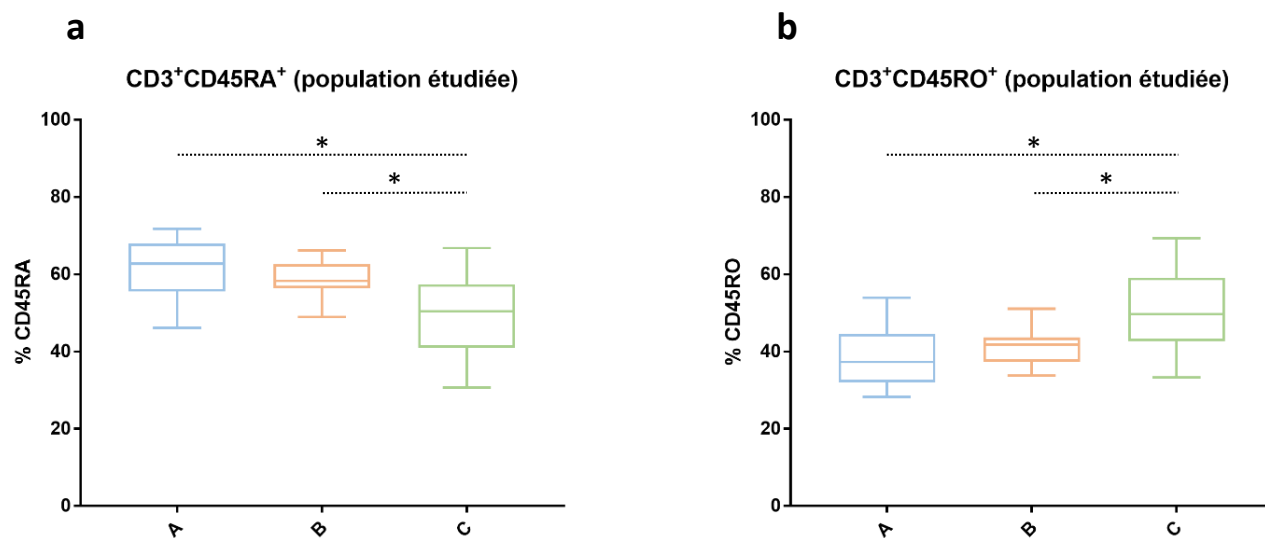


Figure III.35 : Pourcentage des L_T (CD3⁺) exprimant le marqueur CD45RA (a) et CD45RO (b) dans chacune des trois catégories d'âge de la population d'étude (n=30). L'astérisque (*) indique une différence significative (p<0.05) entre les catégories.

La Figure III.35 représente les boîtes à moustaches indiquant le pourcentage médian de chacun des deux isoformes CD45RA et CD45RO pour les 10 sujets de chacune des trois catégories d'âge. Le même profil que celui observé au niveau de la population totale échantillonnée a été enregistré. Le pourcentage le plus élevé de L_T ayant le profil CD3⁺CD45RA⁺ est observé chez les jeunes. Ce pourcentage subit une diminution en fonction de l'âge. Quant aux CD3⁺CD45RO⁺ le pourcentage est significativement plus élevé chez les sujets de la catégorie « C » par rapport aux sujets des deux catégories « A » et « B ». Les différences au niveau des profils CD45RA et CD45RO sont significative entre les catégories « A » et « C », « B » et « C » (test U de Mann Whitney, p<0.05) mais pas entre « A » et « B ».

Les résultats de la NFS ainsi que le dosage de la CRP mettent en évidence une population échantillonnée ne présentant pas d'anomalie ou de risque d'atteinte d'une inflammation aiguë. Des différences significatives ont été notées au niveau des cellules sanguines en fonction de l'âge toutefois les valeurs étaient toujours dans les normes. De plus, la distribution des L_T entre naïfs et

L_T à mémoire est corrélée avec l'âge des sujets et présente des différences significatives entre les trois catégories « A », « B » et « C » validant ainsi le choix de ces classes d'âge espacées d'un intervalle de 15 ans. Nous avons également vérifié que la sous-population d'étude formée des 30 sujets ne présentait pas de différences significatives avec la population totale. Elle pourra donc être considérée comme une sous-population représentative de la population totale échantillonnée.

Partie 3 : Effets de l'exposition aux PF, influence de l'âge

1. *Expression génique*

Nous avons, en premier lieu, cherché à valider un gène de référence adapté pour notre modèle cellulaire pour pouvoir, par la suite, étudier le potentiel de métabolisation des L_T et l'activation d'un stress oxydant suite à l'exposition aux PF.

1.1. *Choix du gène de référence*

1.1.1. *Résultats*

La PCR en temps réel (qPCR) est jusqu'à présent la technique la plus utilisée pour étudier le niveau d'expression génique, notamment chez l'homme qu'il s'agisse de cellules en culture ou de cellules primaires. Toutefois cette technique est influencée par de nombreux facteurs tels que la quantité d'ARN, l'efficacité de la transcription inverse (RT) ou celle de l'amplification. Une étape de normalisation est donc nécessaire afin d'obtenir des résultats fiables et qui sont fidèle au niveau d'expression réel. La stratégie la plus appliquée pour normaliser les résultats de la PCR consiste à amplifier un gène de référence en parallèle à la cible (Bustin, 2002). Par définition, les gènes de références ou gènes de ménage (HKG, housekeeping genes) sont des gènes constitutivement exprimés nécessaires pour assurer les fonctions basiques de la cellule (Eisenberg and Levanon, 2003). Plusieurs gènes de références sont utilisés en se basant sur le concept que ces gènes ont un niveau semblable d'ARNm dans les différents échantillons considérés. Toutefois, il n'existe pas de gène de référence universel et constant. Un gène considéré stable pour une lignée cellulaire et pour des conditions expérimentales précises, peut ne pas l'être en changeant le modèle d'étude ou les conditions expérimentales. Afin qu'un gène soit validé comme gène de référence, il doit être stable dans les conditions expérimentales testées et son niveau d'expression doit être le plus proche possible de celui du gène cible.

Dans le cadre de notre étude, nous avons analysé le niveau d'expression de 4 gènes fréquemment décrits dans la littérature comme gènes de référence utilisables sur notre modèle cellulaire. Le niveau d'expression a été étudié dans toutes les conditions expérimentales, afin de choisir celui dont l'expression est la plus stable. Ces gènes codent pour des protéines appartenant à des classes fonctionnelles différentes, diminuant ainsi le risque de co-régulation :

- le *18S*, le gène codant pour l'ARN ribosomique 18S, constituant la petite sous-unité (40S) du ribosome chez les eucaryotes ;
- la *B2M*, codant pour la protéine sérique beta-2-microglobulin, trouvée en association avec le Complexe Majeur d'Histocompatibilité de type I ;
- l'*IPO8*, codant pour l'importine-8, une protéine nucléaire permettant la régulation de l'importation des protéines ;
- la *RPL13A*, codant pour la protéine ribosomale L13A, de la famille des protéines L13P constituant la grande sous-unité (60S) du ribosome ;

Nous avons testés ces 4 gènes candidats dans tous nos échantillons cellulaires de la population d'étude « ABC » en considérant nos deux conditions expérimentales c'est à dire dans les cas d'une exposition aux PF ou non. Nous avons ensuite comparé le niveau d'expression de ces gènes afin de choisir les meilleures références.

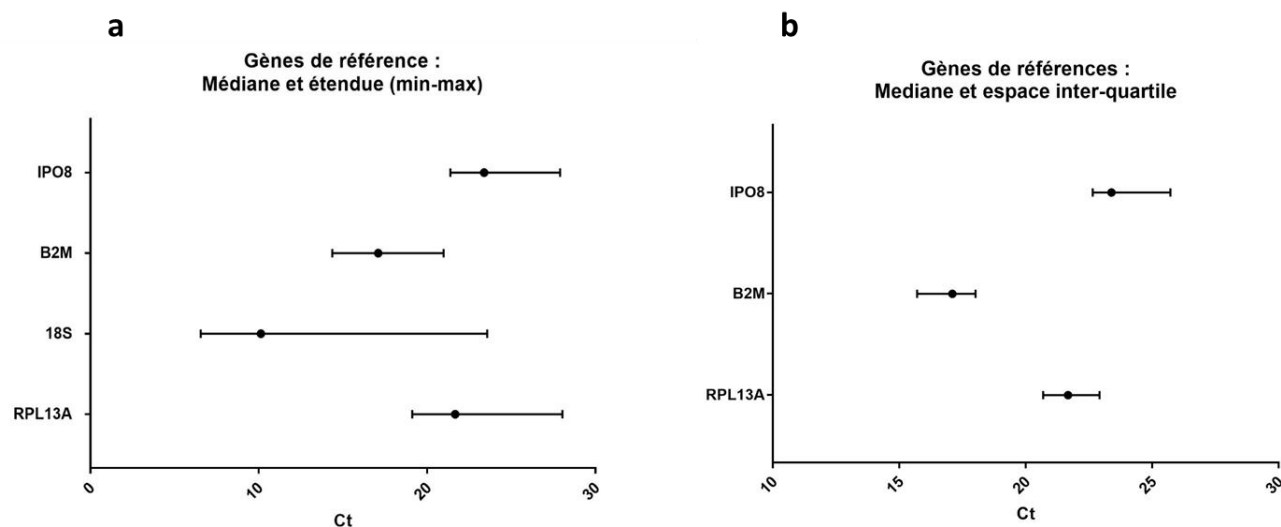


Figure III.36 : Ct médiane des 4 gènes de références testés (IPO8, B2M, 18S et RPL13A) avec l'étendue (a). Ct médiane et espace interquartile des 3 gènes de références (IPO8, B2M et RPL13A) (b).

La représentation graphique ci-dessus montre le Ct médian ainsi que la valeur minimale et maximale pour chaque gène, quelle que soit la catégorie d'âge (Figure III.36a). Parmi les 4 gènes candidats testés, le 18S présente la plus grande étendue en fonction des différents individus testés. Le gène 18S ne semble pas être le plus favorable à utiliser pour la normalisation. Suite à la comparaison des Ct médianes et de l'espace interquartile des trois gènes restants (Figure III.36b), le gène RPL13A paraît le plus stable avec l'espace interquartile le plus petit, suivi par B2M et IPO8.

Dans le choix d'un gène de référence, la stabilité du gène est un facteur important. Nous avons étudié la stabilité des 4 gènes candidats en utilisant 3 logiciels dédiés à la normalisation des gènes de référence, « NormFinder », « geNorm » et « BestKeeper ». Ces programmes permettent d'identifier, parmi un panel de gènes testés, une combinaison de gènes de référence appropriée à une expérience donnée. Le logiciel « BestKeeper » permet de classer les gènes candidats en se basant sur la variation de l'expression de leurs Ct. Quant à « geNorm », c'est un test de variation par paire de gènes. Il mesure une moyenne de stabilité « M » de l'expression de chaque gène. Une valeur « M » plus petite indique une meilleure stabilité. Contrairement à

« BestKeeper » et « geNorm », « Normfinder » tient en considération non seulement la variation globale de l'expression du gène, mais aussi la présence d'un ou de plusieurs groupes dans l'étude. De ce fait, il estime par son algorithme les variations inter- et intra- groupe. Pour chacun des gènes candidats, une valeur de stabilité « S » est attribuée. La meilleure stabilité est observée pour les gènes présentant la valeur « S » la plus faible. Le Tableau III.19 représente les résultats de l'analyse de la stabilité des 4 gènes réalisée par « BestKeeper », « Normfinder » et « geNorm ».

Tableau III.19 : Résultats de l'analyse BestKeeper, Normfinder et GeNorm chez les L_T stimulé par anti-CD3/CD28. Stabilité des gènes de ménages (housekeeping gene, HKG) calculé sur $n=30$ échantillons appariés (témoins et exposés) en utilisant les logiciels « Bestkeeper » (Pfaffl et al., 2004), « Normfinder » (Andersen et al., 2004) et « geNorm » (Vandesompele et al., 2002). Les moyennes géométriques et arithmétiques (MG et AG), ainsi que le coefficient de variation (CV) ont été déterminés avec Bestkeeper[#]. Les valeurs de M (geNorm) et de S (Normfinder) sont obtenues grâce à l'algorithme. Plus les valeurs de M et S augmentent, plus la stabilité diminue.

	18S	RPL13A	IPO8	B2M
MG [Ct][#]	9,74	21,86	23,85	16,86
MA [Ct][#]	9,94	21,91	23,91	16,92
min [Ct][#]	6,56	19,85	21,39	14,38
max [Ct][#]	23,85	28,26	27,23	21,53
CV [% Ct][#]	15,55	4,60	6,30	7,21
M-value	0,279	0,163	0,188	0,175
S-value	0,184	0,038	0,088	0,067

Les résultats de la Figure III.36 sont cohérents avec les données obtenues des trois logiciels. Parmi les 4 gènes candidats, 18S présente l'étendue la plus grande [6,56-23,85] et le coefficient de variation (15,55%) le plus élevé. En termes de stabilité, il est caractérisé par les valeurs de paramètres de stabilité « M » (0,297) et « S » (0,184) les plus élevées. « GeNorm » et « Normfinder » ont identifié RPL13A comme étant le gène le plus stable ayant les valeurs de « M » et « S » les plus faibles. Le deuxième gène candidat serait B2M suivi par IPO8 avec des valeurs de stabilité proches pour ces deux gènes. A part la stabilité, un deuxième facteur doit être pris en considération dans le choix du meilleur gène de référence. Le gène candidat doit

également avoir un niveau d'expression proche de celui des gènes cibles. Le niveau d'expression d'un gène est déterminé grâce au Ct. Des valeurs de Ct faibles indiquent une forte expression du gène. Les valeurs des moyennes géométriques (MG) et arithmétiques (MA) des Ct observés pour les 4 gènes montrent que le *18S* est un gène fortement exprimé (MG de 9,74 et MA de 9,94) suivi par *B2M* (MG de 16,6 et MA de 16,92), *RPL13A* (MG de 21,86 et MA de 21,91) et *IPO8* (MG de 23,85 et MA de 23,91). Suite à la comparaison des Ct des gènes de référence candidats avec celles des gènes cibles testés dans notre étude, les deux gènes *RPL13A* et *IPO8* semblent être les plus adaptés pour la normalisation des résultats d'expression génique dans nos conditions expérimentales.

1.1.2. Discussion

Le choix du gène de référence comme standard interne de la RT-qPCR est une étape critique afin de bien estimer les niveaux d'ARNm et d'obtenir des résultats fiables. Parmi les gènes largement utilisés comme gènes de références en qPCR, on peut citer l'ARN ribosomal 18S (*18S*), la β -actine (*ACTB*) et la GlycérAldéhyde-3-Phosphate DésHydrogénase (*GAPDH*). La stabilité de ces trois gènes de référence a été comparée au cours d'une étude sur des L_T avant et après activation. Les lymphocytes provenant de 15 sujets ont été isolés et activés par l'anticorps anti-CD3 jusqu'à 96 heures. Suite à la comparaison du niveau d'expression de ces trois gènes entre les L_T au repos et les L_T activés, l'ARNm du gène codant pour le 18S apparaît comme le plus stable, suivi par β -actine et *GAPDH* respectivement. Le *18S* a été préféré pour la normalisation dans cette étude. Toutefois des variations de l'expression du *18S* ont été observées entre les différents sujets (Bas et al., 2004).

Dans une autre étude, une approche systématique pour la sélection du gène de référence a été développée en fonction de la variance de Ct et de la normalité de la distribution. Mane *et al.* ont comparé l'expression d'un panel de 11 gènes de ménage chez des L_T CD4⁺ isolés de 6 donneurs et activés ou non pendant 4h par la PMA (Phorbol Myristate Acetate) et l'ionomycine. Parmi ces gènes, nous retrouvons le *18S*, *RPL13A* et *B2M* testés dans notre étude. Les valeurs de Ct du *RPL13A* suivent une loi normale avec des écart-types faibles indiquant une expression constitutive de ce gène même après l'activation des L_T . De plus, ce gène présente les variations

du niveau d'expression les moins importantes entre les 6 sujets. Quant à *B2M* et *18S*, des variations importantes des Ct ont été enregistrées, ne nous conduisant pas à les choisir comme gènes de référence pour ce modèle cellulaire. D'après cette étude, *RPL13A* semble être le gène de ménage le plus adapté pour les L_T CD4⁺ présentant une stabilité en fonction des conditions expérimentales et entre les différents donneurs (Mane et al., 2008).

Les 4 gènes testés au cours de cette étape d'optimisation ont été également proposés comme gènes de référence stables pour les L_T activés. Ledderose *et al.* ont étudié la stabilité de l'expression d'un panel de 17 gènes de référence chez des L_T au repos ou activés pendant 24h par des billes anti-CD3/CD28. Le classement en fonction de la stabilité réalisé par les trois logiciels utilisés, « BestKeeper », « geNorm » et « NormFinder », était très similaire au classement obtenu lors de notre étude. D'après l'étude de Ledderose *et al.* les deux gènes les plus conseillés pour les L_T au repos ou activés sont *RPL13A* et *IPO8*. Le *18S* a été sélectionné parmi les candidats stables et est classé troisième par « geNorm », toutefois, vu son niveau d'expression élevé, il sera probablement inapproprié pour la normalisation de l'expression de la plupart des gènes cibles (Ledderose et al., 2011).

Au vu de nos résultats et de ceux des études décrites ci-dessus, nous utiliserons non pas un mais deux gènes de référence pour normaliser le niveau d'expression génique des L_T activés et exposés ou non aux PF. Le couple *RPL13A-IPO8* regroupe les gènes de référence appropriés en termes de stabilité et du niveau d'expression par rapport aux gènes cibles lors de l'étude de l'expression génique chez les L_T activés. Nos données seront normalisées par la moyenne géométrique du niveau d'expression de ces deux gènes, comme recommandé dans la littérature (Pfaffl et al., 2004; Vandesompele et al., 2002).

1.2. Activation métabolique de la fraction organique des PF

Nous avons mesuré le niveau d'expression des gènes codant pour le récepteur AhR et pour quatre enzymes de métabolisation des xénobiotiques (CYP 1A1, 2E1, 2S1 et NQO1) dans les L_T exposés pendant 72h à 45 µg/mL de PF. Puisque le B[a]P est connu pour être la molécule de

référence des HAP pro-cancérogènes, il a été utilisé comme témoin positif pour élucider les effets induits par les HAP, et pour la comparaison des effets produits par le B[a]P et les PF. Le choix de ces cibles est justifié par l'implication de leurs gènes dans la métabolisation des HAP, des dioxines et des PCB retrouvés dans notre échantillon de PF.

Les résultats de l'évaluation de l'expression génique sont rapportés sous la forme des Quantités Relatives (RQ) d'ARNm par rapport au témoin. Ces résultats quantitatifs sont exprimés par le niveau d'induction d'un gène donné dans les cellules exposées aux PF ou au control positif par rapport à ce même gène exprimé dans les cellules témoins non exposées, par rapport aux gènes de référence choisis.

1.2.1. Effet de l'exposition des L_T aux PF

La Figure III.37 représente les niveaux d'expression des ARNm dans les L_T de la population d'étude « ABC ».

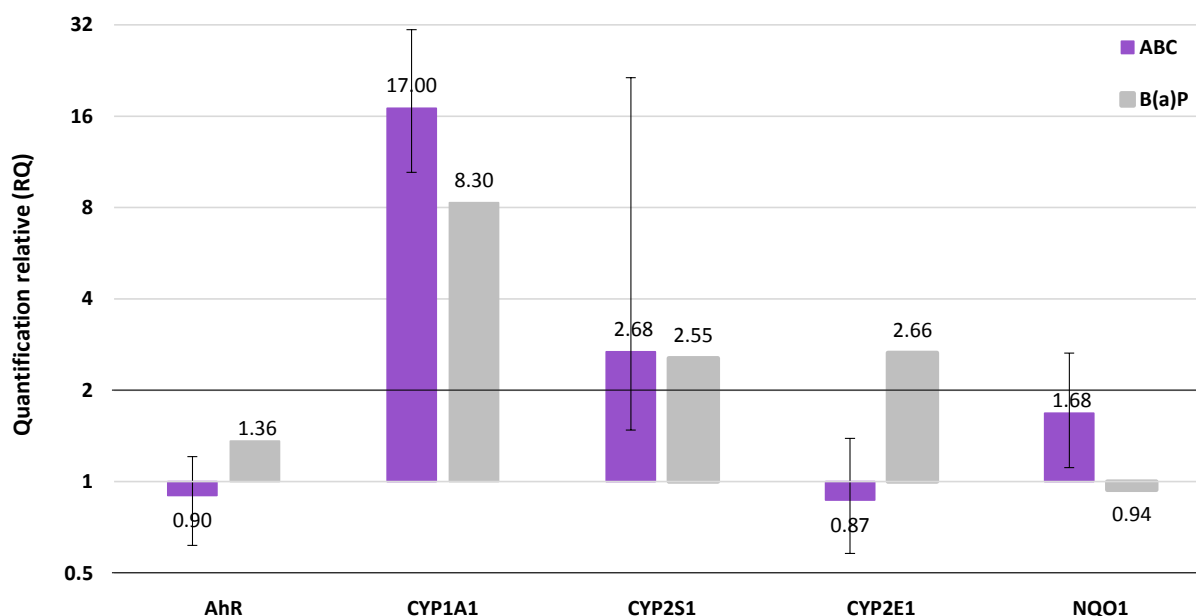


Figure III.37: Expression génique relative du récepteur AhR et des enzymes de métabolisation des xénobiotiques (CYP1A1, CYP2S1, CYP2E1 et NQO1) dans les L_T de la population d'étude « ABC » (n=91) exposés pendant 72h à 45 µg/mL de PF. Le B[a]P (2µM) est utilisé comme contrôle positif. Les résultats sont rapportés aux L_T non exposés. Les résultats sont décrits par les médianes et les quartiles (Q1, Q3).

Aucune variation significative n'a été enregistrée pour le gène *AhR* entre les L_T exposés aux PF et les L_T témoins. De même, l'exposition aux B[a]P pendant 72h n'a pas modifiée le niveau d'expression de ce gène.

L'exposition aux PF a entraîné une induction fortement significative de l'expression du *CYP1A1* (RQ=17,00). Ce gène est également induit dans les cellules exposées au B[a]P (RQ=8,30), mais à un niveau plus faible que dans les L_T exposées aux particules.

Concernant le *CYP2S1*, son niveau d'expression est aussi augmenté significativement suite à l'exposition aux PF ainsi qu'au B[a]P avec des valeurs de quantification relative (RQ) de 2,68 et 2,55 respectivement.

Aucune variation significative de l'expression du *CYP2E1* n'a été rapportée après 72h d'exposition aux particules fines. Nous avons observé par ailleurs une faible induction suite à l'exposition au B[a]P (RQ=2,66).

La dernière EMX testée est la NQO1. Ni les PF, ni le B[a]P n'ont modifié le niveau d'expression du gène codant pour cette enzyme.

1.2.2. Effet de l'exposition des L_T aux PF, influence de l'âge

Afin de chercher l'influence de l'âge sur le niveau d'expression des EMX, nous avons étudié le niveau d'expression des cinq gènes au niveau de chacune des catégories d'âge (Figure III.38).

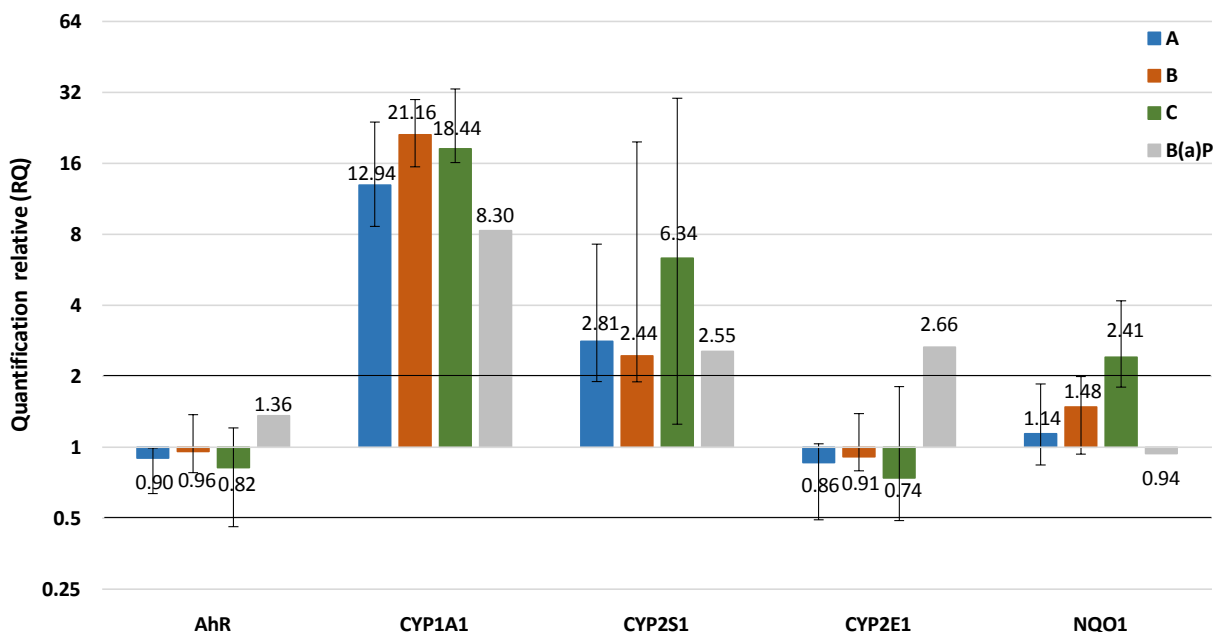


Figure III.38 : Expression génique relative du récepteur AhR et des enzymes de métabolisation des xénobiotiques (CYP1A1, CYP2S1, CYP2E1 et NQO1) dans les L_T de chacune des trois catégories d'âge (« A », « B » et « C ») exposés pendant 72h à 45 µg/mL de PF. Le B[a]P (2µM) est utilisé comme contrôleur positif. Les résultats sont rapportés aux L_T non exposés de la même catégorie. Les résultats sont décrits par les médianes et les quartiles (Q1, Q3) (A : n=34 ; B : n=31 ; C : n=26)

L'expression de l'Ahr n'a montré aucune variation significative par rapport au témoin dans les trois catégories d'âge sous l'effet des PF ainsi que suite à l'exposition au B[a]P.

Concernant le CYP1A1, une augmentation significative de l'expression du gène a été mise en évidence dans les trois classes d'âge suite à l'exposition aux PF avec des RQ de 12,94, 21,16 et 18,44 pour les catégories « A », « B » et « C » respectivement. Ces valeurs sont plus élevées que celle obtenue après exposition au B[a]P (RQ=8,30). Suite à l'exposition aux particules, le niveau d'induction le plus élevé a été noté chez les L_T de la catégorie « B » (allant jusqu'à 21,16 fois celui du témoin) suivi par celui de la catégorie « C » et finalement celui de la catégorie « A ». Toutefois ces variations entre les trois classes d'âge ne sont pas significatives ($p > 0.05$).

Une induction significative du gène CYP2S1 a été enregistrée dans les 3 catégories d'âge sous l'effet des PF. L'induction la plus importante a été observée chez les personnes âgées « C »

avec une valeur de RQ de 6,34. Toutefois aucune variation significative en fonction de l'âge n'a été observée.

Aucune variation de l'expression du *CYP2E1* n'a été notée en fonction de l'âge sous l'effet des PF.

Nous avons observé une induction significative du gène *NQO1* uniquement chez les L_T de la catégorie « C ». Des différences significatives en fonction de l'âge ont été reportées pour ce gène. Le niveau d'expression du gène *NQO1* est significativement différent entre la catégorie « A » et « C » (p=0.016) et la catégorie « B » et « C » (p=0.049). Nous n'avons pas noté une variation significative entre les sujets jeunes et ceux de la catégorie intermédiaire (« A » vs « B »).

L'expression génique de l'*AhR*, *CYP 1A1*, *2S1* et *2E1* n'a montré aucune différence significative en fonction de l'âge. Une variation significative a été observée uniquement pour le gène *NQO1* entre les personnes âgées « C » et chacune des deux autres catégories « A » et « B ».

1.2.3. Discussion

Pour les deux comparaisons réalisées, l'expression de l'ARNm d'*AhR* n'a montré aucune induction significative après 72h d'exposition aux PF et au B[a]P. Ces résultats sont conformes avec des études réalisées sur d'autres modèles cellulaires. Une absence d'induction du gène *AhR* a été reportée suite à l'exposition des cellules pulmonaires BEAS-2B aux PM_{2.5} pendant 24h (Gualtieri et al., 2011) et aux nitro-HAP ainsi qu'au B[a]P pendant 10h (Øvrevik et al., 2010). Toutefois, les L_T expriment ce gène. Il a été montré que l'*AhR* est un gène précoce exprimé à son niveau maximal 4h après l'activation des L_T avant de retourner au niveau basal entre 72h et 120 h. Cette étude a également vérifié que le récepteur AhR était fonctionnel et qu'une translocation vers le noyau, suivi de l'activation de ses gènes cibles a eu lieu après l'activation des L_T et l'exposition au B[a]P et à la dioxine (Prigent et al., 2014). Cette étude valide que nos L_T activés sont capables d'exprimer l'*AhR*. Suite à son activation, l'*AhR* se dissocie de son complexe et entre dans le noyau où il se lie à l'ARNT, son partenaire de dimérisation. Après la formation du complexe AhR/ARNT, la transcription de plusieurs gènes a lieu via le XRE.

Nos résultats ont mis en évidence une forte induction du *CYP1A1* après exposition aux PF contre une induction moindre après exposition au contrôle positif. Le *CYP1A1* est un des gènes cible de l'Ahr les plus étudiés. Ce dernier est bien connu pour son rôle physiologique important dans le contrôle de l'expression de gènes de détoxification des xénobiotiques d'une manière dépendante du ligand. L'expression du *CYP1A1* suggère fortement qu'une activation d'Ahr s'est produite dans nos cellules exposées et que des ligands à l'Ahr sont présents dans notre échantillon de PF. L'Ahr est considéré comme le récepteur primaire des HAP, des PCDD et de certains PCB dioxine-like (Rushmore and Kong, 2002; Schmidt and Bradfield, 1996). Nos résultats évoquent la compétence métabolique des L_T capables de déclencher une activation métabolique suite à l'exposition au B[a]P et aux PF. Les résultats sont en accords avec les caractéristiques chimiques des PF révélant la présence des HAP, des dioxines et des PCB dans notre échantillon (voir la partie 1.3.2.4). En effet, les particules PF contiennent plusieurs HAPs, dont les principaux sont le dibenz[a,h]anthracène, l'indéno[1,2,3-c,d]pyrène, le chrysène et le benzo[b]fluoranthène. Leur présence est reliée à des procédés de combustion et nous avons pu montrer plus précisément qu'elle s'expliquait par la contribution majoritaire des émissions des moteurs diesel, de l'activité industrielle relative à la sidérurgie (cokerie) et au raffinage de pétrole.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'expression du gène codant pour le *CYP2S1*, un des cytochromes les plus récemment décrits et caractérisés. Bien qu'il appartienne à la famille des CYP2, il présente plusieurs caractéristiques typiques de la famille des CYP1. Le *CYP2S1* est connu pour sa localisation extra-hépatique ressemblant ainsi au *CYP1A1* et *CYP1B1*. Le niveau d'expression le plus élevé a été reporté dans les tissus exposés aux contaminants présents dans l'environnement, notamment au niveau des systèmes respiratoire et digestif, ce qui confère à ce gène un rôle dans le processus de détoxification des xénobiotiques. Toutefois, une expression a été détectée au niveau de la rate et des leucocytes périphériques lui conférant également une fonction endogène au niveau du système immunitaire (Rylander et al., 2001). Une surexpression de ce gène a été notée en réponse à une maladie inflammatoire, la psoriasis (Smith et al., 2003). Ce gène est également régulé au niveau transcriptionnel par la même voie d'induction que les CYP1 : le complexe Ahr/ARNT (Saarikoski et al., 2005). Des études ont montré une induction de

ce gène suite à l'exposition à la dioxine (Rivera et al., 2002) et aux HAP (Karlgrén et al., 2005). Nos résultats ont montré une induction du *CYP2S1* suite à l'exposition aux PF ainsi qu'au B[a]P. Ces résultats sont en accord avec la composition des PF riches en HAP et dioxines, comme évoqué précédemment.

Ensuite, nous avons cherché à quantifier le niveau d'expression du gène *CYP2E1*, impliqué dans la métabolisation de nombreuses telles que les alcools (l'éthanol, le butanol, le méthanol), les COV (benzène, toluène, styrène), les hydrocarbures halogénés (le tétrachlorure de carbone, le chloroforme, le trichloréthylène) ainsi que les nitrosamines (Tanaka et al., 2000). Le niveau d'expression du *CYP2E1* n'a pas montré une induction significative après 72h d'exposition aux PF. Une faible induction, inattendue, a été reportée après exposition à 2µM de B[a]P. Toutefois, une induction significative du *CYP2E1* a été rapportée après exposition de rats aux ligands de l'Ahr (Sinal et al., 1999) dont le B[a]P (Aboutabl et al., 2009). L'absence d'induction suite à l'exposition des L_T aux PF n'exclut pas la présence des COV dans les particules, même s'il ne semble pas y avoir une quantité libérée des particules suffisante pour induire le *CYP2E1*.

Enfin, nous avons évalué le niveau d'expression du gène *NQO1*, impliqué dans la réduction de la toxicité des métabolites en modifiant leur statut oxydatif. L'action de la *NQO1* engendre une réduction des quinones, formées par les cytochromes P450, en hydroquinones minimisant la possibilité de génération d'ERO par le cycle redox. L'absence d'une induction significative a été notée suite à l'exposition des L_T aux PF ainsi qu'au B[a]P. L'induction était significative uniquement chez les personnes âgées (catégorie « C »). Cette induction retardée avec un niveau d'expression inférieur à celui du *CYP1A1* peut être expliquée par le « fine-tuning » exercé par le *CYP1A1* sur la *NQO1*. Il a été montré que l'augmentation de l'expression du *CYP1A1*, via la batterie AhR, régule l'expression d'autres EMX notamment la *NQO1* via une deuxième batterie impliquant le stress oxydant (Marchand et al., 2004). La métabolisation des HAP et des dioxines par le *CYP1A1* peut conduire à la libération d'Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO). Ces espèces causent une augmentation de la production du facteur de transcription NF-E2-related factor 2 (Nrf2) et son passage vers le noyau, où il se lie à l'élément de réponse aux antioxydants (Antioxidant Responsive Element, ARE) localisé dans la région promotrice du *NQO1* (Miao et al.,

2005). Ainsi, l'induction du *NQO1* est affectée par le CYP1A1. L'induction significative observée entre les groupes de personnes âgées « C » et chacun des groupes de personnes les plus jeunes « A » et du groupe intermédiaire « B » suggère la possibilité qu'une sécrétion d'ERO plus importante a lieu au niveau de la métabolisation des HAP et des dioxines chez les sujets âgés aboutissant par la suite à l'induction de la *NQO1*. Un lien existe entre le vieillissement et le stress oxydant (Harman, 1956b). Les personnes âgées présentent un niveau basal élevé d'ERO (Schieber and Chandel, 2014).

1.3. Expression des gènes du stress oxydant au niveau des L_T

Dans le but de tester la capacité des particules fines à induire un stress oxydant au niveau des L_T et d'étudier la réponse des L_T à la présence des ERO, nous avons mesuré l'expression génique de 3 gènes (*SOD2*, *CAT* et *HMOX1*) codant pour des enzymes ayant une activité antioxydante. L'oxyde de Cuivre (II) nanoparticulaire (CuO) a été utilisé comme témoin positif du stress oxydant.

1.3.1. Effet de l'exposition des L_T aux PF

Les niveaux d'expression des trois gènes testés au niveau des L_T de la population d'étude « ABC » sont représentés dans la Figure III.39.

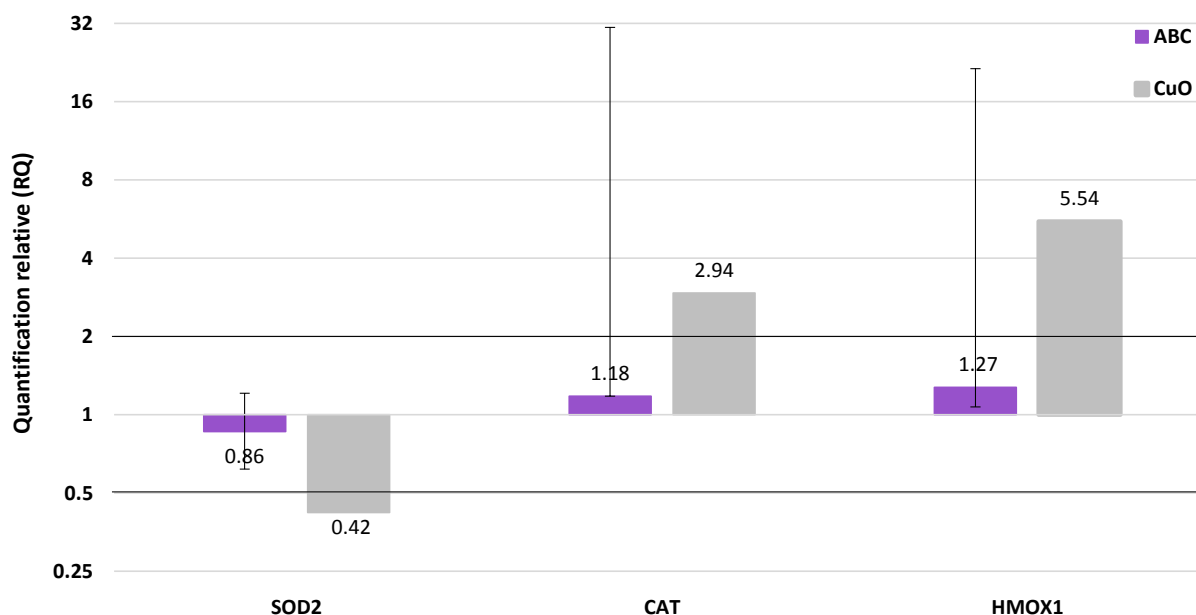


Figure III.39 : Expression génique relative des enzymes du stress oxydant (SOD2, CAT et HMOX1) dans les L_T de la population d'étude « ABC » ($n=91$) exposés pendant 72h à 45 $\mu\text{g/mL}$ de PF. Le CuO (10 $\mu\text{g/mL}$) est utilisé comme contrôle positif. Les résultats sont rapportés aux L_T non exposés. Les résultats sont décrits par les médianes et les quartiles (Q1, Q3).

Suite à l'exposition des L_T pendant 72h aux PF, les valeurs de RQ obtenues pour les gènes SOD2 (0,86), CAT (1,18) et HMOX1 (1,27) ne montre aucune induction significative. Par contre, l'exposition des L_T pendant 72h à 10 $\mu\text{g/mL}$ de CuO a créé une sous expression du niveau de la SOD2 (0,42), et une augmentation de l'expression de la CAT (2,94) et de HMOX1 (5,54).

1.3.2. Effet de l'exposition des L_T aux PF, influence de l'âge

L'expression des gènes a ensuite été étudiée au niveau de chacune des trois catégories d'âge « A », « B » et « C ». Cette représentation (Figure III.40) permet d'élucider l'éventuel effet de l'âge sur la réponse de L_T après exposition aux PF et au contrôle positif.

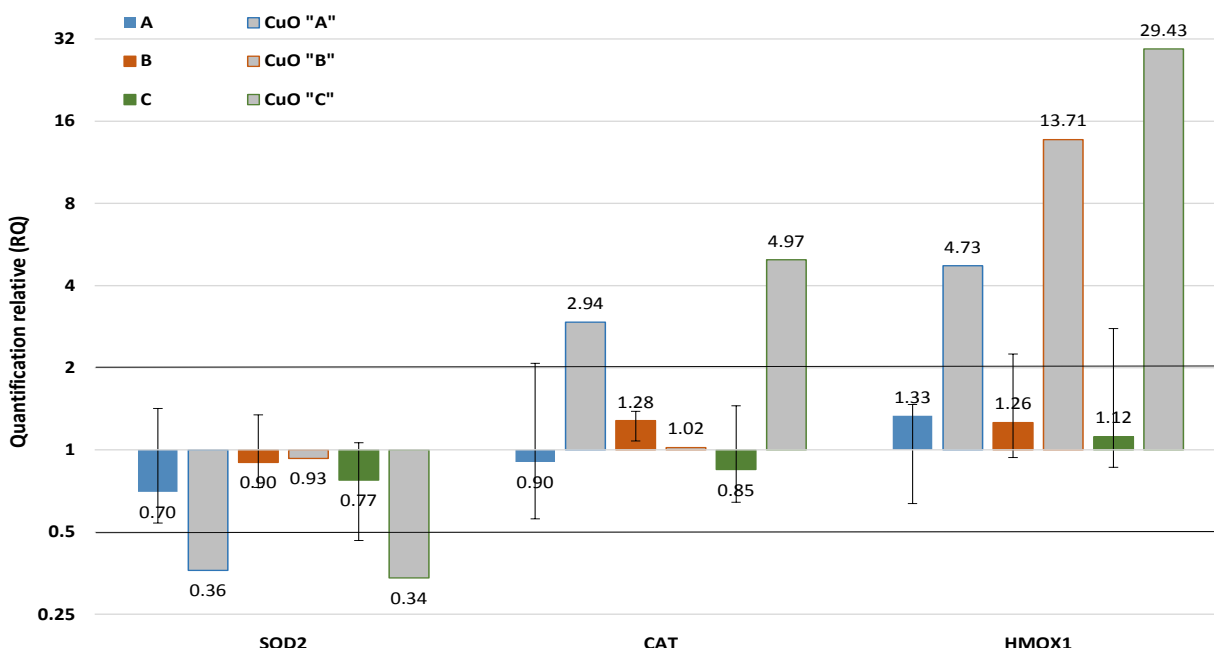


Figure III.40 : Expression génique relative des enzymes du stress oxydant (*SOD2*, *CAT* et *HMOX1*) dans les L_T de chacune des trois catégories d'âge (« A », « B » et « C ») exposés pendant 72h à 45 $\mu\text{g/mL}$ de PF. Le CuO (10 $\mu\text{g/mL}$) est utilisé comme contrôle positif. Les résultats sont rapportés aux L_T non exposés de la même catégorie. Les résultats sont décrits par les médianes et les quartiles (Q1, Q3) (A : $n=34$; B : $n=31$; C : $n=26$).

Aucune variation significative n'a été reportée pour la *SOD2* au niveau des trois catégories d'âge après exposition aux PF. Cependant, nous avons observé une sous expression au niveau des L_T des jeunes « A » (0,36) et des personnes âgées « C » (0,34) après exposition au CuO. Ces variations entre les trois catégories ne sont pas reportées comme étant significatives ($p>0.05$).

De plus, l'expression génique de la *CAT* n'a pas révélé de variations significatives par rapport aux L_T non exposés aux PF. Toutefois, suite à l'exposition au contrôle positif, une surexpression a été notée chez les catégories « A » (2,94) et « C » (4,97). Quant à la catégorie « B », le niveau de *CAT* est le même que celui des témoins. Aucune différence significative en fonction de l'âge n'a été détectée entre les trois catégories.

Le dernier gène testé, *HMOX1*, n'a pas montré une variation significative suite à l'exposition des L_T des trois classes d'âge pendant 72h aux PF. Par contre, sous l'effet du CuO,

une induction significative a été notée au niveau de chacune des trois catégories « A » (4,73), « B » (13,7) et « C » (29,43). Nous pouvons observer une tendance d'augmentation de l'expression de *HMOX1* avec l'âge en passant des jeunes « A » aux personnes âgées « C » ; toutefois, nous n'avons pas détecté de différence significative entre les trois catégories ($p > 0.05$).

1.3.3. Discussion

Nous avons cherché à évaluer le niveau d'expression de trois gènes codant pour les enzymes impliquées dans le mécanisme du stress oxydant pouvant être induit par les PF. *Nos résultats ont mis en évidence une sous expression de la SOD2 et une surexpression des deux gènes CAT et HMOX1 suite à l'exposition au CuO. Toutefois aucune variation n'a été notée après 72h d'exposition aux PF.*

La variation significative de l'expression des trois gènes suite à l'exposition au contrôle positif justifie que notre modèle est capable de détecter un stress oxydant et par la suite d'induire une réponse antioxydante enzymatique. Il est connu que les oxydes de métaux de transition tels que le cuivre, le fer et le manganèse, sont capables de générer des ERO via la réaction de Fenton (Birben et al., 2012). Parmi les différents oxydes de métaux rencontrés sous forme de nanoparticules (CuO , TiO_2 , ZnO , $\text{CuZnFe}_2\text{O}_4$, Fe_3O_4 , Fe_2O_3), le CuO semble être l'oxyde de métal déclenchant la réponse la plus élevée quant à la cytotoxicité, la génération d'ERO et la création de dommages à l'ADN (Karlsson et al., 2008). Des études sur différents modèles cellulaires tels que les cellules pulmonaires A549, les cellules épithéliales Hep-2 et les cellules endothéliales cardiaques HMVEC-C ont confirmé le potentiel oxydatif du CuO (Fahmy and Cormier, 2009; Karlsson et al., 2008; Sun et al., 2011). Ce caractère cytotoxique du CuO peut expliquer la présence d'un stress oxydant accompagné d'une expression significative des gènes antioxydants même après 72h d'exposition.

Le gène SuperOxyde Dismutase (*SOD*) code pour l'enzyme impliquée dans le système antioxydant agissant pour protéger la cellule des dommages induits par le stress oxydant. Cette enzyme catalyse la dismutation de l'anion SuperOxyde en peroxyde d'hydrogène. La *SOD2* est un des 3 isoformes de la SuperOxyde Dismutase. Localisé dans la mitochondrie, Mn-SOD est une des

enzymes antioxydantes les plus efficaces jouant un rôle dans l'élimination des ERO au niveau de la mitochondrie protégeant la cellule et atténuant le processus de l'apoptose. Cette enzyme est caractérisée également par une activité anti-tumorale (Miao and St. Clair, 2009; Valko et al., 2006). Suite à l'exposition des L_T au CuO, une sous expression significative de la SOD2 a été mesurée. La génération des ERO est normalement accompagnée d'une surexpression des gènes codant les enzymes antioxydantes protégeant ainsi la cellule des dommages du stress oxydant. Toutefois une sous expression de la SOD2 et de l'activité de l'enzyme peut avoir lieu lors d'une génération trop importante d'ERO. Une étude a ainsi montré que l'exposition de cellules photoréceptrices au ZnO est suivie par la génération d'ERO en excès, causant la diminution de l'expression et de l'activité de la Mn-SOD. Ayant un rôle majeur dans l'élimination des ERO et la protection de la mitochondrie, la diminution de l'expression et de l'activité de la Mn-SOD ne permettent pas l'élimination des ERO. Ces espèces s'accumulent au niveau de la cellule et causent un dysfonctionnement au niveau de la mitochondrie qui se traduit par la dépolarisation de la membrane et la libération de protéines apoptotiques dans le cytoplasme (Guo et al., 2016). Ce même profil de sous-expression a été observé chez d'autres types cellulaires comme les cellules du cerveau, du foie et du sang (érythrocytes) après exposition au ZnO (Shrivastava et al., 2014). Une étude récente a montré que le CuO exerce sa toxicité au niveau de la cellule via la formation des ERO. Ces espèces sont capables d'induire des dommages au niveau de la mitochondrie allant jusqu'à sa destruction et la mort cellulaire par apoptose (Chibber and Shanker, 2017). La surexpression des gènes *TP53* et *caspase 3* serait impliquée dans la mise en place de cette voie d'apoptose. Les deux gènes *TP53* et *SOD2* sont régulés mutuellement. *TP53* est capable de réprimer le gène *SOD2* au niveau de son promoteur induisant la voie apoptotique. De même, une surexpression de la *SOD2* est capable de diminuer l'expression de la *TP53* (Cullen et al., 2003).

La catalase est une enzyme antioxydante localisée dans le péroxysome. Elle convertit le peroxyde d'hydrogène en oxygène et eau. Nos résultats ont montré une surexpression du gène *CAT* chez les L_T exposés pendant 72h à 10 µg/mL de CuO. Ce même profil d'induction a été observé chez d'autres modèles cellulaires. Une étude a montré que l'activité de la catalase était

plus importante chez les cellules pulmonaires A549 exposés au CuO par rapport aux témoins (Ahamed et al., 2010). Kumaran *et al.* ont noté une surexpression de la *CAT* après exposition de cellules tumorales mammaires MCF-7 pendant 48h à 10 µg/mL de CuO (Kumaran et al., 2014).

Enfin, l'hème oxygénase-1, *HMOX1*, est un gène induit par le stress oxydant chez les L_T exposés au CuO dans nos conditions expérimentales. L'expression la plus élevée a été détectée chez les personnes âgées ce qui est en accord avec l'expression de la *NQO1*, impliquée dans la réponse au stress oxydant (Dinkova-Kostova and Talalay, 2010). La protéine est impliquée dans les réponses au stress oxydant et anti-inflammatoire déclenchées par différents inducteurs tels que la pollution et les infections. En générale, *HMOX1* est localisée dans le réticulum endoplasmique lisse. Après induction, l'enzyme subit une translocation vers la mitochondrie où elle inhibe l'apoptose (Ryter et al., 2006). Une étude a confirmé la capacité de CuO à induire une cytotoxicité via le stress oxydant. Suite à l'exposition des cellules hépatiques HepG2 à 25 µg/mL de CuO-NP pendant 24h, un déclenchement d'un stress oxydant a été noté suivi par une augmentation significative de l'expression du gène *HMOX1* et de sa protéine (Piret et al., 2012). Chez les cellules pulmonaires BEAS-2B, le gène *HMOX1* était induit après exposition pendant 24h à des particules de CuO (de taille nano ou micro-particulaire) et au CuCl₂ avec des niveaux d'induction corrélés positivement avec la concentration d'exposition. Cette étude a également montré une augmentation de l'expression de *HMOX1* chez un autre type de cellules pulmonaires, les cellules A549, après exposition à des nanoparticules de CuO et uniquement à la forte dose de CuCl₂ (Strauch et al., 2017).

Concernant les PF, nous n'avons pas observé d'induction significative des gènes antioxydants après 72h d'exposition. A notre connaissance, il n'existe pas d'études sur l'influence de l'exposition aux PF sur l'expression de l'ARNm de *SOD*, *CAT* et *HMOX1* chez les L_T exposés. Toutefois, des études sur d'autres modèles cellulaires ont pu montrer des inductions mais également des altérations du niveau d'expression des gènes impliqués dans les fonctions antioxydantes.

Plusieurs études ont établi le lien entre *HMOX1* et la cytotoxicité de différents composés tels que les PM_{2.5}, les nitro-HAP, la fumée de cigarette et les particules diesel (DEP). Ces études

ont enregistré une induction de *HMOX1* et une expression de la protéine après une exposition des BEAS-2B aux $PM_{2.5}$ pendant 2h (Deng et al., 2013a), 24h (Zhou et al., 2017), aux DEP pendant 4h (Totlandsdal et al., 2015), à la fumée de cigarette jusqu'à 24h (Kim et al., 2008) et des A549 aux nitro-HAP pendant 24h (Shang et al., 2017). La détection d'une expression génique de *HMOX1* suivie par la production de la protéine après de courtes durées d'exposition, ne dépassant jamais 24h pourrait expliquer l'absence d'une réponse antioxydante dans nos conditions expérimentales. De plus, une étude a montré une induction de la *CAT* après 24h d'exposition des cellules pulmonaires épithéliales de rat aux $PM_{2.5}$ (Choi et al., 2004). Une diminution de l'activité de la SOD et de la catalase a été enregistrée après exposition des A549 à différentes concentrations de $PM_{2.5}$ (25, 50, 100 et 200 $\mu g/mL$) pendant 48h. La diminution est révélée dose-dépendante et suggère que les $PM_{2.5}$ sont capables d'altérer la défense enzymatique antioxydante (Deng et al., 2013b)

L'absence d'induction suite à l'exposition des L_T aux PF soulève deux différentes hypothèses. Premièrement, la composition chimique de notre échantillon de PF n'induirait pas de stress oxydant et, de ce fait pas de variation significative au niveau des gènes codant pour les enzymes antioxydantes. Cependant, la composition de notre échantillon de PF a montré la présence de HAP et de métaux. Ces composés sont capables de générer des ERO et d'induire un stress oxydant chez les BEASE-2B exposés aux particules fines (Dergham et al., 2012). Deuxièmement, l'exposition aux PF a déclenché un stress oxydant suivi d'une activation du système antioxydant non détecté par l'expression génique à 72h. Nous pouvons faire référence dans ce cas au premier niveau de la réponse hiérarchisée au stress oxydant. Les effets protecteurs contre les ERO sont induits par Nrf2 qui conduit à l'activation transcriptionnelle de nombreuses enzymes antioxydantes (SOD, CAT, *HMOX1*, GST, GPX...). En raison de cette réponse, la protection de la cellule contre les ERO induits par les PF a eu lieu à de courtes durées après l'exposition. Toutefois, vu notre durée d'exposition de 72h et la demi-vie plus courte de l'ARNm par rapport aux protéines enzymatiques, une dégradation rapide aurait eu lieu après une surexpression des gènes. Cette hypothèse pourrait être renforcée par une étude de l'activité de ces enzymes.

2. Quantification des cytokines

2.1. Effet de l'exposition des L_T aux PF

2.1.1. Résultats

Nous avons quantifié 6 cytokines, IL-4, IL-10, IL-12p40, IL-13, IL-17A et IFN- γ , dans les surnageants de culture de L_T préalablement activés pendant 96h, puis exposés ou non aux PF pendant 24, 48 et 72h. Les surnageants de 8 sujets par catégorie d'âge ont été analysés en ELISA multiplex grâce à la technologie MAGPIX®. Les cytokines d'intérêt testées sont des cytokines inductrices ou sécrétées spécifiques à chacun des profils lymphocytaires Th1, Th2, Th17 ou Treg (voir le Tableau I.5).

La technique d'ELISA multiplex® utilisée permet d'analyser en une seule fois et dans le même échantillon, plusieurs cytokines. Parmi les 6 cytokines testées, les concentrations en IL-12p40 étaient trop faibles pour toutes les conditions testées, ne permettant pas l'exploitation des résultats obtenus pour cette cytokine. Malgré le grand avantage que présente cette technique, notamment l'utilisation d'un faible volume de surnageant (50 μ L) pour doser un panel de cytokines, la dilution de l'échantillon applique le même facteur de dilution pour toutes les cytokines. Dans notre cas, IL-12p40 était trop dilué pour être détecté. On se concentrera par la suite sur les 5 cytokines exprimées que nous avons pu doser (IL-4, IL-10, IL-13, IL-17A et IFN- γ).

Dans le but de détecter une variation potentielle au niveau des cytokines après exposition des L_T aux PF, nous avons comparé les concentrations des 5 cytokines. L'analyse statistique réalisée au niveau de la population d'étude « ABC » n'a pas montré de différences significatives après exposition aux PF ($p > 0.05$) et cela est valable pour toutes les cytokines et pour les trois temps d'exposition (24, 48 et 72h).

Nous avons par la suite cherché les variations de ces 5 cytokines au niveau de chacune des trois catégories d'âge. Aucune différence significative n'a été enregistrée pour les cytokines IL-10, IL-17A et IFN- γ . Nous avons choisi de représenter sous forme de graphes uniquement les cytokines et les catégories d'âge où une variation significative a été détectée.

Concernant l'expression de l'IL-4 pour la catégorie « A », une diminution de la concentration de la cytokine au cours du temps a été notée chez les témoins ainsi que chez les L_T exposés aux PF. Toutefois cette diminution est révélée significative uniquement entre 48h et 72h (Figure III.41).

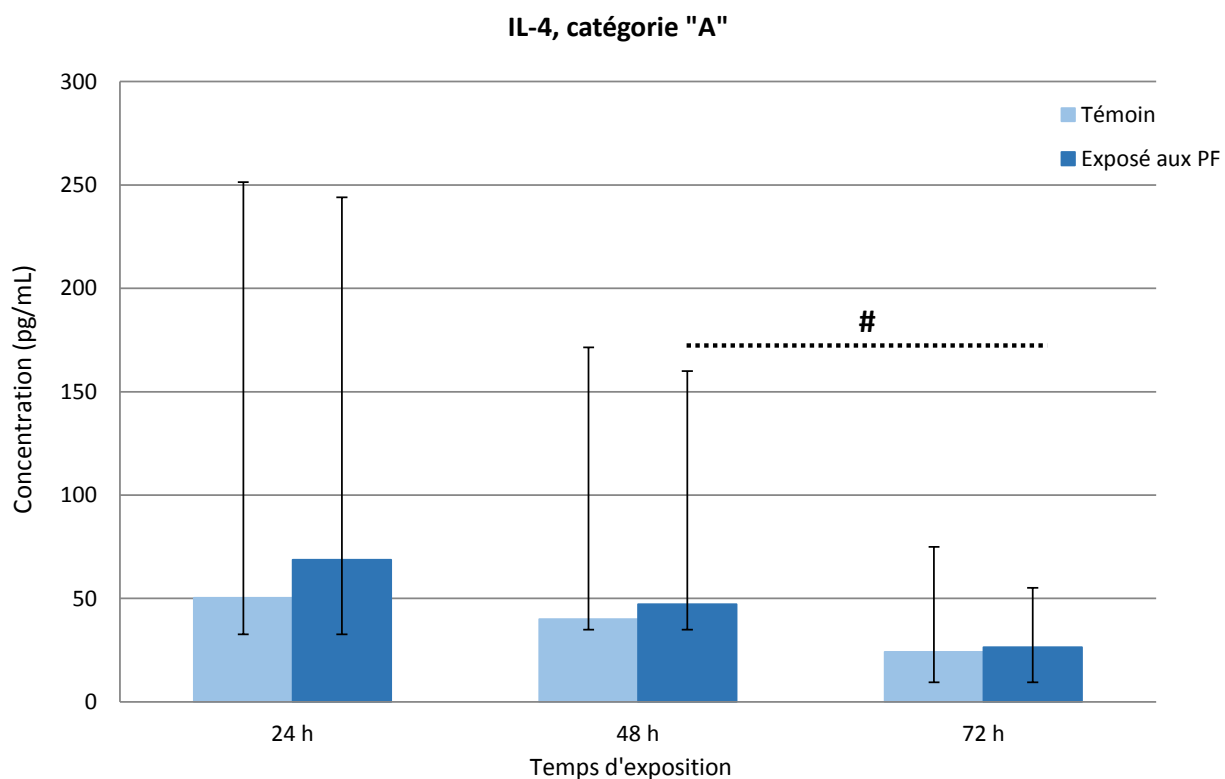


Figure III.41 : Concentration (pg/mL) de l'IL-4 libérée par les L_T de la catégorie « A » exposés ou non aux PF pendant 24, 48 et 72h. Le dièse (#) fait référence à une différence significative ($p < 0.05$) en fonction du temps. Les résultats sont décrits par les médianes et les quartiles (Q1, Q3) [test U de Mann-Whitney $p < 0.05$].

Le même profil de diminution a été observé chez les personnes âgées « C » (Figure III.42). La concentration de IL-4 baisse significativement ($p < 0.05$) chez les témoins et les exposés en passant de 24 à 72h d'incubation.

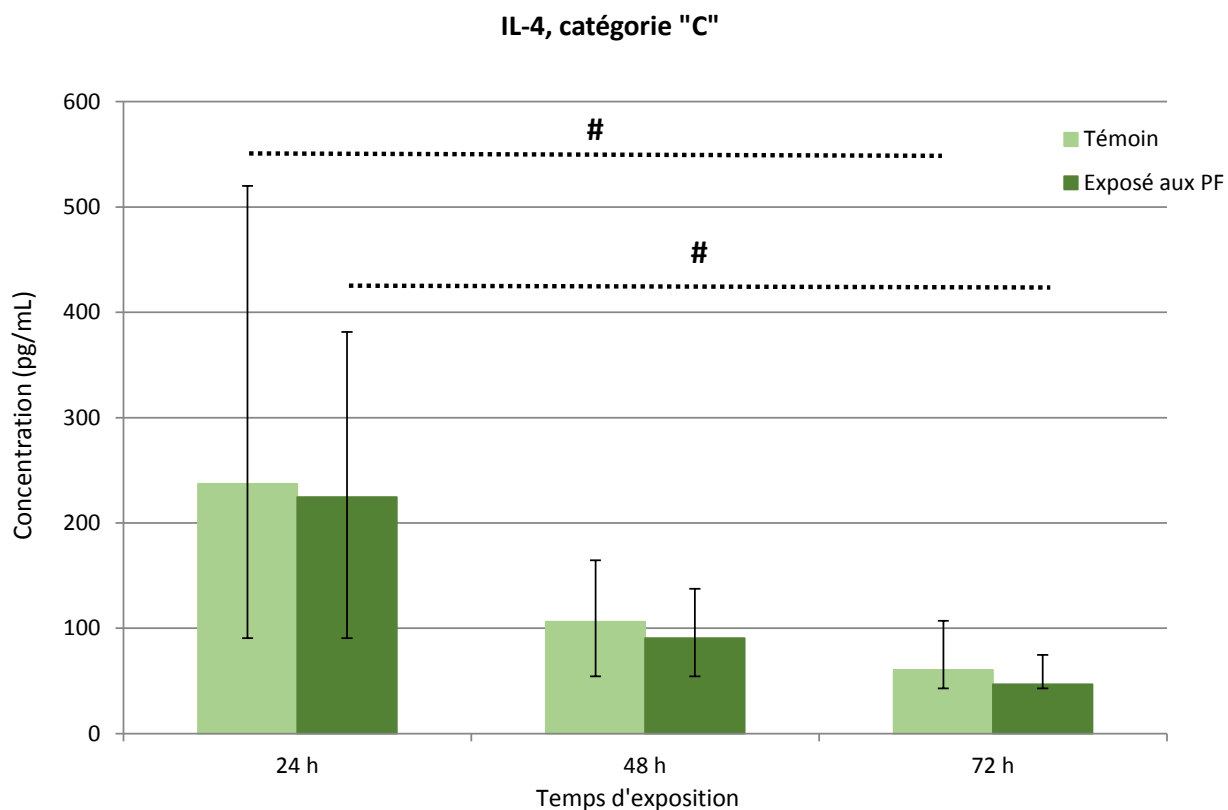


Figure III.42 : Concentration (pg/mL) de l'IL-4 libérée par les L_T de la catégorie « C » exposés ou non aux PF pendant 24, 48 et 72h. Le dièse (#) fait référence à une différence significative ($p < 0.05$) en fonction du temps. Les résultats sont décrits par les médianes et les quartiles (Q1, Q3) [test U de Mann-Whitney $p < 0.05$].

En comparant les concentrations d'IL-4 entre les catégories d'âge pour chacune des conditions (témoin et exposés) et pour les trois temps (24, 48 et 72h), nous avons remarqué une tendance à l'augmentation avec l'âge entre « A », « B » et « C ». La Figure III.43 met en évidence cette tendance à 24h. De plus, la diminution observée entre les témoins et exposés à 72h est plus importante chez les personnes âgées sans pour autant être significative.

Concernant cette cytokine, nous n'avons pas détecté d'effet significatif après l'exposition aux PF.

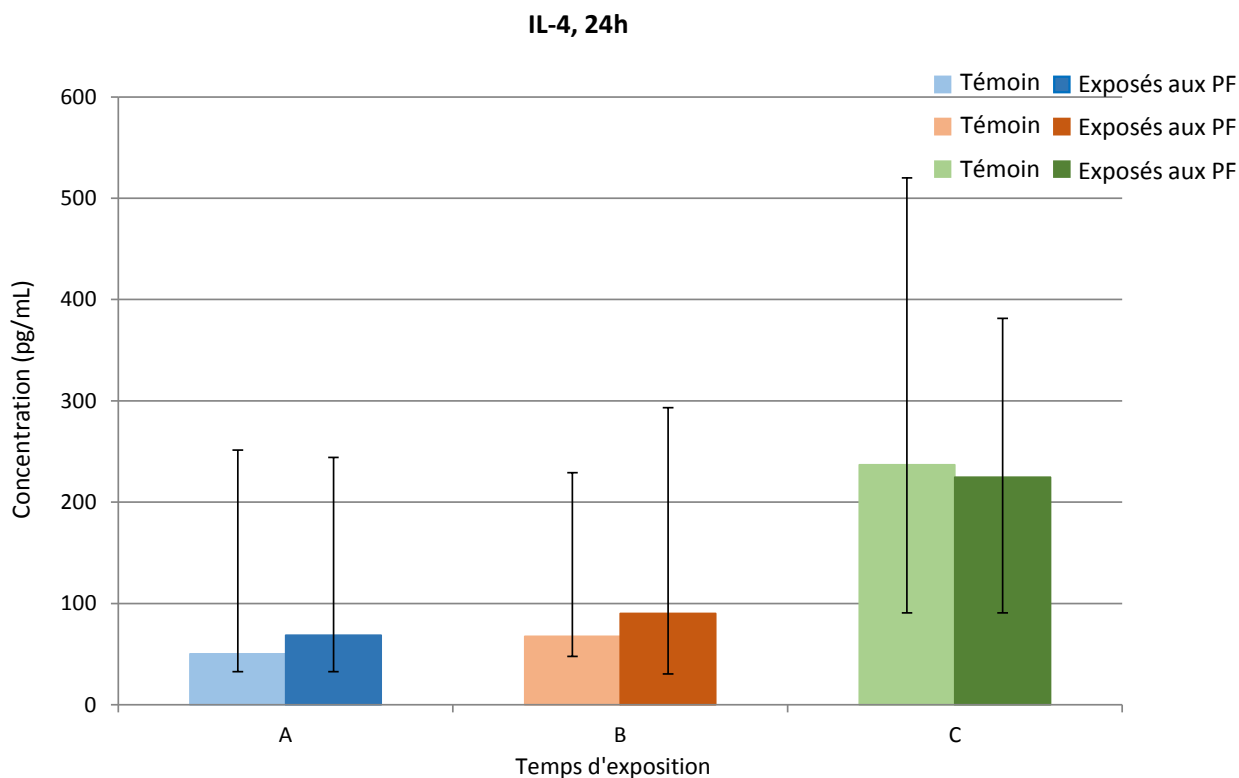


Figure III.43 : Concentration (pg/mL) de l'IL-4 libérée par les L_T de chacune des 3 catégories d'âge « A », « B » et « C » exposés ou non aux PF pendant 24h. Les résultats sont décrits par les médianes et les quartiles (Q1, Q3) [test U de Mann-Whitney $p < 0.05$].

La deuxième cytokine ayant révélé des différences significatives en fonction du temps ou des conditions expérimentales est IL-13 (Figure III.44). Pour la catégorie « B », une augmentation significative a été mesurée chez les L_T témoins en fonction du temps entre 24h (2 590 pg/mL) et 72h (4 220 pg/mL). Ce même profil a été observé chez les deux autres catégories « A » et « C » sans différence significative en fonction du temps (graphes non représentés). Une augmentation moins importante et non significative est observée chez les L_T exposés au cours du temps.

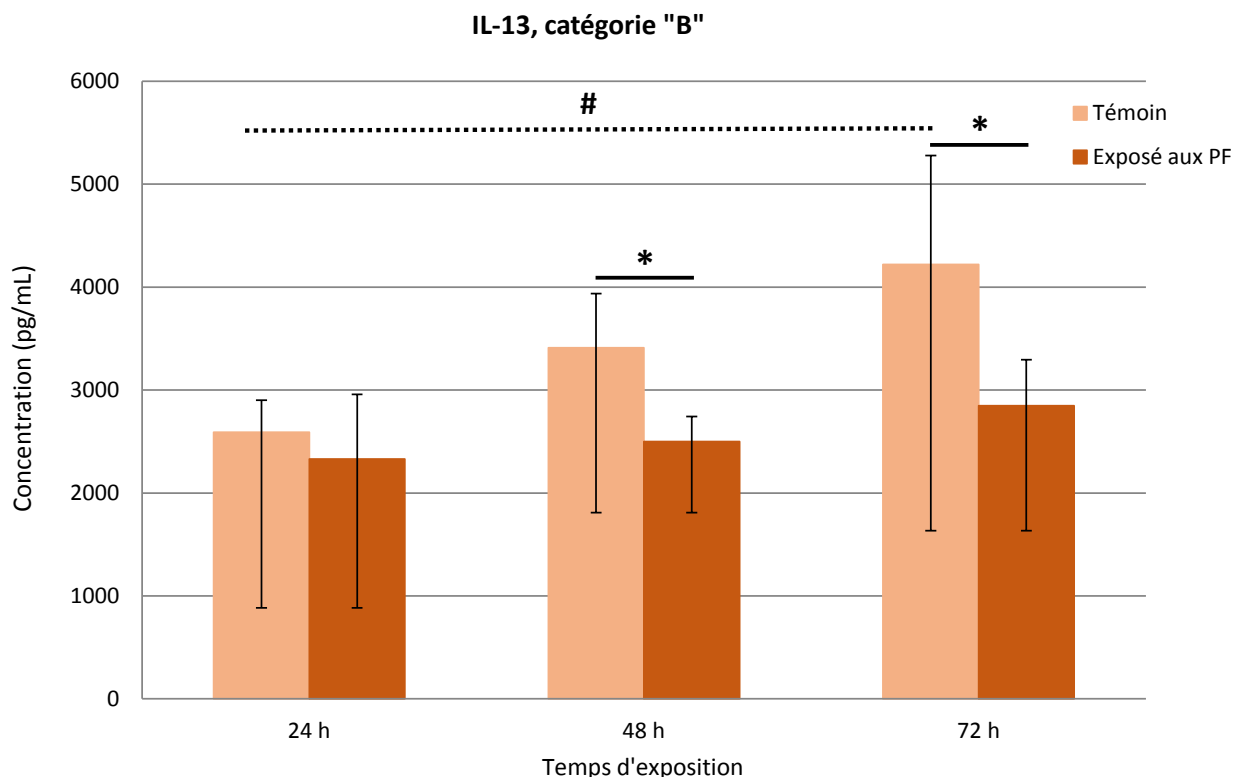


Figure III.44 : Concentration (pg/mL) de l'IL-13 libérée par les L_T de la catégorie « B » exposés ou non aux PF pendant 24, 48 et 72h. Le dièse (#) fait référence à une différence significative ($p < 0.05$) en fonction du temps. L'astérisque (*) indique une différence significative ($p < 0.05$) entre les L_T témoins et les L_T exposés aux PF pour une même durée d'exposition. Les résultats sont décrits par les médianes et les quartiles (Q1, Q3) [test U de Mann-Whitney $p < 0.05$].

Afin d'étudier le potentiel effet de l'exposition aux PF sur le niveau d'IL-13, nous avons comparé la concentration de cette cytokine chez les L_T témoins et les L_T après exposition. Une diminution significative ($p < 0.05$) de la concentration d'IL-13 a eu lieu au-delà de 24h d'exposition aux PF. La concentration d'IL-13 est passée de 3 412 pg/mL chez les témoins à 2 500 pg/mL à 48h. Ce même profil a été observé à 72h avec un passage de 4 220 pg/mL chez les témoins à 2 848 pg/mL chez les L_T exposés. Nous pouvons signaler qu'une diminution a également eu lieu après 24h d'exposition sans être significative (Figure III.44).

Nous avons observé une augmentation d'IL-13 entre les trois catégories d'âge « A », « B » et « C » pour le même temps (Figure III.45). Cette tendance à l'augmentation, non significative, est notée au niveau des L_T témoins ainsi que les L_T exposés.

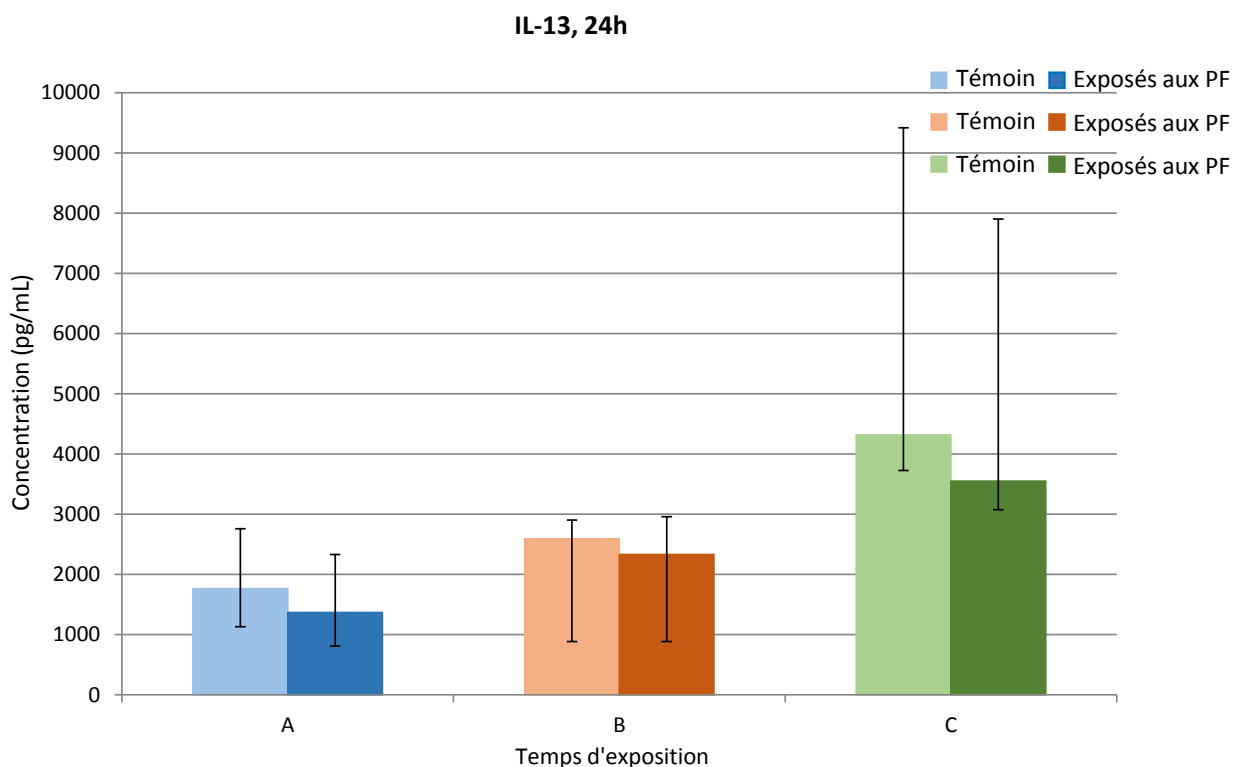


Figure III.45 : Concentration (pg/mL) de l'IL-13 libérée par les L_T de chacune des 3 catégories d'âge « A », « B » et « C » exposés ou non aux PF pendant 24h. Les résultats sont décrits par les médianes et les quartiles (Q1, Q3) [test U de Mann-Whitney $p < 0.05$].

La comparaison des concentrations des deux cytokines IL-4 et IL-13 pour une même condition (témoin ou exposé), un même temps d'incubation et une même catégorie d'âge révèle des concentrations beaucoup plus importantes pour IL-13 par rapport à IL-4.

2.1.2. Discussion

Dans le cadre de cette étude, des L_T ont été activés pendant 96h par des billes anti-CD3/CD28 pour être ensuite exposés ou non pendant 72h aux PF. Nous nous sommes intéressés

à la quantification des cytokines dans les surnageants de culture de ces L_T. Dans le but de détecter tout changement au niveau des cytokines pouvant être lié à nos conditions de culture, à la cinétique de la cytokine ou à l'âge des sujets, nous avons prélevé des surnageants de culture de L_T après 24, 48 et 72h d'exposition incluant les deux conditions testées (présence ou absence d'exposition aux PF). Les résultats présentaient ainsi les variations des concentrations des cytokines en fonction des conditions de culture, du temps ainsi que de l'âge. Le choix des cytokines d'intérêt s'est basé sur une analyse bibliographique. Ainsi les cytokines ont été sélectionnées pour représenter les profils Th1 (IFN- γ), Th2 (IL-4 et IL-13), Th17 (IL-17A) et Treg (IL-10). Le Tableau III.20 résume la variation de la production des 5 cytokines en fonction du temps et de l'âge pour chacune des deux conditions testées.

Tableau III.20 : Variation de la concentration des cytokines chez les témoins et les exposés en fonction du temps d'exposition (24, 48, 72h) et de l'âge (= : pas de variation ; ↗ : augmentation ; ↗↗ : augmentation importante ; ↘ : diminution).

Cytokines	Témoins		Exposés aux PF	
	Fonction du temps d'exposition	Fonction de l'âge	Fonction du temps d'exposition	Fonction de l'âge
IFN- γ	=	↘	=	↘
IL-4	↘	↗	↘	↗
IL-13	↗	↗↗	↗	↗
IL-17	=	=	=	=
IL-10	=	=	=	=

Nous n'avons pas observé de changements au niveau de la concentration des cytokines IL-10 et IL-17A en fonction du temps, de l'âge et de l'exposition aux PF. Aucune variation significative n'a d'ailleurs été notée.

Les variations significatives ont été notées uniquement pour les deux cytokines IL-4 et IL-13. IL-4 est une cytokine produite par les cellules Th2, les mastocytes, les cellules NK, les basophiles et les éosinophiles. Une activité biologique essentielle de l'IL-4 est la capacité à conduire la différenciation des L_T auxiliaires naïfs (Th0) en lymphocytes Th2 (Hsieh et al., 1992). Cette cytokine est inhibée par IFN- γ . IL-13 est une cytokine appartenant à la même famille α -hélice de l'IL-4. Elle est sécrétée en quantité importante par les L_T CD4⁺ activés et différenciés en profil Th2 (Brubaker and Montaner, 2001). Cette cytokine agit sur les lymphocytes B et les monocytes, et intervient dans la régulation de la sécrétion de mucus, l'inflammation, la fibrose et le remodelage des tissus. Contrairement à IL-4, IL-13 n'est pas capable d'agir directement en tant que facteur de croissance ou de différenciation. Nos résultats ont montré une diminution d'IL-4 accompagnée d'une augmentation de la concentration d'IL-13 en fonction du temps d'incubation sans exposition aux PF. Toutefois, après exposition aux PF, l'augmentation d'IL-13 n'était plus significative, une diminution significative de la cytokine a été notée chez les L_T exposés au-delà de 24h. Ces observations suggèrent le déclenchement d'une inhibition d'IL-13 causée par les PF.

Bien que les cytokines présentes dans le milieu soient le facteur déterminant pour la différenciation des L_T CD4⁺, la force de signalisation du TCR représente un facteur important à effet dominant dans le devenir des L_T au cours de leur différenciation. Dans un milieu dépourvu de cytokines inductrices, la force du signal généré par le TCR peut contrôler la différenciation des L_T (Constant and Bottomly, 1997).

Une activation efficace d'un lymphocyte T nécessite à la fois l'engagement du TCR par un complexe CMH/peptide et l'engagement de molécules co-stimulatrices. Une des principales protéines co-stimulatrices est le CD28, présent à la surface du lymphocyte T. L'affinité du TCR pour son antigène sur les molécules du CMH, combiné à l'interaction récepteur-ligand à la surface des cellules, liée à la co-stimulation, génère des intensités variables de signaux cytosoliques. La co-stimulation amplifie le signal transduit par le TCR. Les signaux circulent dans la cellule et entraînent les activités de facteurs de transcription tels que l'AP-1 (Activator Protein 1), le facteur nucléaire des cellules T activées (Nuclear factor of activated T-cells, NFAT) et le facteur nucléaire-

NF- κ B (Nuclear Factor-kappa B). L'action conjointe de ces molécules est responsable notamment de la production de la cytokine IL-2, facteur de croissance majeur pour les lymphocytes T.

La force de la stimulation peut être altérée par différents moyens : la présence ou l'absence de la co-stimulation (CD2, CD28), la nature de l'antigène (affinité pour le CMH, affinité du complexe antigène/CMH pour le TCR), le nombre de complexes antigène/CMH présents à un temps donné, le nombre de TCR induits et la durée de l'interaction entre le TCR et la CPA (Purvis et al., 2010). Les variations de l'intensité des signaux peuvent altérer les profils des CD4⁺. De fortes stimulations, telles qu'une dose élevée de peptides ou un ligand fortement agoniste, entraînent des réponses de type Th1 tandis que des stimulations moins intenses, comme une dose faible de ligand ou un ligand faiblement agoniste, favorisent la différenciation en profil Th2 (DuPage and Bluestone, 2016; van Panhuys, 2016). De faibles doses d'antigène induisent un signal calcique suffisant pour permettre la synthèse d'IL-4 alors que des concentrations élevées de peptides déclenchent à la fois un signal calcique et l'activation de la voie des MAP kinases, conduisant à la production d'IFN- γ (Constant et al., 1995; Hosken et al., 1995). Il est important de signaler qu'il existe une certaine plasticité entre les différents profils de lymphocytes T CD4⁺ et que la force de signalisation au niveau du TCR est un des facteurs régulateurs de cette plasticité (DuPage and Bluestone, 2016).

Au vu de nos conditions expérimentales et de nos résultats, une hypothèse pourrait être proposée : Un changement de profil a lieu au-delà de 96 heures d'activation par les billes anti-CD3/CD28. Quelques L_T acquièrent le profil Th2. L'exposition aux PF ralentit le changement de profil.

Nos conditions expérimentales consistaient à activer les L_T pendant 96h par des billes magnétiques couplées aux anticorps anti-CD3/CD28 en respectant un rapport de bille par cellule de 1 :1. La stimulation simultanée du CD3 et du CD28 agit en synergie pour augmenter considérablement le niveau d'activation. Ainsi nous considérons qu'une forte stimulation a eu lieu au niveau de chaque lymphocyte T induisant un profil Th1 caractérisé par la sécrétion d'IFN- γ . Des études ont montré une différenciation des Th0 en Th1 suite à l'activation par des billes anti-CD3/CD28. Le dosage des cytokines 96h après l'activation de CD4⁺ par des billes couplées

aux anticorps anti-CD3 et anti-CD28, a révélé une expression de la cytokine IFN- γ et non pas d'IL-4 (Anderson et al., 2003; Broeren et al., 2000).

Au cours de la durée d'activation de 96h, une prolifération cellulaire a été enregistrée. Les résultats du test de prolifération (*Violet CellTrace™*) ainsi que ceux des marqueurs de surface (CD69 et CD25) et du cycle cellulaire (voir la partie 0) attestent le déclenchement des divisions et du cycle cellulaire, accompagné de l'augmentation de l'expression du marqueur spécifique d'activation CD25. Cette activation a donc augmenté le nombre de L_T dans le milieu de culture diminuant ainsi le ratio bille : cellule. Une étude a montré une diminution de la sécrétion d'IFN- γ au jour 4 après la stimulation des $CD4^+$ par des billes anti-CD3/CD28 (Broeren et al., 2000). Suite aux 96h d'activation, le nombre de billes présentes à un moment donné est plus faible que celui des L_T . De ce fait, le nombre de L_T qui subissent la forte stimulation due au contact avec les billes pourrait diminuer. Des L_T au profil Th2 peuvent apparaître dans le milieu de culture exprimant les cytokines IL-4 et IL-13. Un mélange de L_T Th1/Th2 coexisterait ainsi dans le milieu. Nous avons en effet mesuré un niveau d'IL-4 faible mais détectable chez les L_T témoins et exposés 24h aux PF. Il a été montré que les L_T stimulés par une faible concentration de peptides subissent l'induction de GATA-3, essentielle pour la production précoce d'IL-4 (Yamane et al., 2005). Le niveau d'IL-4 en baisse observé dans nos résultats entre 24 et 72h n'est pas lié à la diminution de l'expression de l'ARNm de l'IL-4. La concentration de cette cytokine diminue dans le milieu d'une manière partiellement dépendante de la densité cellulaire, pendant la période de culture. Une étude a démontré que l'addition d'IL-4 exogène à la culture de L_T stimulés pendant 72h entraîne la consommation de cette cytokine de manière proportionnelle à la concentration cellulaire (Van der Pouw-Kraan et al., 1992). Quant à IL-13, cette cytokine ne montre pas cette déplétion associée à un phénomène lié au récepteur notamment à cause de l'absence de récepteurs d'IL-13 sur la membrane des L_T (Minty et al., 1997; Zurawski et al., 1993). Au contraire, nos résultats ont révélé une augmentation de la concentration en fonction du temps notamment chez les témoins suggérant une production de cette cytokine par des L_T de profil Th2. Quant aux L_T exposés, une faible tendance à l'augmentation d'IL-13 a été observée, sans être toutefois significative. La diminution du niveau d'IL-13 chez les L_T exposés par rapport aux témoins ainsi

que la restriction de l'augmentation de cette cytokine suite à l'exposition suggère un effet des PF sur le profil des L_T. L'ajout des PF après les 96h d'activation modifie la stimulation des L_T et retarde ainsi le passage des L_T en profil Th2. Cette proposition peut être justifiée par les résultats obtenus pour le marquage CD25. Une activation par les PF a été observée dès les premières 24h d'exposition avec un ratio CD25/CD69 plus important chez les L_T exposés par rapport aux témoins. De plus, différentes études *in vivo* (van Panhuys et al., 2014; Pfeiffer et al., 1995) et *in vitro* (Constant et al., 1995; Hosken et al., 1995; Milner et al., 2010; Yamane et al., 2005) ont démontré que le degré de signalisation via le TCR et le co-stimulateur peuvent influencer les mécanismes de différenciation des L_T, comme suggéré dans notre étude.

Enfin, nos résultats de suivis d'activation et de prolifération cellulaire confortent cette hypothèse. Toutefois, il s'avèrerait intéressant de développer une démarche expérimentale capable de valider l'hypothèse proposée. Nous suggérons de réaliser nos deux conditions de culture avec la même cinétique testée mais en variant le ratio bille : cellule (un ratio plus élevée et un ratio plus faible que celui utilisé dans notre protocole) afin de vérifier l'influence de la force de stimulation sur le profil de L_T. Le suivi pourra être réalisé en cytométrie en flux permettant ainsi de doser les cytokines intracellulaires en combinaison avec des marqueurs de surface. Ce suivi dès le début de l'activation jusqu'à la fin de l'exposition permettra d'identifier pour chaque temps de culture et pour chacune des deux conditions le pourcentage de cellules dans chacun des 4 profils testés (Th1, Th2, Th17 et Treg). Il serait également intéressant de tester la conservation du profil des L_T en cas de re-stimulation par les billes anti-CD3/CD28 juste avant l'exposition.

2.2. Cytokines et âge

Concernant l'influence de l'âge sur la concentration des cytokines, nos résultats ont montré une tendance à l'augmentation des deux cytokines caractéristiques du profil Th2, IL-4 et IL-13 avec l'âge pour les deux conditions et les 3 temps. Quant à IFN- γ , une tendance à la diminution a été notée en fonction de l'âge.

Des altérations de la fonction cellulaire telles que la prolifération, la signalisation intracellulaire, la production de cytokines et la fonction effectrice ont été liés à l'âge (Weng, 2006). L'évaluation des changements au niveau de la production des cytokines a constitué le centre d'intérêt de nombreuses études dans lesquelles le niveau des cytokines a été suivi en parallèle chez des sujets jeunes et âgés. Toutefois, les stratégies expérimentales utilisées étaient différentes : différents agents de stimulation des lymphocytes, différentes doses, temps d'évaluation, méthode de dosage des cytokines. Ces différences rendent difficile la comparaison entre les résultats des études.

Concernant IFN- γ , des études ont reporté une capacité réduite des personnes âgées à produire cette cytokine. Une diminution de la production de IFN- γ chez les lymphocytes des personnes âgées par rapport aux jeunes a été notée (Cakman et al., 1996; Paganelli et al., 1996; Sindermann et al., 1993). Toutefois, et suite à une stimulation non spécifique (PHA, ConA ou anti-CD3), l'association entre l'âge et la production d'IFN- γ n'est pas bien établie. Des études ont montré une diminution de la concentration de la cytokine après activation par la PHA, la ConA ou anti-CD3 (Born et al., 1995; Candore et al., 1993; Lio et al., 2000), d'autres une augmentation (Murasko et al., 2002; Sandmand et al., 2002) ou pas de changement (Weifeng et al., 1986). Suite à une stimulation spécifique à l'antigène, par le virus de l'influenza, la corrélation entre le vieillissement et la diminution de la production de la cytokine était reportée dans plusieurs études (Bernstein et al., 1998; Gardner et al., 2006; McElhaney et al., 2006; Murasko et al., 2002). La concentration de la cytokine était plus faible chez les personnes âgées. Dans nos travaux, une tendance à la diminution a été observée en fonction du temps au niveau des L_T de la catégorie « B » exposés aux PF. Toutefois, cette baisse de concentration n'est pas significative. Le niveau d'IFN- γ dans la catégorie « C » était plus faible que celui des deux catégories « A » et « B » pour une même condition et durée d'exposition.

A propos des cytokines du profil Th2, une augmentation de la production a été observée avec l'âge pour IL-13 (Paganelli et al., 1994; Pietschmann et al., 2003) et IL-4 (Cakman et al., 1996; Paganelli et al., 1994; Rink et al., 1998a; Sandmand et al., 2002). Cependant, des différences au niveau de la production d'IL-4 suite à des stimulations non spécifiques peuvent être liées à l'agent

utilisé pour la stimulation. Après l'activation par des anticorps anti-CD2/CD28, une augmentation de la cytokine a été notée au niveau des PBMC (Nijhuis et al., 1994). Une stimulation par anti-CD3 et PMA a causé une diminution de la production chez les personnes âgées (Karanfilov et al., 1999). Des études ont noté l'absence de changements au niveau de la concentration d'IL-4 entre les jeunes et les personnes âgées après stimulation par la PHA (Candore et al., 1993) ou la ConA (Bernstein and Murasko, 1998).

D'après ces études, il est clair que des changements liés à l'âge existent au niveau de la production des cytokines. Toutefois, des études plus approfondies seraient nécessaires afin de mieux comprendre ce lien entre le vieillissement et la dérégulation des cytokines.

3. Etude transcriptomique des miARN

Nous avons mené une étude transcriptomique des miARN dans les L_T exposés *ex vivo* ou non pendant 72h aux PF. L'analyse a été menée en trois étapes. Dans un premier temps, nous avons testé l'expression des miARN connus à l'aide de la puce Affymetrix®. Un ensemble de miARN identifiés lors de l'analyse des résultats de la puce ont ensuite été quantifiés par RT-qPCR. Dans une troisième étape, une analyse fonctionnelle a permis de sélectionner des cibles potentielles des miARN dont l'expression était statistiquement modifiée dans notre modèle cellulaire. La Figure III.46 présente ces trois étapes ainsi que les critères de sélection appliqués.

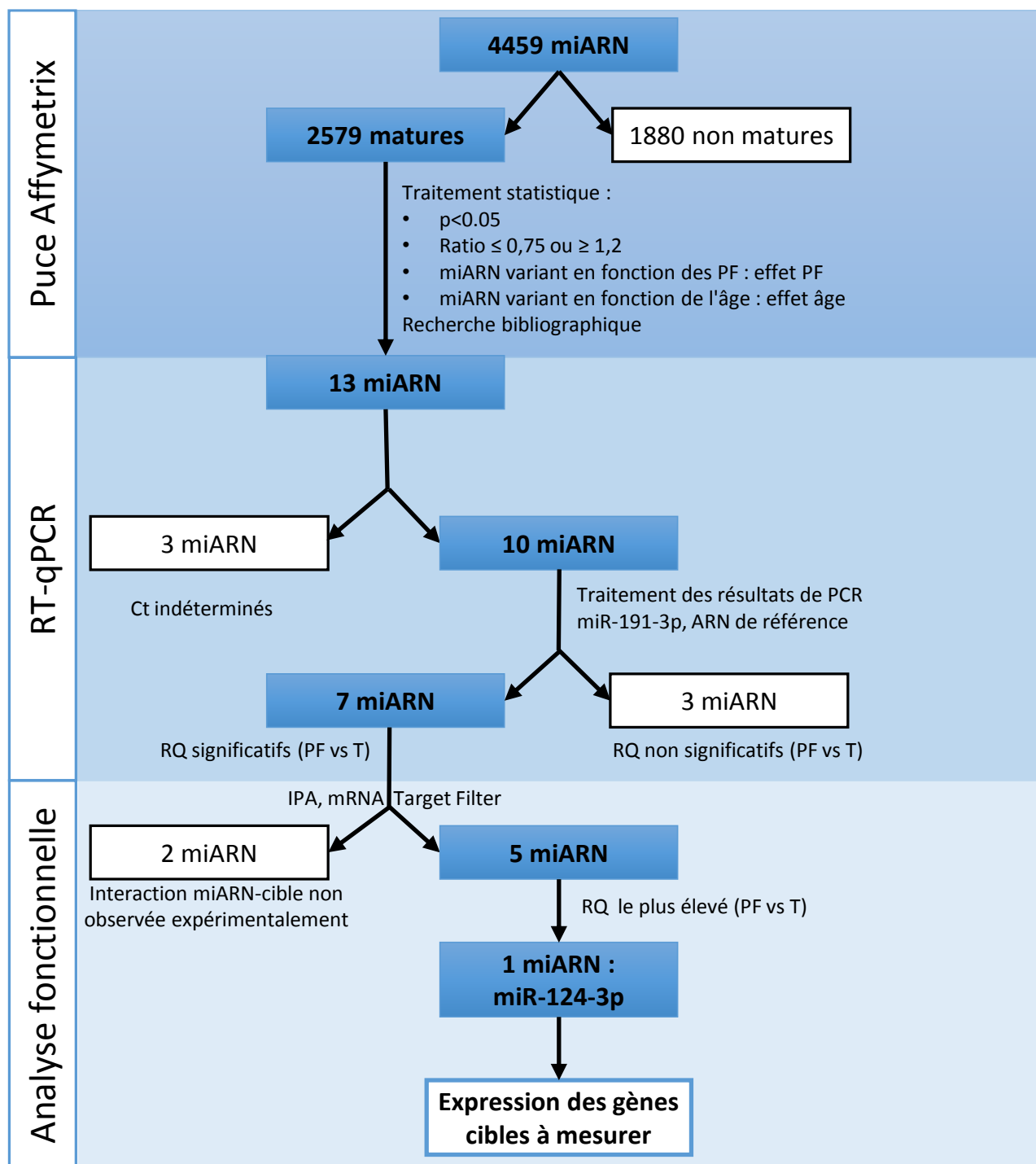


Figure III.46 : Schéma des étapes de l'analyse transcriptomique des miARN.

3.1. Puce à miARN

3.1.1. Puce Affymetrix® et analyse statistique

La puce Affymetrix® GeneChip® miRNA Arrays a été utilisée afin de déterminer l'ensemble des miARN dont le niveau d'expression a été modifié dans les L_T suite à leur exposition aux particules et/ou en fonction de l'âge des sujets pour 18 volontaires (6 sujets par classe d'âge). La réalisation de la puce ainsi que l'analyse statistique des résultats ont été réalisés par la plate-forme de génomique de l'Institut Cochin à Paris. Parmi les 4 459 miARN analysés, uniquement les miARN matures (2 579 miARN) ont été conservés pour la suite de l'analyse. Un traitement statistique « matAnova » des résultats de la puce a été ensuite réalisé afin de déterminer les différences significatives des niveaux d'expression des miARN entre les cellules témoins et celles exposées aux particules pour chaque classe d'âge (« A »_PF vs T, « B »_PF vs T et « C »_PF vs T), ainsi qu'entre les différentes classes d'âge pour les cellules exposées aux particules d'une part (PF_« B » vs « A », PF_« C » vs « A » et PF_« C » vs « B ») et les cellules témoins d'autre part (T_« B » vs « A », T_« C » vs « A » et T_« C » vs « B »). Le Tableau III.21 regroupe le nombre de miARN totaux et matures ayant une valeur de $p < 0.05$ et donc un niveau d'expression significativement différent pour les différentes comparaisons étudiées.

Tableau III.21 : Nombre de miARN totaux et matures obtenus par la puce à miARN et ayant un $p < 0.05$ pour les différents types de comparaisons étudiées.

miARN totaux (puce)	miARN matures (puce)	Comparaison	miARN totaux ($p < 0.05$)	miARN matures ($p < 0.05$)
4 459	2 579	« A »_PM vs T	183	115
		« B »_PM vs T	196	107
		« C »_PM vs T	207	116
		PM_« B » vs « A »	576	316
		PM_« C » vs « A »	660	353
		PM_« C » vs « B »	177	102
		T_« B » vs « A »	690	366
		T_« C » vs « A »	562	313
		T_« C » vs « B »	319	160

3.1.2. Choix des miARN pour la RT-qPCR

A partir des miARN matures ayant une valeur de $p < 0.05$, le niveau d'expression des 13 miARN suivants a été mesuré par RT-qPCR : miR-124-3p, miR-1246, miR-1290, miR-132-3p, miR-16-5p, miR-212-3p, miR-212-5p, miR-324-5p, miR-3613-5p, miR-373-5p, miR-378a-3p, miR-605-5p, et miR-99b-5p.

Le choix de ces 13 miARN a été fondé sur différents critères :

- miARN matures,
- miARN ayant un $p < 0.05$ (différence significative du niveau d'expression entre témoin et exposé ou entre les catégories d'âge suite à l'analyse statistique des résultats générés par la puce),
- miARN ayant une valeur de ratio supérieur ou égale à 1,2 ou inférieure et égale à 0,75 suite au traitement statistique,
- miARN ayant un niveau d'expression qui varie en fonction de l'exposition aux particules (cf. effet des PF) et d'autres miARN dont le niveau d'expression varie en fonction de la catégorie d'âge (cf. effet de l'âge),
- Etude bibliographique.

3.2. RT-PCR en temps réel pour les miARN

3.2.1. Détermination du miARN de référence

Afin de pouvoir normaliser les niveaux d'expression des miARN en PCR en temps réel, 3 ARN de référence ont été choisis en se basant sur la bibliographie : U6 snRNA, miR-191-3p et miR-25-3p.

En effet, U6 snRNA a été utilisé comme référence pour les PCR des miARN dans plusieurs études utilisant les L_T humains comme modèle cellulaire (Fulci et al., 2007; Grigoryev et al., 2011; Hu et al., 2016; Lai et al., 2013; Lu et al., 2014; Rossi et al., 2011; Xi et al., 2015). Une étude réalisée par Peltier et Latham en 2008 visant à identifier l'ARN de référence le plus adéquat pour

la normalisation des miARN, a évalué la stabilité d'un panel de 12 ARN dans 13 tissus humains normaux (foie, placenta, cerveau, estomac, poumon, vessie, cœur, prostate, colon, thymus, ovaire, tissu adipeux et utérus) en utilisant 2 algorithmes « NormFinder » et « geNorm ». Cette étude a classé U6 snRNA comme étant le 2^{ème} ARN le moins stable, alors qu'il fait partie des ARN les plus fréquemment utilisés pour la quantification relative des miARN. Les miARN jugés les plus stables sont, par ordre décroissant de stabilité : mir-191 est le miARN le plus stable, suivi par miR-93, miR-106a, miR-17-5p et miR-25. Après ajout de tissus tumoraux au groupe d'étude précédent constitués de tissus normaux, miR-191 et miR-25 ont été déterminés comme étant la paire de normalisateurs les plus stables (Peltier and Latham, 2008).

Dans notre étude, nous avons choisi de tester miR-191-3p, miR-25-3p et U6 snRNA comme ARN de référence candidats. Leur niveau d'expression a été mesuré par RT-qPCR. La stabilité des 3 ARN de référence candidats a été par la suite testée par l'intermédiaire de l'algorithme « geNorm » en utilisant les valeurs de Ct de ces ARN, (analyse de PCR) et de celles des 10 miARN conservés (miR-124-3p, miR-1246, miR-1290, miR-132-3p, miR-16-5p, miR-212-3p, miR-324-5p, miR-3613-5p, miR-378a-3p, et miR-99b-5p). D'après le calcul de l'algorithme « geNorm » (Vandesompele et al., 2002), l'ARN de référence le plus stable dans notre cas est miR-191-3p. Il n'existe pas de référence bibliographique précisant l'importance de normaliser les résultats de l'expression génique des miARN par rapport à un plusieurs gène de référence. De ce fait, nous utiliserons le miR-191-3p pour normaliser les résultats de PCR.

3.2.2. RT-qPCR en temps réel

Des analyses de qPCR en temps réel ont été réalisées pour les 13 miARN cités précédemment, ainsi que pour les 3 ARN de référence candidats pour la population d'étude (L_T témoins et L_T exposés aux particules pendant 72h, soit 60 échantillons). 3 miARN (miR-212-5p, miR-373-5p et miR-605-5p), parmi les 13 analysés, ayant des valeurs de Ct indéterminées pour la majorité des échantillons ont été exclus dans la suite de l'étude.

3.2.2.1 Effet de l'exposition des L_T aux PF

La Figure III.47 présente les niveaux d'expression des 10 miARN, après exposition aux PF pendant 72h et pour l'ensemble de la population d'étude « ABC » en utilisant miR-191-3p comme ARN de référence. Une induction de l'expression de 9 miARN a été remarquée après exposition aux PF, avec une augmentation significative uniquement pour miR-124-3p (médiane de RQ = 7,11) et à un moindre niveau pour miR-1290 (médiane de RQ = 2,03). Par ailleurs, une répression non significative de l'expression de miR-378a-3p a été observée.

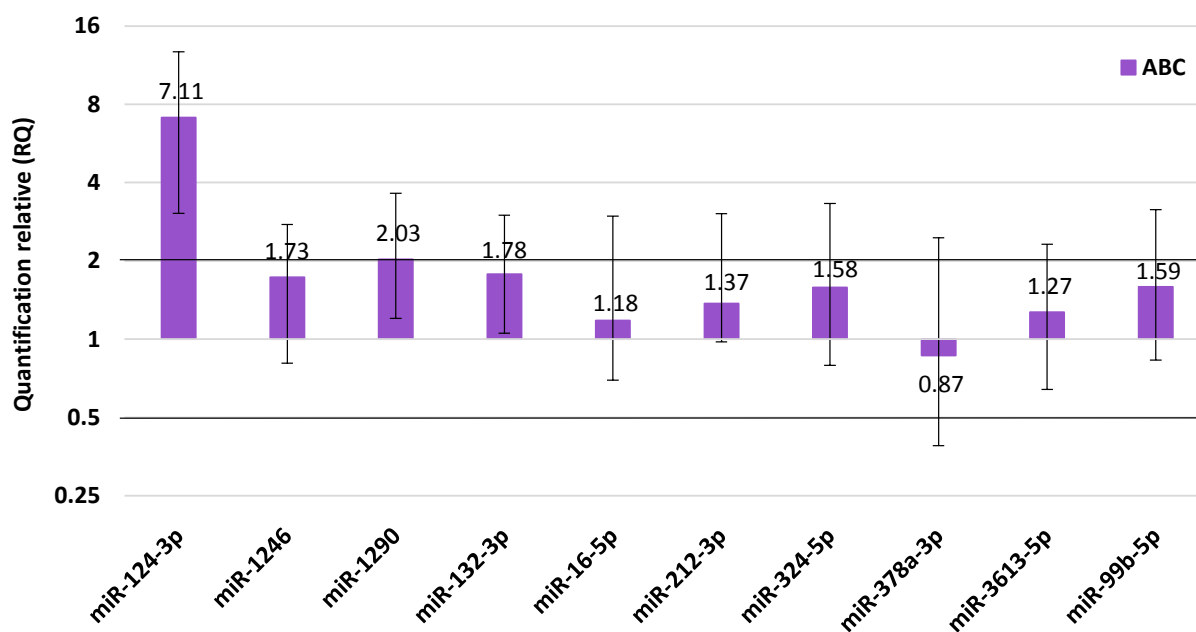


Figure III.47 : Niveau relatif d'expression des miARN (miR-124-3p, miR-1246, miR-1290, miR-132-3p, miR-16-5p, miR-212-3p, miR-324-5p, miR-3613-5p, miR-378a-3p, et miR-99b-5p) dans les L_T exposés pendant 72 h aux PF pour la population d'étude « ABC ». Les résultats sont décrits par les médianes des RQ (après normalisation par rapport à l'ARN de référence (miR-191-3p) et par rapport au témoin), et les quartiles (Q1, Q3).

3.2.2.2 Effet de l'exposition des L_T aux PF, influence de l'âge

En séparant les 3 catégories d'âge de notre population d'étude, différents profils d'évolution des miARN entre les classes d'âge suite à l'exposition aux PF ont été observés (Figure

III.48). Ces résultats ont montré que miR-124-3p est le seul miARN dont l'expression a été significativement induite dans les L_T pour chacune des 3 classes d'âge suite à l'exposition aux PF, et ayant le niveau d'expression le plus élevé en comparant avec les autres miARN testés.

D'autre part, pour les miARN miR-1246 et miR-1290, une augmentation de leurs niveaux d'expression a été remarquée pour les 3 classes d'âge avec une augmentation significative par rapport aux témoins pour les catégories « A » et « C ». Aucune différence significative entre les classes d'âge n'a été observée pour les miARN miR-124-3p, miR-1246, et miR-1290.

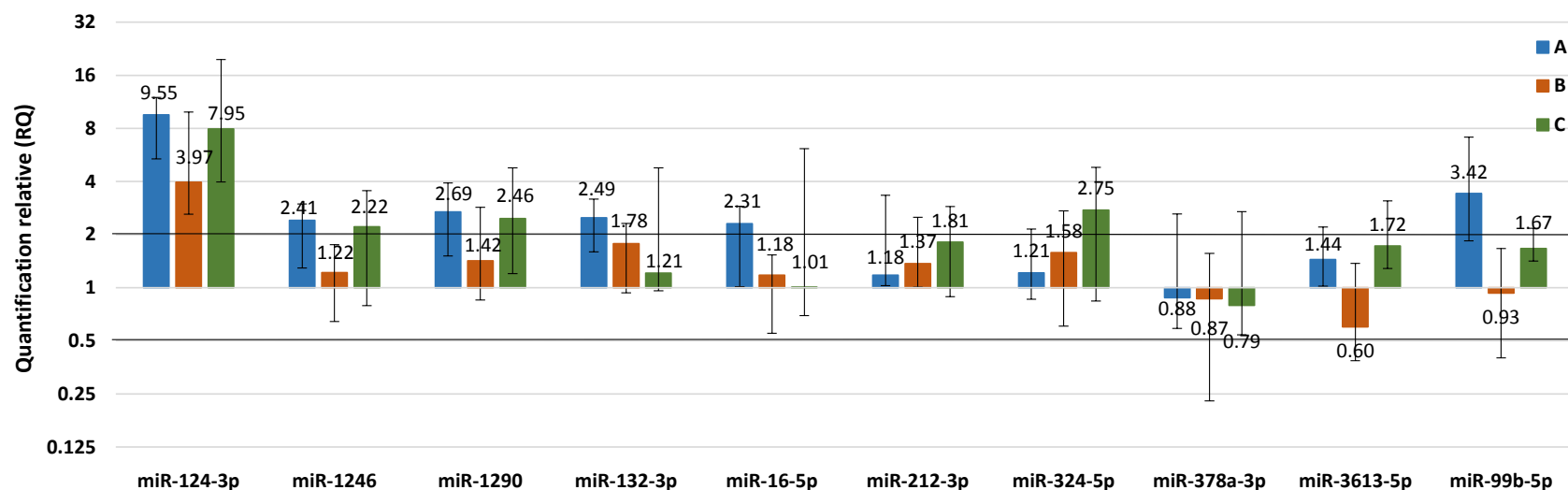


Figure III.48 : Niveau relatif d'expression des miARN (miR-124-3p, miR-1246, miR-1290, miR-132-3p, miR-16-5p, miR-212-3p, miR-324-5p, miR-3613-5p, miR-378a-3p, et miR-99b-5p) dans les L_T de chacune des trois catégories d'âge (« A », « B » et « C ») exposés pendant 72 h aux PF. Les résultats sont décrits par les médianes des RQ (après normalisation par rapport à l'ARN de référence (miR-191-3p) et par rapport au témoin), et les quartiles (Q1, Q3) pour chaque catégorie d'âge de la population d'étude.

De plus, nous pouvons remarquer que les miARN miR-132-3p et miR-16-5p ont un profil d'expression similaire pour les 3 classes d'âge avec une augmentation significative par rapport aux témoins uniquement pour la catégorie « A » (médianes des RQ = 2,49 et 2,31 respectivement pour miR-132-3p et miR-16-5p). Pour ces 2 miARN, et après exposition aux PF, une tendance de diminution de leurs niveaux d'expression avec l'âge a été signalée, sans qu'il n'y ait de différence significative entre les 3 catégories.

Au contraire, les miARN miR-212-3p et miR-324-5p ayant aussi un profil d'expression proche pour les 3 classes d'âge, ont des niveaux d'expression qui tendent à augmenter avec l'âge et après exposition aux PF mais toujours sans aucune différence significative entre les 3 classes d'âge. Une augmentation significative de miR-324-5p par rapport aux témoins a été signalée pour la catégorie « C ».

Ensuite, après exposition aux PF, le niveau d'expression de miR-378a-3p a été réprimé pour les 3 catégories d'âge sans avoir une différence significative entre ces catégories. Et finalement, un même profil d'expression a été observé pour les miARN miR-3613-5p et miR-99b-5p où le niveau d'expression a été, d'une part, réprimé chez la classe « B » sans avoir une différence significative par rapport au témoin et d'autre part a été induit chez les classes « A » et « C », avec une augmentation significative uniquement chez la classe « A » de miR-99b-5p (Figure III.48).

3.2.2.3 Discussion

miR-124 est le miARN le plus abondamment exprimé dans les cellules neuronales et est fortement exprimé dans les cellules et les organes immunitaires, telles que les cellules mononucléées du sang périphérique, la moelle osseuse, les ganglions lymphatiques et le thymus (Lagos-Quintana et al., 2002; Smerkova et al., 2015). Nos résultats ont montré une expression élevée de ce miARN dans les L_T, notamment suite à l'exposition aux PF. miR-124-3p a été récemment proposé comme biomarqueur diagnostique pour plusieurs maladies. Il joue ainsi un rôle de suppresseur de tumeur en cas de pathogenèse de l'astrocytome, une tumeur cérébrale maligne. Il inhibe la translation de PIM1 qui est une protéine régulatrice de la prolifération, du cycle cellulaire, de l'apoptose et du métabolisme dans de nombreuses cellules cancéreuses (Deng et al., 2016). Une autre étude a suggéré miR-124-3p comme

biomarqueur diagnostique de l'AVC hémorragique. La concentration plasmatique dosée dans les 24h suivant l'apparition des symptômes d'un AVC hémorragique était élevée chez les sujets atteints (Leung et al., 2014). De plus, une étude sur les monocytes des fumeurs a montré que miR-124-3p était exprimé chez tous les fumeurs, alors que l'expression était faible chez les non-fumeurs. Des niveaux élevés de miR-124-3p sont associés à un risque accru d'athérosclérose sub-clinique chez les fumeurs (de Ronde et al., 2017).

Quant à son rôle au niveau du système immunitaire, des études sur différents types cellulaires ont montré que miR-124 est un modulateur essentiel des réponses inflammatoires et immunitaires (innées et adaptatives). Ce miARN est induit par des signaux inflammatoires ou immunologiques et agit comme régulateur négatif de ces signaux pour aider à maintenir l'homéostasie (Qin et al., 2016). Le miR-124 joue un rôle dans le développement du système immunitaire en régulant la différenciation hématopoïétique (Liu et al., 2015). Il est également impliqué dans la régulation des réponses immunitaires. Il régule la fonction des L_T en induisant la surexpression d'IL-2, IFN- γ , TNF- α et STAT3, une voie intervenant dans l'immunosuppression dans un microenvironnement tumoral. Une étude a montré que miR-124 agit au niveau de l'immunité adaptative notamment au niveau des L_T . Les cellules souches cancéreuses gliales ont un rôle immunosuppresseur sur la prolifération des L_T . Le miR-124 peut inverser cette suppression et diminuer la production des Treg FOXP3⁺ (Wei et al., 2013). Le miR-124 est surexprimé durant la différenciation des L_T . Il agit sur SOCS5 (Suppressor Of Cytokine Signaling 5), une protéine inhibitrice de l'activation de STAT1 et STAT3, et stimule la différenciation des CD4⁺ naïfs en L_T auxiliaires Th1 et Th17 *in vitro* et *in vivo* (Jiang et al., 2014a). L'augmentation de l'expression notée après exposition aux PF suggère son implication probable dans la régulation de la différenciation des L_T en Th1. Au niveau de la littérature, il n'existe pas d'études du niveau d'induction de miR-124-3p après exposition aux particules atmosphériques. Dans notre cas, ce miARN est fortement exprimé dans les 3 catégories d'âge après 72h suggérant un rôle de miR-124-3p dans la réponse des L_T aux PF.

Concernant miR1246 et miR-1290, ils présentent un profil similaire suite à l'exposition aux PF avec une induction significative au niveau des catégories « A » et « C ». Plusieurs études ont montré une implication de ces deux miARN dans plusieurs types de cancer. Une surexpression de miR-1290 a été observée, entre autres, dans le carcinome épidermoïde du

larynx (Janiszewska et al., 2015) ou œsophagien (Li et al., 2015a; Mao et al., 2015), le cancer du pancréas (Li et al., 2013), , le cancer du côlon (Wu et al., 2013; Ye et al., 2017), le cancer de l'estomac (Lin et al., 2016), et le cancer du poumon non à petites cellules (Mo et al., 2015). D'autre part, miR-1246 est surexprimé dans le carcinome épidermoïde oral (Liao et al., 2015), le carcinome hépatocellulaire (Sun et al., 2014), le cancer colorectal (Wang et al., 2016), et le myélome multiple (Ren et al., 2017). De plus, il a été montré que miR-1246 et miR-1290 peuvent être importants dans l'invasion ou la métastase du cancer du poumon non à petites cellules (Kim et al., 2016). Ces 2 miARN ont été associés à un mauvais pronostic des patients (Li et al., 2013; Liao et al., 2015; Ye et al., 2017), et peuvent fonctionner comme un oncogène en favorisant la prolifération cellulaire, l'invasion tumorale et la métastase (Huang et al., 2015; Li et al., 2015a; Lin et al., 2016; Mao et al., 2015; Sun et al., 2014; Wang et al., 2016). D'autre part, quelques études ont montré une sous-expression de miR-1246 dans le cancer du col de l'utérus (Yang et al., 2015) et un rôle apoptotique de miR-1246 dans les cellules de kératinocytes en inhibant RKN2 (Li et al., 2014b) et de miR-1290 dans les cellules A549 en inhibant Bcl2 (Kim et al., 2014). Dans notre cas, ces deux miARN ont été induits après 72h d'exposition aux PF. Nous pourrions suggérer leur implication dans la voie de cancérogenèse suite à l'exposition à la pollution atmosphérique. Une étude récente a montré que miR-1246 était surexprimé dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 24 h à 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de $\text{PM}_{2.5}$ collectées en hiver et de PM_{10} collectées en été avec des valeurs de RQ de 8,59 et 7,47 respectivement (Longhin et al., 2016).

Les deux miARN, miR-132-3p et miR-16-5p ont montré des tendances similaires après exposition aux PF avec une expression significative uniquement au niveau de la catégorie « A ». Une surexpression de miR-132-3p a été signalée dans plusieurs études après exposition à différents types de substances. Une étude a montré une augmentation de l'expression de miR-132-3p dans l'épithélium pulmonaire après exposition aux émissions d'échappement diesel (300 mg $\text{PM}_{2.5}/\text{m}^3$) ou à un allergène (Rider et al., 2016). L'exposition des cellules souches embryonnaires humaines (hESC) à l'argent nanoparticulaire AgNP a causé une augmentation du niveau de miR-132-3p après 6h et 24h (Oh et al., 2016). De plus, Pelligrini et al, ont montré une surexpression de miR-132-3p suite au traitement des cellules épithéliales tubulaires proximales par des substances néphrotoxiques telles que le chlorure

de cadmium, le dichromate de potassium et l'acide aristolochique (Pellegrini et al., 2016). Concernant miR-16-5p, les études ont révélé une variation de l'expression de ce miARN en fonction de l'âge et l'on suggéré comme un biomarqueur de vieillissement. Nos résultats ont également montré une diminution de l'expression de ce miARN entre les jeunes « A » et les personnes âgées « C » même si aucune significativité n'a été notée. Le niveau d'expression de miR-16-5p dans le sang total et le foie des souris a été significativement sous-exprimé à l'âge de 24 mois et de 12 mois respectivement en comparant avec le niveau d'expression à l'âge de 8 mois (Kim et al., 2017b). Yentrapalli et al. ont noté miR-16-5p parmi les miARN subissant un changement au cours de la senescence. Ce miARN était significativement sous exprimé (Yentrapalli et al., 2015). Une association a été notée entre l'expression de miR-16-5p et les maladies les plus courantes associées au vieillissement. Une étude a montré que miR-16-5p fait partie des miARN dérégulés dans les composants sanguins (sérum/plasma, L_T $CD4^+$, neutrophiles, PBMC) des sujets atteints de la polyarthrite rhumatoïde. L'expression de miR-16-5p était élevée dans le plasma ou le sérum (Churov et al., 2015). Une diminution de ce miARN est observée dans le sérum humain en cas d'ostéoporose (Kocijan et al., 2016) et dans les cellules épithéliales du cristallin en cas de cataracte (Li et al., 2015b).

Concernant miR-212-3p, nos résultats n'ont pas montré une induction significative après exposition aux PF. Ce miARN a un rôle dans la réponse inflammatoire. Chen et al. ont observé une surexpression de miR-212-3p jusqu'à 24h après la stimulation des macrophages par le LPS, suivie par une diminution de l'expression à 48h. Cette étude a suggéré l'implication de ce miARN dans la suppression de l'inflammation induite par le LPS en ciblant HMGB1 (High mobility Group Box 1 protein), une protéine sécrétée par les macrophages et exerçant un rôle pro-inflammatoire, et en inhibant les cytokines inflammatoires $TNF-\alpha$ et IL-6 (Chen et al., 2017). Il a été montré aussi que ce miRNA est un suppresseur de tumeur dans le carcinome hépatocellulaire (Liang et al., 2013). Le miR-324-5p présentait la même tendance d'augmentation en fonction de l'âge que miR-212-3p. Toutefois une expression significative pour ce miARN a été notée après exposition aux PF uniquement chez la catégorie « C ». Des études ont montré une surexpression de miR-324-5p chez les macrophages isolés à partir des tumeurs du côlon suggérant que ce miARN est un oncomir potentiel qui peut induire l'apoptose chez les cellules épithéliales normale (Chen et al., 2014b; Todaro et al., 2008) et

favoriser la survie des cellules souches cancéreuses (Todaro et al., 2007). Une surexpression a aussi été notée au niveau de l'épithélium pulmonaire exposé aux émissions d'échappement diesel ou à un allergène (Rider et al., 2016). Au vu de nos résultats révélant une tendance à l'augmentation avec l'âge, il s'avère intéressant de déterminer le niveau d'expression de ces deux miARN à des temps d'exposition plus courts.

Le miR-378-3p a été réprimé après exposition aux PF. Plusieurs études sur des modèles animaux ont montré des niveaux réduits de miR-378a-3p dans les maladies cardiaques. Une diminution de ce miARN est observée pendant le remodelage cardiaque (Knezevic et al., 2012) et dans l'insuffisance cardiaque en raison de l'hypertrophie (Ganesan et al., 2013; Nagalingam et al., 2013). Il est aussi sous exprimé dans les cellules colorectales cancéreuses lui conférant un rôle de suppresseur de tumeur (Faltejskova et al., 2012; Wang et al., 2010).

Concernant les derniers miARN, miR-3613-5p et miR-99b-5p, une induction significative après exposition aux PF a été observée pour miR-99b-5p chez les sujets de la catégorie « A ». Une étude a montré qu'une génération d'ERO suite à un traitement des cellules neuronales par des peptides bêta-amyloïde, augmente l'expression de miR-99b-5p. Il a été démontré que miR-99b-5p est un inducteur d'apoptose (Prasad, 2017). Une surexpression de ce miARN a également été observée dans le plasma des sujets atteints de carcinome épidermoïde laryngé (Ayaz et al., 2013). Quant au miR-3613-5p, peu d'études se sont intéressées à ce miARN. Une augmentation du niveau de son expression a été observée 5h et 24h suite à une infection bactérienne des macrophages. L'analyse a révélé l'implication de miR-3613-5p dans la voie de l'apoptose et de signalisation TP53 (zur Bruegge et al., 2016). Il a également été montré que ce miARN était surexprimé dans certains cancers, une augmentation de son expression ayant lieu durant la phase précoce du cancer gastrique (Bibi et al., 2016).

3.3. Analyse fonctionnelle

3.3.1. Détermination des interactions miARN-gènes cibles par le logiciel IPA®

Parmi les miARN représentés dans la Figure III.48, seuls les 7 miARN (miR-124-3p, miR-1246, miR-1290, miR-132-3p, miR-16-5p, miR-324-5p, et miR-99b-5p) présentant un niveau d'expression significativement différent dans les L_T exposés aux PF par rapport aux L_T témoin

pour au moins une catégorie d'âge ont été conservés pour la suite de l'analyse. Les médianes des RQ de ces 7 miARN pour chacune des 3 classes d'âge ont été utilisées pour réaliser l'analyse fonctionnelle en utilisant l'outil « miARN Target Filter » du logiciel IPA® (Ingenuity Pathway Analysis) afin de pouvoir identifier les cibles potentielles des miARN choisis. Seules les interactions miARN-gène cible validées expérimentalement ont été sélectionnées, ce qui nous a conduit à éliminer 2 miARN (miR-1246 et miR-1290) et d'en garder 5 (miR-124-3p, miR-132-3p, miR-16-5p, miR-324-5p, et miR-99b-5p).

Bien qu'aucune interaction miARN-gène cible n'ait été validée expérimentalement pour miR-1246 et miR-1290 selon le logiciel IPA®, des études publiées ont noté leur implication dans plusieurs types de cancer. Dans notre étude, nous avons pu montrer que les PF ont significativement induit l'expression de miR-1246 et miR-1290 dans les L_T des sujets des catégories « A » et « C » (Figure III.48). En raison de leur rôle suspecté dans la cancérogenèse, ces miARN devraient être davantage étudiés afin de déterminer leurs cibles potentielles et par conséquent de mieux comprendre leurs mécanismes d'action dans le cas de la pollution atmosphérique.

3.3.2. Choix des gènes cibles comme perspective pour l'étude des miARN

Il est connu que les miARN ciblent généralement plusieurs gènes et que ces gènes cibles peuvent être régulés par des mécanismes de rétroaction négatifs ou positifs. Le logiciel IPA® nous a permis d'identifier les voies biologiques concernées par les interactions miARN-cibles obtenues ainsi que les fonctions moléculaires et cellulaires associées. Dans notre cas, la voie des « mécanismes moléculaires du cancer » a été identifiée parmi celles les plus significativement enrichies et ayant les fonctions moléculaires et cellulaires suivantes : cycle cellulaire, développement cellulaire, croissance et prolifération cellulaire, mort cellulaire, survie et mouvement cellulaire.

D'autre part, parmi les 5 miARN conservés par IPA® (miR-124-3p, miR-132-3p, miR-16-5p, miR-324-5p, et miR-99b-5p), miR-124-3p est le seul miARN dont l'expression a été significativement induite dans les L_T pour chacune des 3 classes d'âge suite à l'exposition aux PF. Il est également le seul à avoir un niveau d'expression élevé (médianes des RQ = 9,55 ;

3,97 ; et 7,95 respectivement pour les catégories A, B et C) (Figure III.48). L'analyse « miARN Target Filter » a identifié 224 gènes cibles de ce miARN.

Il est ensuite essentiel d'évaluer dans un premier temps l'expression des gènes cibles de miR-124-3p impliqués dans les mécanismes du cancer, et ensuite les gènes cibles pour les autres miARN dont le niveau d'expression a été significativement modifié dans les L_T suite à l'exposition aux PF.

Pour des raisons de temps, il n'a pas été possible de mesurer l'expression des gènes cibles de miR-124-3p. Toutefois, en se basant sur les voies cellulaires impliquées d'une part et la littérature d'autre part, nous avons pu choisir 5 gènes parmi les 224 cibles de ce miARN. Dans un futur proche, l'expression de ces gènes sera quantifiée par PCR en temps réel dans les L_T exposés aux PF.

Les 5 gènes cibles sélectionnées de miR-124-3p sont les suivants : DNA Fragmentation Factor Subunit Beta (DFFB), un facteur de fragmentation de l'ADN qui est impliqué dans l'apoptose suite à l'action de la caspase 3 (Enari et al., 1998) ; Cyclin-dependent Kinase 2 (CDK2), une kinase ayant un rôle dans la réparation de l'ADN (Satyanarayana and Kaldis, 2009) ; Calcineurin like EF-hand protein 1 (CHP1), une protéine impliquée dans la voie de l'apoptose par l'activation d'une protéine pro-apoptotique (Bad) (Wang et al., 1999) ; Ras association domain-containing protein 5 (RASSF5), un suppresseur de tumeur (Park et al., 2010) ; et Caténine delta-1 (CTNND1), facteur de transcription codant pour la protéine p120ctn et pouvant agir comme suppresseur de tumeur (Peglion, 2012).

A ces gènes cibles pourront être ajoutés d'autres gènes impliqués dans la régulation de l'apoptose et du cycle cellulaire afin de compléter les informations qui seront obtenues par l'analyse des gènes cibles.

L'étude de l'impact des PF sur les L_T a été réalisée en s'intéressant à trois volets.

Les résultats de l'expression génique ont montré la capacité des constituants chimiques des PF à déclencher une réponse métabolique chez les L_T. Cette réponse est traduite par l'induction des gènes qui codent pour les EMX notamment CYP1A1 et CYP2S1. Quant au stress oxydant, aucune altération au niveau des gènes anti-oxydants n'a été observée après 72h

dans l'ensemble de la population d'étude. L'étude de l'expression génique en fonction de l'âge a toutefois révélé une différence significative au niveau de l'expression génique de NQO1 ainsi qu'une tendance à l'augmentation de HMOX1 après exposition aux PF et au CuO respectivement. Considérés comme gènes anti-oxydants, l'augmentation de leur expression avec l'âge pourra être liée au niveau basal d'ERO plus important chez les personnes âgées.

D'autre part, le suivi de la production des cytokines caractéristiques des différents profils de L_T a mis en évidence un changement du profil lymphocytaire suite à l'exposition aux PF. Un profil mixte Th1/Th2 a été observé chez L_T exposés. Des variations des niveaux de production des cytokines en fonction de l'âge ont été détectées telles que la tendance à la diminution d'IFN- γ et d'IL-4 et à l'augmentation d'IL-13.

Finalement, l'étude transcriptomique a mis en évidence des variations d'expression au niveau de plusieurs miARN. Parmi les plus induits, nous retrouvons miR-124-3p impliqués dans la régulation de plusieurs fonctions au niveau du système immunitaire dont la différenciation des L_T et miR-1290 impliqué dans plusieurs types de cancer. Quant à l'effet de l'âge sur l'expression des miARN, des tendances à l'augmentation ou à la diminution ont été notées.

Discussion générale

L'augmentation massive des émissions de polluants a fait de la qualité de l'air une des préoccupations mondiale de santé publique. La pollution atmosphérique est considérée comme étant la 13^{ème} cause de décès au niveau mondial avec 3,7 millions de décès liés à la pollution de l'air extérieur (OMS, 2012). Les réglementations mises en œuvre évoluent et s'adaptent de jours en jours en fonction des polluants. Parmi les constituants majeurs de la pollution de l'air, nous retrouvons les particules atmosphériques, un mélange hétérogène présentant des caractéristiques physiques et chimiques variées. A ce jour, les connaissances scientifiques ont montré des effets indésirables à court et/ou long termes de la pollution atmosphérique particulaire sur la santé de l'homme reflétés par une augmentation de morbidité et de mortalité par causes cardio-respiratoires (Crouse et al., 2012; Katanoda et al., 2011; Ostro et al., 2010; Pope and Dockery, 2006). D'autres systèmes peuvent être affectés par l'exposition. Nous retrouvons au premier rang le système immunitaire, un système de défense remarquablement adaptatif impliqué dans la réponse face à plusieurs pathogènes et xénobiotiques dont les particules atmosphériques.

Suite à l'exposition à la pollution atmosphérique, l'effet est plus prégnant pour les populations sensibles telles que les enfants et les personnes âgées. Le vieillissement des populations, conséquence positive du développement, est accompagné de changements entraînant des pertes de fonction au niveau de l'organisme, rendant ainsi les personnes âgées plus vulnérables (López-Otín et al., 2013). Parmi ces changements, l'immunosénescence est considéré comme la cause majeure d'augmentation de la sensibilité des personnes âgées à l'exposition à des agents pathogènes ou xénobiotiques.

L'impact sanitaire de la pollution atmosphérique particulaire, notamment sur les personnes âgées constitue un sujet préoccupant de santé publique et une problématique de recherche actuelle. Dans ce contexte, et pour la première fois au laboratoire, nous nous sommes donc interrogés sur l'effet de l'exposition aux particules fines sur la réponse des lymphocytes et sur l'influence potentielle de l'âge dans cette réponse. De ce fait, deux objectifs ont été établis. Tout d'abord, nous avons étudié l'effet de l'exposition dans un but

de déterminer si possible, des biomarqueurs d'exposition et/ou d'effet. Le deuxième objectif était d'étudier l'effet de l'âge sur cette réponse des lymphocytes à l'exposition aux particules fines. Ce travail de thèse s'inscrit dans le projet « PACATox », proposant d'exposer à des particules fines des lymphocytes de volontaires appartenant à différentes catégories d'âge. L'étude de plusieurs volets tels que l'activité métabolique des lymphocytes, le profil immunologique, les modifications épigénétiques, les effets génotoxiques ainsi que le profil métabolomique a été menée afin de déterminer un ou plusieurs biomarqueurs pertinents. Ce travail est donc le premier à déterminer, à l'aide des tests *ex vivo*, les effets toxiques des particules atmosphériques fines sur une lignée lymphocytaire, les L_T, en incluant un nombre de sujets important et en faisant varier le facteur de l'âge. Dans le cadre de notre projet, des prélèvements de particules fines, PF, ont été réalisés sur une durée d'un an. L'échantillon collecté forme un échantillon multi-influencé (intégrant à la fois les contributions de sources d'origine urbaine, maritime et industrielle) et réel représentatif de la pollution atmosphérique particulaire actuelle à laquelle nous sommes exposés. En parallèle, et suite à l'accord du CPP Nord-Ouest (ECH 15/39 du 10/09/2015), le recrutement de volontaires par le Centre Nutrition Clinique Naturalpha a débuté avec respect des critères d'inclusion et d'exclusion définis préalablement. Des prélèvements sanguins de 97 sujets provenant de trois classes d'âge contrastées (« A » [20-30], « B » [45-55] et « C » [70-85] ans) ont été réalisés sur une durée de 10 mois. Pour chacun des prélèvements, une Numération Formule Sanguine (NFS), un dosage de la Protéine Réactive C (CRP) et un marquage anti-CD45RA et anti-CD45RO ont été effectués. Notre travail a été réalisé sur une sélection d'une population d'étude (n=30 sujets) à partir de la population échantillonnée (n=97 sujets). Cette population était homogène et représentative de la population totale avec des résultats de NFS et de dosage de CRP qui valident l'absence d'anomalies ou de risques d'inflammation aiguë. L'influence de l'âge a été détectée dans ces paramètres testés. Le pourcentage de lymphocytes diminue significativement dans la classe d'âge 70-85 ans par rapport aux deux autres classes ce qui est en accord avec les données de la littérature (Born et al., 1995; Rink et al., 1998b). De plus, une diminution de la sous-population de L_T naïfs CD3⁺CD45RA⁺ a été notée accompagnée d'une augmentation de la sous-population de L_T à mémoire CD3⁺CD45RO⁺. Au niveau cellulaire, les caractéristiques les plus importantes de l'immunosénescence comprennent une diminution du nombre de lymphocytes naïfs, principalement en raison du déclin de la production de

lymphocytes naïfs dans la moelle osseuse et le thymus, et l'expansion des lymphocytes à mémoire défectifs. Par conséquent, la diversité du répertoire de reconnaissance des antigènes est nettement diminuée avec l'âge (Linton and Dorshkind, 2004; Weng, 2006).

Le modèle cellulaire testé étant employé pour la première fois dans notre équipe, notre étude s'est déroulée en deux phases. Dans un premier temps, plusieurs étapes ont été optimisées aboutissant au développement d'un protocole validé d'isolement, d'activation et d'exposition des L_T . Différents milieux ont été testés et comparés pour isoler les PBMC à partir du sang total. Parmi les trois solutions testées (*Lymphoprep*[™], *Nycoprep*[™] et *Lymphoprep*[™] tube), le *Lymphoprep*[™] tube semble être la technique la plus adaptée en terme d'efficacité et de rapidité. Quant à la purification des L_T , une étape de sélection négative a permis de les séparer des autres populations avec une efficacité de 90%. L'étape suivante consistait à vérifier la nécessité d'activer notre modèle cellulaire. Les mitogènes phytohémmagglutinine (PHA) et concanavaline A (ConA) ainsi que le Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) sont traditionnellement utilisés pour activer et induire la prolifération des L_T *in vitro* (Trickett and Kwan, 2003). La PHA et la ConA activent les L_T en se liant aux glycoprotéines membranaires telles que le complexe TCR-CD3 activant ainsi le signal 1 nécessaire pour l'activation. Quant à la PMA, elle diffuse à travers la membrane du lymphocyte et déclenche l'activation de la Protéine Kinase C (PKC) assurant ainsi la stimulation (Kay, 1991). Toutefois, d'un point de vue biologique, ces mitogènes ne sont pas comparables aux conditions de stimulation *in vivo*. Un mode d'activation plus pertinent physiologiquement consiste à stimuler les L_T avec une combinaison d'anticorps spécifiques au CD3, qui imitent la signalisation TCR médiée par l'antigène, et des anticorps anti-CD28, qui fournissent le signal de co-stimulation nécessaire pour une activation efficace (Frauwirth and Thompson, 2002). Une approche techniquement élégante consiste à coupler ces anticorps avec des billes magnétiques pour créer une CPA (Trickett and Kwan, 2003). Nous avons montré que l'utilisation des billes magnétiques couplées aux anticorps anti-CD3/CD28 permet une activation efficace des L_T . Ce profil n'est pas observé en absence de billes, ni en présence de PF. Nous avons ainsi montré une expression des marqueurs liés à la stimulation (CD69) et à l'activation (CD25) accompagnée du déclenchement de la division et du cycle cellulaire. Une durée de 96h représente un temps idéal pour activer les L_T .

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à l'impact de l'échantillon de PF sur les L_T, en orientant notre étude vers (i) l'activation des systèmes de métabolisation des composés organiques présents dans les PF et de stress oxydatif en réponse aux PF, (ii) les profils de différenciation des L_T suite à l'exposition (iii) les effets épigénétiques suite à l'exposition des cellules aux PF. Nous avons ainsi validé le choix de 45 µg/mL de PF comme concentration d'exposition non cytotoxique pendant 72h.

De nombreux composés chimiques toxiques et cancérogènes nécessitent une activation métabolique pour exercer leurs effets toxiques. Les composants des particules atmosphériques tels que les composés organiques et les oxydes de métaux sont capables de déclencher les mécanismes de métabolisation ainsi que de produire des Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) (Dwivedi et al., 2012; Gualtieri et al., 2012). Cette activation est assurée par les Enzymes de Métabolisation des Xénobiotiques (EMX) dont les monooxygénases à cytochromes P450 constituent 75% de la totalité (Guengerich, 2008). Quant au stress oxydant, des études ont mis en évidence la capacité des particules à l'induire directement via les oxydes de métaux de transition ou indirectement via l'inflammation, mais aussi par la formation de quinones réactives issues du métabolisme des composés organiques (Ghio et al., 2012; Gualtieri et al., 2012). Il était donc important d'étudier l'expression des EMX et des gènes antioxydants suite à l'exposition de notre modèle cellulaire, les L_T, aux PF. Dans ce volet de travail, le B[a]P a été utilisé comme molécule de référence des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) et l'oxyde de cuivre (CuO) comme témoin positif de stress oxydant. Le choix du gène de référence pour normaliser nos résultats a été optimisé. Le couple IPO8-RPL13A semble être le plus adapté pour notre modèle. Cette étude a mis en évidence la capacité des particules fines et de leurs constituants tels que les HAP, les dioxines et les PCB retrouvés dans notre échantillon, à causer des changements au niveau de l'expression génique chez les L_T notamment au niveau des gènes impliqués dans la métabolisation des toxiques. Une surexpression des gènes *CYP1A1*, *CYP2S1* et *NQO1* a été notée après exposition au B[a]P et aux PF. L'induction génique des deux cytochromes P450 confirme l'activation de la voie AhR via les ligands (HAP, dioxines et PCB) en début d'exposition entraînant la surexpression de ces deux gènes par le complexe AhR/ARNT. Ces profils d'induction observés après exposition aux B[a]P et aux PF mettent en évidence les compétences métaboliques des L_T. Ce résultat est

renforcé par une étude récente qui a montré que les L_T exposés à 2µM de B[a]P pendant 48h sont capables d'exprimer le gène *CYP1A1* et de produire la protéine caractérisée d'une activité enzymatique (Liamin et al., 2017). De plus, la composition chimique de notre échantillon notamment en métaux de transition (Fe, Zn, Cu) et en composés organiques (tels que les HAP majoritairement présents : dibenz[a,h]anthracène, l'indéno[1,2,3-c,d]pyrène, le chrysène et le benzo[b]fluoranthène) montre que les particules sont susceptibles d'entraîner une production d'ERO et par la suite de déclencher un stress oxydant. Ces ERO peuvent induire l'expression de plusieurs gènes tels que les antioxydants *HMOX1* et *NQO1* via la voie de signalisation Keap1/Nrf2/ARE. Ceci a été mis en évidence dans nos résultats par la surexpression de la *NQO1* à un niveau plus faible que le *CYP1A1* soulignant la régulation de la *NQO1* par le *CYP1A1* via la batterie impliquant le stress oxydant. Dans nos conditions d'exposition de 72h, nous n'avons pas observé de surexpression des gènes *SOD2*, *CAT* et *HMOX1* codant pour les enzymes antioxydantes. Toutefois nous avons montré que les L_T sont capables de réagir face au stress oxydant déclenché par CuO. Ces résultats suggèrent qu'un stress oxydant a été déclenché au début de l'exposition aux PF, mais qu'il n'a plus été possible de détecter des variations de l'expression génique après 72h.

L'unique induction significative en fonction de l'exposition et en fonction de l'âge de la *NQO1* ainsi que la réponse de *HMOX1* la plus élevée ont été détectées chez les personnes âgées. L'expression élevée de ces deux gènes impliqués dans la réponse antioxydante suggère la présence d'un niveau d'ERO plus important avec l'âge. De nombreuses études ont lié la production d'ERO et le stress oxydatif d'une part au vieillissement et à la longévité d'autre part (Lenaz et al., 2006) (Cutler, 1985). La théorie du vieillissement par les radicaux libres ainsi que les études montrant un niveau basal d'ERO élevé chez les personnes âgées viennent supporter nos observations (Espino et al., 2010; Harman, 1956a; Kim et al., 2009). Avec l'âge, le taux de production d'ERO par la mitochondrie augmente par rapport aux populations jeunes (Cavazzoni et al., 1999).

Suite à leurs activations, les L_T se différencient en un profil déterminé leur attribuant ainsi une fonction immunitaire spécifique. Nous nous sommes intéressés par la suite à étudier l'impact des PF sur le profil de différenciation des L_T via la quantification d'un panel de cytokines impliquées dans 4 profils de L_T (Th1, Th2, Th17 et Treg). Les profils de production de cytokines des L_T humains après stimulation mitogène diffèrent de ceux qui résultent de la

stimulation par des antigènes et par la CPA. Au vu de nos conditions expérimentales et de nos résultats, nous avons proposé une différenciation des L_T en profil Th1 lié à la forte stimulation par les billes anti-CD3/CD28 (Ratio 1 :1). Toutefois, avec le déclenchement de la division cellulaire, un changement de profil peut avoir lieu au-delà de 96h, orientant la différenciation de quelques L_T vers un profil Th2. L'exposition aux PF après les 96h d'activation ralentit ce changement de profil. L'étude de la production des cytokines, de la prolifération cellulaire, du cycle cellulaire et des marqueurs d'activation a mis en évidence le potentiel effet des PF à causer un changement au niveau du profil des L_T . Les particules forment un mélange hétérogène regroupant des composants solubles et insolubles, y compris des composés organiques, des métaux, des endotoxines, des pollens, des bactéries et des champignons. Ainsi, les mécanismes sous-jacents par lesquels les particules exercent des effets biologiques sont complexes. De ce fait, il n'existe pas un profil unique causé par l'exposition aux particules. Des études ont montré la différenciation des lymphocytes exposés en Th1, Th2, et même en Th17. Il a été démontré que les HAP, contenus dans les particules ou la fumée de cigarette, activent l'Ahr qui par la suite régule la différenciation des cellules Th17 et la sécrétion d'IL-17 (Kimura et al., 2008; Torii et al., 2011; van Voorhis et al., 2013). D'autres études ont mis en évidence la différenciation après exposition aux particules en Th2 faisant ainsi le lien entre l'exposition et le développement de l'asthme (Zhao et al., 2012a), en Th1 (Park et al., 2011) ou en profil mixte Th1/Th2 (Huang et al., 2017). Cependant, dans notre étude, nous ne pouvons pas déterminer un profil spécifique après exposition aux PF, nous suggérons qu'un profil mixte Th1/Th2 a pu être établi.

Des changements liés à l'âge existent au niveau de la production des cytokines (McNerlan et al., 2009; Rink et al., 1998b). Nos résultats ont montré une tendance à la diminution pour l'IFN- γ et à l'augmentation pour IL-4 et IL-13 avec l'âge. Ces cytokines modulent la réponse immunitaire. Ces altérations au niveau de la production des cytokines peuvent causer des changements au niveau du profil des L_T et de leur fonction. Ceci peut expliquer l'augmentation de l'incidence des maladies inflammatoires avec le vieillissement.

Nous avons enfin étudié le profil d'expression des miARN en réponse aux PF grâce à une étude transcriptomique. Les miARN régulent l'expression des gènes et participent ainsi aux processus du fonctionnement normal de la cellule. Tout changement extérieur est susceptible de modifier l'expression des miARN. Les niveaux d'expression des miARN étudiés

ont été modifiés dans les L_T exposées aux PF, une induction des miR-124-3p et miR-1290 a été notée. Ceci permet de proposer une relation entre l'exposition aux PF et l'élévation de l'expression de ces miARN au niveau des lymphocytes humains. D'après nos connaissances, il n'existe pas d'études sur la variation de l'expression du miR-124-3p après exposition aux polluants et plus spécifiquement aux PF. Notre étude est la première à mettre en évidence une surexpression importante de ce miARN chez des L_T exposés pendant 72h aux PF. Ce miARN module les réponses inflammatoires et immunitaires y compris la différenciation des L_T naïfs en Th1 ou Th17 (Jiang et al., 2014b). La surexpression de ce miARN, nous permet de suggérer son implication dans le profil Th1 observé après exposition. miR-1290 est impliqué dans la régulation de plusieurs types de cancer. La surexpression de ce miARN observée dans nos conditions permet de suggérer son implication dans le processus de cancérogenèse liée à l'exposition aux PF. D'autres miARN testés ont montré une induction après exposition aux PF. Celles-ci étaient toutefois non statistiquement significatives ou significatives uniquement pour une des trois catégories d'âge. Ce manque de significativité pourrait être lié au temps d'exposition de 72h.

Concernant l'influence de l'âge, des tendances à l'augmentation ou à la diminution de l'expression des miARN ont été observées. C'est le cas de miR-16-5p dont l'expression diminue en fonction de l'âge ce qui est en accord avec la littérature (Yentrapalli et al., 2015).

Pour conclure, notre étude a mis en évidence des effets liés à l'exposition au niveau de l'expression génique des enzymes de métabolisation des xénobiotiques et de certains miARN, ainsi que sur le profil de différenciation des L_T exposés aux PF. Les résultats obtenus permettent d'élucider en partie les mécanismes cellulaires et moléculaires consécutifs à l'exposition des L_T aux PF et pourraient ouvrir la voie au développement de biomarqueurs d'effets ou d'exposition. Cette étude prospective pilote est d'après nos connaissances, la première à étudier l'effet de l'exposition des L_T aux PF en s'intéressant à l'influence de l'âge.

CHAPITRE 4 :

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Notre étude avait pour objectifs de déterminer l'effet de l'exposition des lymphocytes T (L_T) à un échantillon réel de particules fines (PF) collecté dans un site urbain multi-influencé à Dunkerque et de proposer si possible des biomarqueurs d'effet et/ou d'exposition. Dans le cadre de ce travail, l'influence de l'âge sur la réponse des lymphocytes a également été recherchée. Après avoir constitué une collection biologique de 91 échantillons caractérisés (NFS, CRP, profil lymphocytaire), nous avons mené dans un premier temps une étape d'optimisation de notre modèle cellulaire et de certaines méthodes (isolement, purification et activation des L_T) pour pouvoir ensuite étudier l'influence de l'exposition aux PF sur : (i) la métabolisation des composés organiques et le stress oxydant chez les L_T , (ii) la différenciation des L_T et (iii) un des mécanismes de modification épigénétique, l'expression des miARN.

A l'issue de ce travail, nous avons pu constater que les PF collectées induisent des atteintes au niveau des L_T . Les mécanismes que nous avons étudiés ont mis en relief l'activation métabolique des composés organiques adsorbés à la surface des particules, des réactions capables d'aboutir à la formation de métabolites cancérigènes et de déclencher un stress oxydant. De plus, nous avons remarqué une influence des PF sur le profil de différenciation des L_T , ce qui peut altérer par la suite la fonction de ces cellules immunitaires. Et finalement, nous avons noté l'induction de miARN notamment les miR-124-3p et miR-1290 connus pour leurs implications dans les mécanismes de cancérogenèse.

Bien que d'autres études aient déjà mis en évidence une activation métabolique des composés organiques et des altérations épigénétiques après exposition aux PF, notre étude, d'après nos connaissances, est la première à mettre en évidence une modulation de la toxicité des PF chez les L_T en fonction de l'âge. La variation de la réponse aux PF en fonction de l'âge a été observée au niveau de certains paramètres tels que l'expression des gènes impliqués dans le stress oxydant avec un effet plus prononcé chez les personnes âgées, le changement au niveau de la production des cytokines et des tendances de variation d'expression de certains miARN avec le vieillissement.

Le vieillissement est accompagné de nombreux changements au niveau des fonctions des systèmes notamment le système immunitaire rendant les personnes âgées plus vulnérables. La susceptibilité aux effets de la pollution atmosphérique varie d'une personne à l'autre et pour un même individu en fonction de son état de santé. L'absence d'identification

de l'influence de l'âge sur la réponse à l'exposition pourrait être liée aux différences interindividuelles au sein de la même catégorie d'âge ainsi qu'à l'effectif de l'étude. Un nombre plus grand de personnes âgées aurait probablement permis de mettre en évidence des significativités là où nous n'avons observé que des tendances. De plus, il est important de rappeler que les sujets inclus dans notre étude sont des sujets sains, ne présentant aucune pathologie chronique. De ce fait, nos résultats sont représentatifs des effets sur les personnes âgées saines et ne prennent pas en compte les états pathologiques pouvant aggraver la réponse consécutive à l'exposition à la pollution particulaire.

L'augmentation de l'exposition à la pollution atmosphérique particulaire fine de la population humaine, y compris les populations vulnérables, motive la recherche de biomarqueurs liés à cette exposition dans le but d'améliorer la détection précoce des perturbations induites dans l'organisme. En effet, certaines pathologies, notamment tumorales et inflammatoires, causées par la pollution atmosphérique présentent un pronostic alarmant aux niveaux actuels de détection de l'état pathologique du patient, car les biomarqueurs validés ne sont pas assez précoces. Il convient d'encourager la mise au point de méthodes d'estimation de l'exposition améliorées pour la recherche épidémiologique et l'utilisation de biomarqueurs dans la mesure de l'exposition et la détection précoce des effets. Dans le cadre de ces travaux, des modifications de certains paramètres biologiques et cellulaires ont été observées dans des cultures de L_T exposés à un échantillon représentatif de PF. Nous pouvons par exemple citer l'activation des enzymes impliquées dans la première phase de la métabolisation des xénobiotiques organiques ainsi que celle de l'expression de miR-124-3p. Bien que ces marqueurs soient impliqués dans des mécanismes précoces de cancérogenèse, ils ne sont pas suffisamment spécifiques de l'exposition à la pollution atmosphérique, et se retrouvent par exemple induits par le tabagisme. Il conviendra donc de définir non pas un biomarqueur unique, mais plutôt un panel qu'il reste à compléter afin de caractériser de la manière la plus précise possible l'exposition des populations sensibles.

Ce travail devrait être poursuivi selon deux axes visant à : (i) améliorer la représentativité de notre population, (ii) explorer plus en détails certains mécanismes d'action des PF.

Ce travail de thèse est une approche toxicologique *ex vivo*. Dans ce type d'étude, les questions de représentativité et d'extrapolation des résultats obtenus sont toujours évoquées. Toutefois, nous rappelons que ce travail s'inscrit dans une étude prospective pilote où un nombre important de sujets ont été inclus renforçant ainsi la force statistique. De ce fait, nous proposons d'étendre l'étude des paramètres sur toute la population échantillonnée (n=91 au lieu de 30). Une augmentation du nombre de sujets traités par catégorie pourra renforcer la puissance de l'étude et par la suite révéler des différences significatives, si elles existent.

Nous avons mis en évidence des modifications susceptibles d'être à l'origine d'effets, et qui mériteraient d'être étudiées davantage. Afin de compléter nos recherches et de valider nos résultats, il s'avère intéressant de suivre l'activité enzymatique surtout pour les enzymes antioxydantes et les enzymes de métabolisation des xénobiotiques notamment le CYP1A1 ayant montré l'induction génique la plus importante suite à l'exposition. Quant aux profils de différenciation des L_T , un suivi des cytokines intracellulaires par cytométrie en flux pourrait permettre une meilleure distinction du changement de profil en fonction du temps, de l'exposition et de l'âge. De plus, l'évaluation de l'expression des gènes cibles du miR-124-3p dans les cellules exposées aux PF s'avère nécessaire afin de mieux comprendre les voies déclenchées par les PF. Aux gènes cibles proposés dans l'étude pourront être ajoutés d'autres gènes impliqués dans la régulation de l'apoptose et du cycle cellulaire afin de compléter les informations qui seront obtenues par l'analyse des gènes cibles et par conséquent compléter la voie de signalisation de miR-124-3p. Les gènes suivants sont potentiellement intéressants : le gène du rétinoblastome (Rb1) codant pour la protéine pRb1 ainsi que les Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A, 2A et 2D (CDKN1A, CDKN2A et CDKN2D) codant respectivement pour les protéines p21, p16 et p19. Ces 4 protéines sont des suppresseurs de tumeurs ayant un rôle dans l'arrêt du cycle cellulaire. A ceux-ci, pourront ensuite être ajoutés le gène anti-apoptotique B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), le gène pro-apoptotique Bcl-2-associated X (Bax), ainsi que l'oncogène BMI1 (B cell-specific Moloney 1) régulateur du CDKN2A et CDKN2D. D'autre part, la réponse des miARN n'ayant pas montré une induction statistiquement significative ou ayant montré une induction dans une des catégories d'âge ne doit pas être

négligée. Elle pourra servir comme piste pour d'autres études afin de comprendre l'expression de ces miARN chez les L_T exposés aux PF.

Nous rappelons également que dans le cadre d'un projet plus global, deux volets s'ajoutent à ce qui a été réalisé durant ce travail de thèse. Une étude métabolomique nous permet de mettre en évidence des signes de perturbation du métabolisme cellulaire après exposition aux PF. Sont aussi recherchées certaines altérations génotoxiques, telles que la formation d'adduits exocycliques d'oxydation de l'ADN et la réparation de dommages à l'ADN.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aboutabl, M.E., Zordoky, B.N.M., and El-Kadi, A.O.S. (2009). 3-methylcholanthrene and benzo(a)pyrene modulate cardiac cytochrome P450 gene expression and arachidonic acid metabolism in male Sprague Dawley rats. *Br. J. Pharmacol.* **158**, 1808–1819.
- Adar, S.D., Filigrana, P.A., Clements, N., and Peel, J.L. (2014). Ambient Coarse Particulate Matter and Human Health: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Curr. Environ. Health Rep.* **1**, 258–274.
- Aga, E., Samoli, E., Touloumi, G., Anderson, H.R., Cadum, E., Forsberg, B., Goodman, P., Goren, A., Kotesovec, F., Kriz, B., et al. (2003). Short-term effects of ambient particles on mortality in the elderly: results from 28 cities in the APHEA2 project. *Eur. Respir. J. Suppl.* **40**, 28s–33s.
- Ahamed, M., Siddiqui, M.A., Akhtar, M.J., Ahmad, I., Pant, A.B., and Alhadlaq, H.A. (2010). Genotoxic potential of copper oxide nanoparticles in human lung epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **396**, 578–583.
- Albino, A.P., Huang, X., Jorgensen, E., Yang, J., Gietl, D., Traganos, F., and Darzynkiewicz, Z. (2004). Induction of H2AX phosphorylation in pulmonary cells by tobacco smoke: a new assay for carcinogens. *Cell Cycle Georget. Tex* **3**, 1062–1068.
- Altin, J.G., and Sloan, E.K. (1997). The role of CD45 and CD45-associated molecules in T cell activation. *Immunol. Cell Biol.* **75**, 430–445.
- Ambrogio, M., Saracco, G., Specchia, V., van Gulijk, C., Makkee, M., and Moulijn, J.A. (2002). On the generation of aerosol for diesel particulate filtration studies. *Sep. Purif. Technol.* **27**, 195–209.
- Analitis, A., Katsouyanni, K., Dimakopoulou, K., Samoli, E., Nikoloulopoulos, A.K., Petasakis, Y., Touloumi, G., Schwartz, J., Anderson, H.R., Cambra, K., et al. (2006). Short-term effects of ambient particles on cardiovascular and respiratory mortality. *Epidemiol. Camb. Mass* **17**, 230–233.
- Andersen, C.L., Jensen, J.L., and Ørntoft, T.F. (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* **64**, 5245–5250.
- Anderson, P., Sundstedt, A., Li, L., O'Neill, E.J., Li, S., Wraith, D.C., and Wang, P. (2003). Differential activation of signal transducer and activator of transcription (STAT)3 and STAT5 and induction of suppressors of cytokine signalling in T(h)1 and T(h)2 cells. *Int. Immunol.* **15**, 1309–1317.
- Andrade, V.M., Mateus, M.L., Batoréu, M.C., Aschner, M., and Marreilha dos Santos, A.P. (2015). Lead, Arsenic, and Manganese Metal Mixture Exposures: Focus on Biomarkers of Effect. *Biol. Trace Elem. Res.* **166**, 13–23.
- Atkinson, R.W., Carey, I.M., Kent, A.J., van Staa, T.P., Anderson, H.R., and Cook, D.G. (2013). Long-term exposure to outdoor air pollution and incidence of cardiovascular diseases. *Epidemiol. Camb. Mass* **24**, 44–53.
- ATMO (2012). Inventaire des émissions.
- Avila-Tang, E., Al-Delaimy, W.K., Ashley, D.L., Benowitz, N., Bernert, J.T., Kim, S., Samet, J.M., and Hecht, S.S. (2013). Assessing secondhand smoke using biological markers. *Tob. Control* **22**, 164–171.
- Ayaz, L., Görür, A., Yaroğlu, H.Y., Ozcan, C., and Tamer, L. (2013). Differential expression of microRNAs in plasma of patients with laryngeal squamous cell carcinoma: potential early-detection markers for laryngeal squamous cell carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **139**, 1499–1506.
- Baccini, M., Mattei, A., Mealli, F., Bertazzi, P.A., and Carugno, M. (2017). Assessing the short term impact of air pollution on mortality: a matching approach. *Environ. Health Glob. Access Sci. Source* **16**, 7.
- Bartaire, J.-G. (2001). Le programme air pur pour l'Europe ou programme CAFE Vers une stratégie thématique de la qualité de l'air.

- Bas, A., Forsberg, G., Hammarström, S., and Hammarström, M.-L. (2004). Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, beta-actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* *59*, 566–573.
- Bauer, M.E., and Fuente, M.D. la (2016). The role of oxidative and inflammatory stress and persistent viral infections in immunosenescence. *Mech. Ageing Dev.* *158*, 27–37.
- Beelen, R., Hoek, G., van den Brandt, P.A., Goldbohm, R.A., Fischer, P., Schouten, L.J., Jerrett, M., Hughes, E., Armstrong, B., and Brunekreef, B. (2008). Long-Term Effects of Traffic-Related Air Pollution on Mortality in a Dutch Cohort (NLCS-AIR Study). *Environ. Health Perspect.* *116*, 196–202.
- Beelen, R., Stafoggia, M., Raaschou-Nielsen, O., Andersen, Z.J., Xun, W.W., Katsouyanni, K., Dimakopoulou, K., Brunekreef, B., Weinmayr, G., Hoffmann, B., et al. (2014). Long-term exposure to air pollution and cardiovascular mortality: an analysis of 22 European cohorts. *Epidemiol. Camb. Mass* *25*, 368–378.
- Bell, M.L., and Davis, D.L. (2001). Reassessment of the lethal London fog of 1952: novel indicators of acute and chronic consequences of acute exposure to air pollution. *Environ. Health Perspect.* *109*, 389–394.
- Bell, M.L., Zanobetti, A., and Dominici, F. (2013). Evidence on vulnerability and susceptibility to health risks associated with short-term exposure to particulate matter: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Epidemiol.* *178*, 865–876.
- Bellinger, D.C. (2005). Teratogen update: lead and pregnancy. *Birt. Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.* *73*, 409–420.
- Benowitz, N.L., Hukkanen, J., and Jacob, P. (2009). Nicotine Chemistry, Metabolism, Kinetics and Biomarkers. *Handb. Exp. Pharmacol.* 29–60.
- Bentayeb, M., Helmer, C., Raherison, C., Dartigues, J.F., Tessier, J.-F., and Annesi-Maesano, I. (2010). Bronchitis-like symptoms and proximity air pollution in French elderly. *Respir. Med.* *104*, 880–888.
- Bentayeb, M., Wagner, V., Stempfelet, M., Zins, M., Goldberg, M., Pascal, M., Larrieu, S., Beaudeau, P., Cassadou, S., Eilstein, D., et al. (2015). Association between long-term exposure to air pollution and mortality in France: A 25-year follow-up study. *Environ. Int.* *85*, 5–14.
- Bernstein, E.D., and Murasko, D.M. (1998). Effect of age on cytokine production in humans. *Age* *21*, 137–151.
- Bernstein, E.D., Gardner, E.M., Abrutyn, E., Gross, P., and Murasko, D.M. (1998). Cytokine production after influenza vaccination in a healthy elderly population. *Vaccine* *16*, 1722–1731.
- Beverland, I.J., Cohen, G.R., Heal, M.R., Carder, M., Yap, C., Robertson, C., Hart, C.L., and Agius, R.M. (2012). A Comparison of Short-term and Long-term Air Pollution Exposure Associations with Mortality in Two Cohorts in Scotland. *Environ. Health Perspect.* *120*, 1280–1285.
- Bi, X., Sheng, G., Peng, P., Chen, Y., and Fu, J. (2005). Size distribution of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in urban and rural atmospheres of Guangzhou, China. *Atmos. Environ.* *39*, 477–487.
- Bibi, F., Naseer, M.I., Alvi, S.A., Yasir, M., Jiman-Fatani, A.A., Sawan, A., Abuzenadah, A.M., Al-Qahtani, M.H., and Azhar, E.I. (2016). microRNA analysis of gastric cancer patients from Saudi Arabian population. *BMC Genomics* *17*.
- Billet, S., Garçon, G., Dagher, Z., Verdin, A., Ledoux, F., Cazier, F., Courcot, D., Aboukais, A., and Shirali, P. (2007). Ambient particulate matter (PM_{2.5}): physicochemical characterization and metabolic activation of the organic fraction in human lung epithelial cells (A549). *Environ. Res.* *105*, 212–223.
- Billet, S., Abbas, I., Goff, J.L., Verdin, A., André, V., Lafargue, P.-E., Hachimi, A., Cazier, F., Sichel, F., Shirali, P., et al. (2008). Genotoxic potential of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons-coated onto airborne Particulate Matter (PM_{2.5}) in human lung epithelial A549 cells. *Cancer Lett.* *270*, 144–155.
- Biomarkers Definitions Working Group. (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Ther.* *69*, 89–95.
- Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., and Kalayci, O. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ. J.* *5*, 9–19.

Références bibliographiques

- Boldo, E., Medina, S., LeTertre, A., Hurley, F., Mücke, H.-G., Ballester, F., Aguilera, I., Eilstein, D., and Apheis Group (2006). Apheis: Health impact assessment of long-term exposure to PM(2.5) in 23 European cities. *Eur. J. Epidemiol.* **21**, 449–458.
- Bollati, V., Marinelli, B., Apostoli, P., Bonzini, M., Nordio, F., Hoxha, M., Pegoraro, V., Motta, V., Tarantini, L., Cantone, L., et al. (2010). Exposure to metal-rich particulate matter modifies the expression of candidate microRNAs in peripheral blood leukocytes. *Environ. Health Perspect.* **118**, 763–768.
- Born, J., Uthgenannt, D., Dodt, C., Nünninghoff, D., Ringvold, E., Wagner, T., and Fehm, H.L. (1995). Cytokine production and lymphocyte subpopulations in aged humans. An assessment during nocturnal sleep. *Mech. Ageing Dev.* **84**, 113–126.
- Bossmann, K., Bach, S., Höflich, C., Valtanen, K., Heinze, R., Neumann, A., Straff, W., and Süring, K. (2016). Holi colours contain PM10 and can induce pro-inflammatory responses. *J. Occup. Med. Toxicol. Lond. Engl.* **11**, 42.
- Boyman, O., and Sprent, J. (2012). The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 180–190.
- Bøyum, A. (1968). Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. *Scand. J. Clin. Lab. Investig. Suppl.* **97**, 7.
- Bøyum, A., Løvhaug, D., Tresland, L., and Nordlie, E.M. (1991). Separation of leucocytes: improved cell purity by fine adjustments of gradient medium density and osmolality. *Scand. J. Immunol.* **34**, 697–712.
- ten Brink, H.M. (1998). Reactive uptake of HNO₃ and H₂SO₄ in sea-salt (NaCl) particles. *J. Aerosol Sci.* **29**, 57–64.
- Broere, F., Apasov, S.G., Sitkovsky, M.V., and van Eden, W. (2011). T cell subsets and T cell-mediated immunity. In *Principles of Immunopharmacology*, (Birkhäuser Basel), p. 728.
- Broeren, C.P., Gray, G.S., Carreno, B.M., and June, C.H. (2000). Costimulation light: activation of CD4⁺ T cells with CD80 or CD86 rather than anti-CD28 leads to a Th2 cytokine profile. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **165**, 6908–6914.
- Brubaker, J.O., and Montaner, L.J. (2001). Role of interleukin-13 in innate and adaptive immunity. *Cell. Mol. Biol. Noisy--Gd. Fr.* **47**, 637–651.
- zur Bruegge, J., Backes, C., Gözl, G., Hemmrich-Stanisak, G., Scharek-Tedin, L., Franke, A., Alter, T., Einspanier, R., Keller, A., and Sharbati, S. (2016). MicroRNA Response of Primary Human Macrophages to *Arcobacter Butzleri* Infection. *Eur. J. Microbiol. Immunol.* **6**, 99–108.
- Brunekreef, B., Beelen, R., Hoek, G., Schouten, L., Bausch-Goldbohm, S., Fischer, P., Armstrong, B., Hughes, E., Jerrett, M., and van den Brandt, P. (2009). Effects of long-term exposure to traffic-related air pollution on respiratory and cardiovascular mortality in the Netherlands: the NLCS-AIR study. *Res. Rep. Health Eff. Inst.* **5-71**; discussion 73-89.
- Bustin, S.A. (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* **29**, 23–39.
- Cai, Zhao, Zhao, Chen, Wang, Ha, Xu, and Kan Haidong (2014). Acute effects of air pollution on asthma hospitalization in Shanghai, China. **139–144**.
- Caito, S., and Aschner, M. (2015). Neurotoxicity of metals. *Handb. Clin. Neurol.* **131**, 169–189.
- Cakmak, S., Dales, R.E., and Vidal, C.B. (2007). Air Pollution and Mortality in Chile: Susceptibility among the Elderly. *Environ. Health Perspect.* **115**, 524–527.
- Cakman, I., Rohwer, J., Schütz, R.M., Kirchner, H., and Rink, L. (1996). Dysregulation between TH1 and TH2 T cell subpopulations in the elderly. *Mech. Ageing Dev.* **87**, 197–209.
- Candore, G., Di Lorenzo, G., Melluso, M., Cigna, D., Colucci, A.T., Modica, M.A., and Caruso, C. (1993). gamma-Interferon, interleukin-4 and interleukin-6 in vitro production in old subjects. *Autoimmunity* **16**, 275–280.
- Cavazzoni, M., Barogi, S., Baracca, A., Parenti Castelli, G., and Lenaz, G. (1999). The effect of aging and an oxidative stress on peroxide levels and the mitochondrial membrane potential in isolated rat hepatocytes. *FEBS Lett.* **449**, 53–56.
- Cesaroni, G., Forastiere, F., Stafoggia, M., Andersen, Z.J., Badaloni, C., Beelen, R., Caracciolo, B., de Faire, U., Erbel, R., Eriksen, K.T., et al. (2014). Long term exposure to ambient air pollution and incidence of acute coronary events: prospective cohort study and meta-analysis in 11 European cohorts from the ESCAPE Project. *BMJ* **348**, f7412.

Références bibliographiques

- Chan, S.H., Van Hee, V.C., Bergen, S., Szpiro, A.A., DeRoo, L.A., London, S.J., Marshall, J.D., Kaufman, J.D., and Sandler, D.P. (2015). Long-Term Air Pollution Exposure and Blood Pressure in the Sister Study. *Environ. Health Perspect.* **123**, 951–958.
- Chaudhri, G., Clark, I.A., Hunt, N.H., Cowden, W.B., and Ceredig, R. (1986). Effect of antioxidants on primary alloantigen-induced T cell activation and proliferation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **137**, 2646–2652.
- Chen, R., Li, Y., Ma, Y., Pan, G., Zeng, G., Xu, X., Chen, B., and Kan, H. (2011). Coarse particles and mortality in three Chinese cities: the China Air Pollution and Health Effects Study (CAPES). *Sci. Total Environ.* **409**, 4934–4938.
- Chen, R., Peng, R.D., Meng, X., Zhou, Z., Chen, B., and Kan, H. (2013). Seasonal variation in the acute effect of particulate air pollution on mortality in the China Air Pollution and Health Effects Study (CAPES). *Sci. Total Environ.* **450–451**, 259–265.
- Chen, W., Ma, X., Zhang, P., Li, Q., Liang, X., and Liu, J. (2017). MiR-212-3p inhibits LPS-induced inflammatory response through targeting HMGB1 in murine macrophages. *Exp. Cell Res.* **350**, 318–326.
- Chen, X., Zhang, L.-W., Huang, J.-J., Song, F.-J., Zhang, L.-P., Qian, Z.-M., Trevathan, E., Mao, H.-J., Han, B., Vaughn, M., et al. (2016). Long-term exposure to urban air pollution and lung cancer mortality: A 12-year cohort study in Northern China. *Sci. Total Environ.* **571**, 855–861.
- Chen, Y., Yang, Q., Krewski, D., Shi, Y., Burnett, R.T., and McGrail, K. (2004). Influence of relatively low level of particulate air pollution on hospitalization for COPD in elderly people. *Inhal. Toxicol.* **16**, 21–25.
- Chen, Y., Cao, J., Zhao, J., Xu, H., Arimoto, R., Wang, G., Han, Y., Shen, Z., and Li, G. (2014a). n-Alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in total suspended particulates from the southeastern Tibetan Plateau: Concentrations, seasonal variations, and sources. *Sci. Total Environ.* **470–471**, 9–18.
- Chen, Y., Wang, S.-X., Mu, R., Luo, X., Liu, Z.-S., Liang, B., Zhuo, H.-L., Hao, X.-P., Wang, Q., Fang, D.-F., et al. (2014b). Dysregulation of the miR-324-5p-CUEDC2 axis leads to macrophage dysfunction and is associated with colon cancer. *Cell Rep.* **7**, 1982–1993.
- Cheng, M., Chen, C., Chiu, H., and Yang, C. (2014). Fine particulate air pollution and hospital admissions for asthma: a case-crossover study in Taipei. - PubMed - NCBI. **77**, 1075–1083.
- Chibber, S., and Shanker, R. (2017). Can CuO nanoparticles lead to epigenetic regulation of antioxidant enzyme system? *J. Appl. Toxicol. JAT* **37**, 84–91.
- Chiu, H.-F., Tsai, S.-S., Weng, H.-H., and Yang, C.-Y. (2013). Short-term effects of fine particulate air pollution on emergency room visits for cardiac arrhythmias: a case-crossover study in Taipei. *J. Toxicol. Environ. Health A* **76**, 614–623.
- Choi, J.-H., Kim, J.-S., Kim, Y.-C., Kim, Y.-S., Chung, N.-H., and Cho, M.-H. (2004). Comparative study of PM_{2.5} - and PM₁₀ - induced oxidative stress in rat lung epithelial cells. *J. Vet. Sci.* **5**, 11–18.
- Churov, A.V., Oleinik, E.K., and Knip, M. (2015). MicroRNAs in rheumatoid arthritis: altered expression and diagnostic potential. *Autoimmun. Rev.* **14**, 1029–1037.
- Colais, P., Faustini, A., Stafoggia, M., Berti, G., Bisanti, L., Cadum, E., Cernigliaro, A., Mallone, S., Pacelli, B., Serinelli, M., et al. (2012). Particulate air pollution and hospital admissions for cardiac diseases in potentially sensitive subgroups. *Epidemiol. Camb. Mass* **23**, 473–481.
- Constant, S.L., and Bottomly, K. (1997). Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 297–322.
- Constant, S., Pfeiffer, C., Woodard, A., Pasqualini, T., and Bottomly, K. (1995). Extent of T cell receptor ligation can determine the functional differentiation of naive CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* **182**, 1591–1596.
- Crouse, D.L., Peters, P.A., van Donkelaar, A., Goldberg, M.S., Villeneuve, P.J., Brion, O., Khan, S., Atari, D.O., Jerrett, M., Pope, C.A., et al. (2012). Risk of nonaccidental and cardiovascular mortality in relation to long-term exposure to low concentrations of fine particulate matter: a Canadian national-level cohort study. *Environ. Health Perspect.* **120**, 708–714.
- Crouse, D.L., Peters, P.A., Hystad, P., Brook, J.R., van Donkelaar, A., Martin, R.V., Villeneuve, P.J., Jerrett, M., Goldberg, M.S., Pope, C.A., et al. (2015). Ambient PM_{2.5}, O₃, and NO₂ Exposures and Associations with Mortality over 16 Years of Follow-Up in the Canadian Census Health and Environment Cohort (CanCHEC). *Environ. Health Perspect.* **123**, 1180–1186.

- Cullen, J.J., Weydert, C., Hinkhouse, M.M., Ritchie, J., Domann, F.E., Spitz, D., and Oberley, L.W. (2003). The role of manganese superoxide dismutase in the growth of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res.* 63, 1297–1303.
- Cutler, R.G. (1985). Peroxide-producing potential of tissues: inverse correlation with longevity of mammalian species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 4798–4802.
- Cyrus, J., Stölzel, M., Heinrich, J., Kreyling, W.G., Menzel, N., Wittmaack, K., Tuch, T., and Wichmann, H.-E. (2003). Elemental composition and sources of fine and ultrafine ambient particles in Erfurt, Germany. *Sci. Total Environ.* 305, 143–156.
- Dall'Osto, M., Booth, M.J., Smith, W., Fisher, R., and Harrison, R.M. (2008). A Study of the Size Distributions and the Chemical Characterization of Airborne Particles in the Vicinity of a Large Integrated Steelworks. *Aerosol Sci. Technol.* 42, 981–991.
- Darrow, L.A., Klein, M., Flanders, W.D., Mulholland, J.A., Tolbert, P.E., and Strickland, M.J. (2014). Air pollution and acute respiratory infections among children 0-4 years of age: an 18-year time-series study. *Am. J. Epidemiol.* 180, 968–977.
- Dasgupta, P.K., Campbell, S.W., Al-Horri, R.S., Ullah, S.M.R., Li, J., Amalfitano, C., and Poor, N.D. (2007). Conversion of sea salt aerosol to NaNO₃ and the production of HCl: Analysis of temporal behavior of aerosol chloride/nitrate and gaseous HCl/HNO₃ concentrations with AIM. *Atmos. Environ.* 41, 4242–4257.
- Deng, D., Wang, L., Chen, Y., Li, B., Xue, L., Shao, N., Wang, Q., Xia, X., Yang, Y., and Zhi, F. (2016). MicroRNA-124-3p regulates cell proliferation, invasion, apoptosis, and bioenergetics by targeting PIM1 in astrocytoma. *Cancer Sci.* 107, 899–907.
- Deng, X., Rui, W., Zhang, F., and Ding, W. (2013a). PM_{2.5} induces Nrf2-mediated defense mechanisms against oxidative stress by activating PIK3/AKT signaling pathway in human lung alveolar epithelial A549 cells. *Cell Biol. Toxicol.* 29, 143–157.
- Deng, X., Zhang, F., Rui, W., Long, F., Wang, L., Feng, Z., Chen, D., and Ding, W. (2013b). PM_{2.5}-induced oxidative stress triggers autophagy in human lung epithelial A549 cells. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* 27, 1762–1770.
- Dergham, M., Lepers, C., Verdin, A., Billet, S., Cazier, F., Courcot, D., Shirali, P., and Garçon, G. (2012). Prooxidant and proinflammatory potency of air pollution particulate matter (PM_{2.5-10.5}) produced in rural, urban, or industrial surroundings in human bronchial epithelial cells (BEAS-2B). *Chem. Res. Toxicol.* 25, 904–919.
- Di Bucchianico, S., Fabbri, M.R., Misra, S.K., Valsami-Jones, E., Berhanu, D., Reip, P., Bergamaschi, E., and Migliore, L. (2013). Multiple cytotoxic and genotoxic effects induced in vitro by differently shaped copper oxide nanomaterials. *Mutagenesis* 28, 287–299.
- Dinkova-Kostova, A.T., and Talalay, P. (2010). NAD(P)H:quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme and exceptionally versatile cytoprotector. *Arch. Biochem. Biophys.* 501, 116–123.
- Dock, J., Hultin, L., Hultin, P., Elliot, J., Yang, O.O., Anton, P.A., Jamieson, B.D., and Effros, R.B. (2017). Human immune compartment comparisons: Optimization of proliferative assays for blood and gut T lymphocytes. *J. Immunol. Methods* 445, 77–87.
- Dockery, D.W., Pope, C.A., Xu, X., Spengler, J.D., Ware, J.H., Fay, M.E., Ferris, B.G., and Speizer, F.E. (1993). An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. *N. Engl. J. Med.* 329, 1753–1759.
- Dominici, F., Peng, R.D., Bell, M.L., Pham, L., McDermott, A., Zeger, S.L., and Samet, J.M. (2006). Fine Particulate Air Pollution and Hospital Admission for Cardiovascular and Respiratory Diseases. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 295, 1127–1134.
- Dong, G.-H., Zhang, P., Sun, B., Zhang, L., Chen, X., Ma, N., Yu, F., Guo, H., Huang, H., Lee, Y.L., et al. (2012). Long-term exposure to ambient air pollution and respiratory disease mortality in Shenyang, China: a 12-year population-based retrospective cohort study. *Respir. Int. Rev. Thorac. Dis.* 84, 360–368.
- DuPage, M., and Bluestone, J.A. (2016). Harnessing the plasticity of CD4+ T cells to treat immune-mediated disease. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 149–163.
- Dwivedi, S., Saquib, Q., Al-Khedhairy, A.A., Ali, A.-Y.S., and Musarrat, J. (2012). Characterization of coal fly ash nanoparticles and induced oxidative DNA damage in human peripheral blood mononuclear cells. *Sci. Total Environ.* 437, 331–338.
- Eckel, S.P., Louis, T.A., Chaves, P.H.M., Fried, L.P., and Margolis, A.H.G. (2012). Modification of the association between ambient air pollution and lung function by frailty status among older adults in the Cardiovascular Health Study. *Am. J. Epidemiol.* 176, 214–223.

Références bibliographiques

EEA (2016). Air quality in Europe — 2016 report — European Environment Agency.

Eenhuizen, E., Gehring, U., Wijga, A.H., Smit, H.A., Fischer, P.H., Brauer, M., Koppelman, G.H., Kerkhof, M., de Jongste, J.C., Brunekreef, B., et al. (2013). Traffic-related air pollution is related to interrupter resistance in 4-year-old children. *Eur. Respir. J.* **41**, 1257–1263.

Eisenberg, E., and Levanon, E.Y. (2003). Human housekeeping genes are compact. *Trends Genet. TIG* **19**, 362–365.

Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* **391**, 43–50.

Ensor, K.B., Raun, L.H., and Persse, D. (2013). A case-crossover analysis of out-of-hospital cardiac arrest and air pollution. *Circulation* **127**, 1192–1199.

EPA, (2017). Evolution of the Clean Air Act.

Espino, J., Bejarano, I., Paredes, S.D., González, D., Barriga, C., Reiter, R.J., Pariente, J.A., and Rodríguez, A.B. (2010). Melatonin counteracts alterations in oxidative metabolism and cell viability induced by intracellular calcium overload in human leucocytes: changes with age. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **107**, 590–597.

Estarlich, M., Ballester, F., Davdand, P., Llop, S., Esplugues, A., Fernández-Somoano, A., Lertxundi, A., Guxens, M., Basterrechea, M., Tardón, A., et al. (2016). Exposure to ambient air pollution during pregnancy and preterm birth: A Spanish multicenter birth cohort study. *Environ. Res.* **147**, 50–58.

Fagnoni, F.F., Vescovini, R., Passeri, G., Bologna, G., Pedrazzoni, M., Lavagetto, G., Casti, A., Franceschi, C., Passeri, M., and Sansoni, P. (2000). Shortage of circulating naive CD8(+) T cells provides new insights on immunodeficiency in aging. *Blood* **95**, 2860–2868.

Fahmy, B., and Cormier, S.A. (2009). Copper oxide nanoparticles induce oxidative stress and cytotoxicity in airway epithelial cells. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* **23**, 1365–1371.

Faltejskova, P., Svoboda, M., Srutova, K., Mlcochova, J., Besse, A., Nekvindova, J., Radova, L., Fabian, P., Slaba, K., Kiss, I., et al. (2012). Identification and functional screening of microRNAs highly deregulated in colorectal cancer. *J. Cell. Mol. Med.* **16**, 2655–2666.

Fayyad-Kazan, H., Hamade, E., Rouas, R., Najar, M., Fayyad-Kazan, M., El Zein, N., ElDirani, R., Hussein, N., Fakhry, M., Al-Akoum, C., et al. (2014). Downregulation of microRNA-24 and -181 parallels the upregulation of IFN- γ secreted by activated human CD4 lymphocytes. *Hum. Immunol.* **75**, 677–685.

Federico, A., Morgillo, F., Tuccillo, C., Ciardiello, F., and Loguercio, C. (2007). Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. *Int. J. Cancer* **121**, 2381–2386.

Finkel, T. (2011). Signal transduction by reactive oxygen species. *J. Cell Biol.* **194**, 7–15.

Fossati, S., Baccarelli, A., Zanobetti, A., Hoxha, M., Vokonas, P.S., Wright, R.O., and Schwartz, J. (2014). Ambient particulate air pollution and microRNAs in elderly men. *Epidemiol. Camb. Mass* **25**, 68–78.

Franklin, M., Zeka, A., and Schwartz, J. (2007). Association between PM_{2.5} and all-cause and specific-cause mortality in 27 US communities. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* **17**, 279–287.

Frauwirth, K.A., and Thompson, C.B. (2002). Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. *J. Clin. Invest.* **109**, 295–299.

Frère, S., and Zwarterook, I. (2016). La concertation dans l'élaboration des Plans de prévention des risques technologiques de Dunkerque : asymétries d'information et jeux d'acteurs. *Nat. Sci. Sociétés* **24**, 109–122.

Friedman, R.C., Farh, K.K.-H., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* **19**, 92–105.

Fulci, V., Chiaretti, S., Goldoni, M., Azzalin, G., Carucci, N., Tavolaro, S., Castellano, L., Magrelli, A., Citarella, F., Messina, M., et al. (2007). Quantitative technologies establish a novel microRNA profile of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **109**, 4944–4951.

Références bibliographiques

- Ganesan, J., Ramanujam, D., Sassi, Y., Ahles, A., Jentzsch, C., Werfel, S., Leierseder, S., Loyer, X., Giacca, M., Zentilin, L., et al. (2013). MiR-378 controls cardiac hypertrophy by combined repression of mitogen-activated protein kinase pathway factors. *Circulation* 127, 2097–2106.
- Gardner, E.M., Gonzalez, E.W., Nogusa, S., and Murasko, D.M. (2006). Age-related changes in the immune response to influenza vaccination in a racially diverse, healthy elderly population. *Vaccine* 24, 1609–1614.
- Garza, A., Vega, R., and Soto, E. (2006). Cellular mechanisms of lead neurotoxicity. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* 12, RA57–65.
- Gehling, W., Khachatryan, L., and Dellinger, B. (2014). Hydroxyl Radical Generation from Environmentally Persistent Free Radicals (EPFRs) in PM2.5. *Environ. Sci. Technol.* 48, 4266–4272.
- Gehring, U., Wijga, A.H., Brauer, M., Fischer, P., de Jongste, J.C., Kerkhof, M., Oldenwening, M., Smit, H.A., and Brunekreef, B. (2010). Traffic-related air pollution and the development of asthma and allergies during the first 8 years of life. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 181, 596–603.
- Gharibvand, L., Shavlik, D., Ghamsary, M., Beeson, W.L., Soret, S., Knutsen, R., and Knutsen, S.F. (2017). The Association between Ambient Fine Particulate Air Pollution and Lung Cancer Incidence: Results from the AHSMOG-2 Study. *Environ. Health Perspect.* 125, 378–384.
- Ghio, A.J., Carraway, M.S., and Madden, M.C. (2012). Composition of air pollution particles and oxidative stress in cells, tissues, and living systems. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 15, 1–21.
- Gietl, J.K., Lawrence, R., Thorpe, A.J., and Harrison, R.M. (2010). Identification of brake wear particles and derivation of a quantitative tracer for brake dust at a major road. *Atmos. Environ.* 44, 141–146.
- Glikson, M., Rutherford, S., Simpson, R.W., Mitchell, C.A., and Yago, A. (1995). Microscopic and submicron components of atmospheric particulate matter during high asthma periods in Brisbane, Queensland, Australia. *Atmos. Environ.* 29, 549–562.
- Gogou, A., Stratigakis, N., Kanakidou, M., and Stephanou, E.G. (1996). Organic aerosols in Eastern Mediterranean: components source reconciliation by using molecular markers and atmospheric back trajectories - ScienceDirect. *Organic Geochemistry* 25, 79–96.
- Goldberg, M.S., Burnett, R.T., Stieb, D.M., Brophy, J.M., Daskalopoulou, S.S., Valois, M.-F., and Brook, J.R. (2013). Associations between ambient air pollution and daily mortality among elderly persons in Montreal, Quebec. *Sci. Total Environ.* 463–464, 931–942.
- Golubovskaya, V., and Wu, L. (2016). Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy. *Cancers* 8.
- Götschi, T., Hazenkamp-von Arx, M.E., Heinrich, J., Bono, R., Burney, P., Forsberg, B., Jarvis, D., Maldonado, J., Norbäck, D., Stern, W.B., et al. (2005). Elemental composition and reflectance of ambient fine particles at 21 European locations. *Atmos. Environ.* 39, 5947–5958.
- Grigoratos, T., and Martini, G. (2015). Brake wear particle emissions: a review. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 22, 2491–2504.
- Grigoryev, Y.A., Kurian, S.M., Hart, T., Nakorchevsky, A.A., Chen, C., Campbell, D., Head, S.R., Yates, J.R., and Salomon, D.R. (2011). MicroRNA regulation of molecular networks mapped by global microRNA, mRNA, and protein expression in activated T lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 187, 2233–2243.
- Gualtieri, M., Ovrevik, J., Mollerup, S., Asare, N., Longhin, E., Dahlman, H.-J., Camatini, M., and Holme, J.A. (2011). Airborne urban particles (Milan winter-PM2.5) cause mitotic arrest and cell death: Effects on DNA, mitochondria, AhR binding and spindle organization. *Mutat. Res.* 713, 18–31.
- Gualtieri, M., Longhin, E., Mattioli, M., Mantecca, P., Tinaglia, V., Mangano, E., Proverbio, M.C., Bestetti, G., Camatini, M., and Battaglia, C. (2012). Gene expression profiling of A549 cells exposed to Milan PM2.5. *Toxicol. Lett.* 209, 136–145.
- Guengerich, F.P. (2008). Cytochrome p450 and chemical toxicology. *Chem. Res. Toxicol.* 21, 70–83.
- Guenther, A., Hewitt, C.N., Erickson, D., Fall, R., Geron, C., Graedel, T., Harley, P., Klinger, L., Lerdau, M., McKay, W.A., et al. (1995). A global model of natural volatile organic compound emissions. *J. Geophys. Res. Atmospheres* 100, 8873–8892.

Références bibliographiques

- Guo, D.D., Li, Q., Tang, H.Y., Su, J., and Bi, H.S. (2016). Zinc oxide nanoparticles inhibit expression of manganese superoxide dismutase via amplification of oxidative stress, in murine photoreceptor cells. *Cell Prolif.* **49**, 386–394.
- Hales, S., Blakely, T., and Woodward, A. (2012). Air pollution and mortality in New Zealand: cohort study. *J Epidemiol community health* **468**.
- Halonen, J.I., Lanki, T., Yli-Tuomi, T., Kulmala, M., Tiittanen, P., and Pekkanen, J. (2008). Urban air pollution, and asthma and COPD hospital emergency room visits. *Thorax* **63**, 635–641.
- Halonen, J.I., Lanki, T., Yli-Tuomi, T., Tiittanen, P., Kulmala, M., and Pekkanen, J. (2009). Particulate air pollution and acute cardiorespiratory hospital admissions and mortality among the elderly. *Epidemiol. Camb. Mass* **20**, 143–153.
- Harman, D. (1956a). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* **11**, 298–300.
- Harman, D. (1956b). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* **11**, 298–300.
- Harrison, R.M., and Yin, J. (2000). Particulate matter in the atmosphere: which particle properties are important for its effects on health? *Sci. Total Environ.* **249**, 85–101.
- Harrison, R.M., Deacon, A.R., Jones, M.R., and Appleby, R.S. (1997). Sources and processes affecting concentrations of PM10 and PM2.5 particulate matter in Birmingham (U.K.). *Atmos. Environ.* **31**, 4103–4117.
- Hart, J., Garshick, E., Dockery, D.W., Smith, T., Ryan, L., and Laden, F. (2011). Long-term ambient multipollutant exposures and mortality. - PubMed - NCBI.
- HAS (1997). Lecture critique de l'hémogramme valeurs seuils à reconnaître comme probablement pathologiques et principales variations non pathologiques.
- Heal, M.R. (2014). The application of carbon-14 analyses to the source apportionment of atmospheric carbonaceous particulate matter: a review. *Anal. Bioanal. Chem.* **406**, 81–98.
- Hedfors, I.A., and Brinchmann, J.E. (2003). Long-Term Proliferation and Survival of In Vitro-Activated T Cells is Dependent on Interleukin-2 Receptor Signalling but not on the High-Affinity IL-2R. *Scand. J. Immunol.* **58**, 522–532.
- Helfand, W.H., Lazarus, J., and Theerman, P. (2001). Donora, Pennsylvania: an environmental disaster of the 20th century. *Am. J. Public Health* **91**, 553.
- Henkel, D. (2017). Le système circulatoire & ses éléments. | Daniele Henkel.
- Herberth, G., Bauer, M., Gasch, M., Hinz, D., Röder, S., Olek, S., Kohajda, T., Rolle-Kampczyk, U., von Bergen, M., Sack, U., et al. (2014). Maternal and cord blood miR-223 expression associates with prenatal tobacco smoke exposure and low regulatory T-cell numbers. *J. Allergy Clin. Immunol.* **133**, 543–550.
- Herd, B., Wynne, H., Wright, P., James, O., and Woodhouse, K. (1991). The effect of age on glucuronidation and sulphation of paracetamol by human liver fractions. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **32**, 768–770.
- Hirokawa, K., and Makinodan, T. (1975). Thymic Involution: Effect on T Cell Differentiation. *J. Immunol.* **114**, 1659–1664.
- Hleis, D., Fernández-Olmo, I., Ledoux, F., Kfoury, A., Courcot, L., Desmonts, T., and Courcot, D. (2013). Chemical profile identification of fugitive and confined particle emissions from an integrated iron and steelmaking plant. *J. Hazard. Mater.* **250–251**, 246–255.
- Holz, O., Krause, T., and Rüdiger, H.W. (1991). Differences in DNA adduct formation between monocytes and lymphocytes after in vivo incubation with benzo[a]pyrene. *Carcinogenesis* **12**, 2181–2183.
- Hooten, N.N., Abdelmohsen, K., Gorospe, M., Ejiogu, N., Zonderman, A.B., and Evans, M.K. (2010). microRNA Expression Patterns Reveal Differential Expression of Target Genes with Age. *PLOS ONE* **5**, e10724.
- Horn, S., Barnard, S., and Rothkamm, K. (2011). Gamma-H2AX-Based Dose Estimation for Whole and Partial Body Radiation Exposure. *PLoS ONE* **6**.
- Horn, S., Brady, D., and Prise, K. (2015). Alpha particles induce pan-nuclear phosphorylation of H2AX in primary human lymphocytes mediated through ATM. *Biochim. Biophys. Acta* **1853**, 2199–2206.

Références bibliographiques

- Hosken, N.A., Shibuya, K., Heath, A.W., Murphy, K.M., and O'Garra, A. (1995). The effect of antigen dose on CD4+ T helper cell phenotype development in a T cell receptor-alpha beta-transgenic model. *J. Exp. Med.* **182**, 1579–1584.
- Host, S., Larrieu, S., Pascal, L., Blanchard, M., Declercq, C., Fabre, P., Jusot, J.-F., Chardon, B., Le Tertre, A., Wagner, V., et al. (2008). Short-term associations between fine and coarse particles and hospital admissions for cardiorespiratory diseases in six French cities. *Occup. Environ. Med.* **65**, 544–551.
- Hsieh, C.S., Heimberger, A.B., Gold, J.S., O'Garra, A., and Murphy, K.M. (1992). Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in an alpha beta T-cell-receptor transgenic system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 6065–6069.
- Hu, D., Peng, X., Liu, Y., Zhang, W., Peng, X., Tang, H., Yuan, J., Zhu, Z., and Yang, J. (2016). Overexpression of miR-221 in peripheral blood lymphocytes in petrol station attendants: A population based cross-sectional study in southern China. *Chemosphere* **149**, 8–13.
- Huang, K.-L., Liu, S.-Y., Chou, C.C.K., Lee, Y.-H., and Cheng, T.-J. (2017). The effect of size-segregated ambient particulate matter on Th1/Th2-like immune responses in mice. *PLoS ONE* **12**.
- Huang, W., Li, H., and Luo, R. (2015). The microRNA-1246 promotes metastasis in non-small cell lung cancer by targeting cytoplasmic polyadenylation element-binding protein 4. *Diagn. Pathol.* **10**, 127.
- Hunt, C.M., Strater, S., and Stave, G.M. (1990). Effect of normal aging on the activity of human hepatic cytochrome P450IIE1. *Biochem. Pharmacol.* **40**, 1666–1669.
- Hwang, H., and Ro, C.-U. (2006). Direct observation of nitrate and sulfate formations from mineral dust and sea-salts using low-Z particle electron probe X-ray microanalysis. *Atmos. Environ.* **40**, 3869–3880.
- IARC (2017). IARC TP53 Database.
- Ilacqua, V., Hänninen, O., Saarela, K., Katsouyanni, K., Künzli, N., and Jantunen, M. (2007). Source apportionment of population representative samples of PM_{2.5} in three European cities using structural equation modelling. *Sci. Total Environ.* **384**, 77–92.
- INERIS (2005). Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques-indéno[1,2,3-c,d]pyrène.
- INERIS (2006). Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques-Dibenzo[a,h]anthracène.
- INERIS (2011). Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques-Chrysène.
- Insee (2016). Populations légales 2014–Commune de Dunkerque (59183) | Insee.
- Ishida, M., Ishida, T., Tashiro, S., Uchida, H., Sakai, C., Hironobe, N., Miura, K., Hashimoto, Y., Arihiro, K., Chayama, K., et al. (2014). Smoking cessation reverses DNA double-strand breaks in human mononuclear cells. *PLoS One* **9**, e103993.
- Janiszewska, J., Szaumkessel, M., Kostrzewska-Poczekaj, M., Bednarek, K., Paczkowska, J., Jackowska, J., Grenman, R., Szyfter, K., Wierzbicka, M., Giefing, M., et al. (2015). Global miRNA Expression Profiling Identifies miR-1290 as Novel Potential oncomiR in Laryngeal Carcinoma. *PLoS One* **10**, e0144924.
- Janssen, N. a. H., Fischer, P., Marra, M., Ameling, C., and Cassee, F.R. (2013). Short-term effects of PM_{2.5}, PM₁₀ and PM_{2.5-10} on daily mortality in The Netherlands. *Sci. Total Environ.* **463–464**, 20–26.
- Jiang, R., Jones, M.J., Sava, F., Kobor, M.S., and Carlsten, C. (2014a). Short-term diesel exhaust inhalation in a controlled human crossover study is associated with changes in DNA methylation of circulating mononuclear cells in asthmatics. *Part. Fibre Toxicol.* **11**, 71.
- Jiang, S., Li, C., McRae, G., Lykken, E., Sevilla, J., Liu, S.-Q., Wan, Y., and Li, Q.-J. (2014b). MeCP2 reinforces STAT3 signaling and the generation of effector CD4+ T cells by promoting miR-124-mediated suppression of SOCS5. *Sci. Signal.* **7**, ra25.
- Jin, B., Sun, T., Yu, X.-H., Yang, Y.-X., and Yeo, A.E.T. (2012). The effects of TLR activation on T-cell development and differentiation. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, 836485.
- Jo, E.-J., Lee, W.-S., Jo, H.-Y., Kim, C.-H., Eom, J.-S., Mok, J.-H., Kim, M.-H., Lee, K., Kim, K.-U., Lee, M.-K., et al. (2017). Effects of particulate matter on respiratory disease and the impact of meteorological factors in Busan, Korea. *Respir. Med.* **124**, 79–87.

- Kälsch, H., Hennig, F., Moebus, S., Möhlenkamp, S., Dragano, N., Jakobs, H., Memmesheimer, M., Erbel, R., Jöckel, K.-H., Hoffmann, B., et al. (2014). Are air pollution and traffic noise independently associated with atherosclerosis: the Heinz Nixdorf Recall Study. *Eur. Heart J.* 35, 853–860.
- Kan, H., Chen, B., Zhao, N., London, S.J., Song, G., Chen, G., Zhang, Y., Jiang, L., and HEI Health Review Committee (2010). Part 1. A time-series study of ambient air pollution and daily mortality in Shanghai, China. *Res. Rep. Health Eff. Inst.* 17–78.
- Karanfilov, C.I., Liu, B., Fox, C.C., Lakshmanan, R.R., and Whisler, R.L. (1999). Age-related defects in Th1 and Th2 cytokine production by human T cells can be dissociated from altered frequencies of CD45RA+ and CD45RO+ T cell subsets. *Mech. Ageing Dev.* 109, 97–112.
- Karlgren, M., Miura, S., and Ingelman-Sundberg, M. (2005). Novel extrahepatic cytochrome P450s. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207, 57–61.
- Karlsson, H.L., Cronholm, P., Gustafsson, J., and Möller, L. (2008). Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chem. Res. Toxicol.* 21, 1726–1732.
- Katanoda, K., Sobue, T., Satoh, H., Tajima, K., Suzuki, T., Nakatsuka, H., Takezaki, T., Nakayama, T., Nitta, H., Tanabe, K., et al. (2011). An association between long-term exposure to ambient air pollution and mortality from lung cancer and respiratory diseases in Japan. - PubMed - NCBI. 132.
- Kawanishi, M., Watanabe, T., Hagio, S., Ogo, S., Shimohara, C., Jouchi, R., Takayama, S., Hasei, T., Hirayama, T., Oda, Y., et al. (2009). Genotoxicity of 3,6-dinitrobenzo[e]pyrene, a novel mutagen in ambient air and surface soil, in mammalian cells in vitro and in vivo. *Mutagenesis* 24, 279–284.
- Kay, J.E. (1991). Mechanisms of T lymphocyte activation. *Immunol. Lett.* 29, 51–54.
- Kedziora-Kornatowska, K., Szewczyk-Golec, K., Czuczejko, J., van Marke de Lumen, K., Pawluk, H., Motyl, J., Karasek, M., and Kedziora, J. (2007). Effect of melatonin on the oxidative stress in erythrocytes of healthy young and elderly subjects. *J. Pineal Res.* 42, 153–158.
- Kesarwani, P., Murali, A.K., Al-Khami, A.A., and Mehrotra, S. (2013). Redox Regulation of T-Cell Function: From Molecular Mechanisms to Significance in Human Health and Disease. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 1497–1534.
- Kfoury, A., Ledoux, F., Roche, C., Delmaire, G., Roussel, G., and Courcot, D. (2016a). PM2.5 source apportionment in a French urban coastal site under steelworks emission influences using constrained non-negative matrix factorization receptor model. *J. Environ. Sci.* 40, 114–128.
- Kfoury, A., Ledoux, F., Roche, C., Delmaire, G., Roussel, G., and Courcot, D. (2016b). PM2.5 source apportionment in a French urban coastal site under steelworks emission influences using constrained non-negative matrix factorization receptor model. *J. Environ. Sci.* 40, 114–128.
- Khachatryan, L., Vejerano, E., Lomnicki, S., and Dellinger, B. (2011). Environmentally Persistent Free Radicals (EPFRs). 1. Generation of Reactive Oxygen Species in Aqueous Solutions. *Environ. Sci. Technol.* 45, 8559–8566.
- Kim, G., An, H.-J., Lee, M.-J., Song, J.-Y., Jeong, J.-Y., Lee, J.-H., and Jeong, H.-C. (2016). Hsa-miR-1246 and hsa-miR-1290 are associated with stemness and invasiveness of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer Amst. Neth.* 91, 15–22.
- Kim, H.J., Choi, M.G., Park, M.K., and Seo, Y.R. (2017a). Predictive and Prognostic Biomarkers of Respiratory Diseases due to Particulate Matter Exposure. *J. Cancer Prev.* 22, 6–15.
- Kim, H.P., Wang, X., Chen, Z.-H., Lee, S.-J., Huang, M.-H., Wang, Y., Ryter, S.W., and Choi, A.M.K. (2008). Autophagic proteins regulate cigarette smoke-induced apoptosis: protective role of heme oxygenase-1. *Autophagy* 4, 887–895.
- Kim, J.-H., Lee, B.-R., Choi, E.-S., Lee, K.-M., Choi, S.-K., Cho, J.H., Jeon, W.B., and Kim, E. (2017b). Reverse Expression of Aging-Associated Molecules through Transfection of miRNAs to Aged Mice. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 6, 106–115.
- Kim, K., Park, E.-Y., Lee, K.-H., Park, J.-D., Kim, Y.-D., and Hong, Y.-C. (2009). Differential oxidative stress response in young children and the elderly following exposure to PM2.5. *Environ. Health Prev. Med.* 14, 60–66.
- Kim, K.B., Kim, K., Bae, S., Choi, Y., Cha, H.J., Kim, S.Y., Lee, J.H., Jeon, S.H., Jung, H.J., Ahn, K.J., et al. (2014). MicroRNA-1290 promotes asiatic acid-induced apoptosis by decreasing BCL2 protein level in A549 non-small cell lung carcinoma cells. *Oncol. Rep.* 32, 1029–1036.

Références bibliographiques

- Kimura, A., Naka, T., Nohara, K., Fujii-Kuriyama, Y., and Kishimoto, T. (2008). Aryl hydrocarbon receptor regulates Stat1 activation and participates in the development of Th17 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 9721–9726.
- Kloog, I., Zanobetti, A., Nordio, F., Coull, B.A., Baccarelli, A.A., and Schwartz, J. (2015). Effects of airborne fine particles (PM_{2.5}) on deep vein thrombosis admissions in the northeastern United States. *J. Thromb. Haemost. JTH* *13*, 768–774.
- Kloosterman, W.P., and Plasterk, R.H.A. (2006). The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev. Cell* *11*, 441–450.
- Klössová, Z., Drímal, M., Balog, K., Koppová, K., and Dubajová, J. (2016). The Relations between Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Exposure and 1-OHP Levels as a Biomarker of the Exposure. *Cent. Eur. J. Public Health* *24*, 302–307.
- von Klot, S., Peters, A., Aalto, P., Bellander, T., Berglind, N., D'Ippoliti, D., Elosua, R., Hörmann, A., Kulmala, M., Lanki, T., et al. (2005). Ambient air pollution is associated with increased risk of hospital cardiac readmissions of myocardial infarction survivors in five European cities. *Circulation* *112*, 3073–3079.
- Knezevic, I., Patel, A., Sundaresan, N.R., Gupta, M.P., Solaro, R.J., Nagalingam, R.S., and Gupta, M. (2012). A Novel Cardiomyocyte-enriched MicroRNA, miR-378, Targets Insulin-like Growth Factor 1 Receptor. *J. Biol. Chem.* *287*, 12913–12926.
- Ko, F.W.S., Tam, W., Wong, T.W., Lai, C.K.W., Wong, G.W.K., Leung, T.-F., Ng, S.S.S., and Hui, D.S.C. (2007). Effects of air pollution on asthma hospitalization rates in different age groups in Hong Kong. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* *37*, 1312–1319.
- Kobayashi, K.S., and van den Elsen, P.J. (2012). NLRC5: a key regulator of MHC class I-dependent immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 813–820.
- Kocijan, R., Muschitz, C., Geiger, E., Skalicky, S., Baierl, A., Dormann, R., Plachel, F., Feichtinger, X., Heimel, P., Fahrleitner-Pammer, A., et al. (2016). Circulating microRNA Signatures in Patients With Idiopathic and Postmenopausal Osteoporosis and Fragility Fractures. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *101*, 4125–4134.
- Kollipara, S., Bende, G., Agarwal, N., Varshney, B., and Paliwal, J. (2011). International Guidelines for Bioanalytical Method Validation: A Comparison and Discussion on Current Scenario. *Chromatographia* *73*, 201–217.
- Kouassi, K.S., Billet, S., Garçon, G., Verdin, A., Diouf, A., Cazier, F., Djaman, J., Courcot, D., and Shirali, P. (2010). Oxidative damage induced in A549 cells by physically and chemically characterized air particulate matter (PM_{2.5}) collected in Abidjan, Côte d'Ivoire. *J. Appl. Toxicol. JAT* *30*, 310–320.
- Kowalska, M., and Kocot, K. (2016). Short-term exposure to ambient fine particulate matter (PM_{2.5} and PM₁₀) and the risk of heart rhythm abnormalities and stroke. *Postepy Hig. Med. Doswiadczalnej Online* *70*, 1017–1025.
- Krewski, D., Burnett, R.T., Goldberg, M.S., Hoover, K., Siemiatycki, J., Abrahamowicz, M., and White, W.H. (2004). Validation of the Harvard Six Cities Study of particulate air pollution and mortality. *N. Engl. J. Med.* *350*, 198–199.
- Krewski, D., Jerrett, M., Burnett, R.T., Ma, R., Hughes, E., Shi, Y., Turner, M.C., Pope, C.A., Thurston, G., Calle, E.E., et al. (2009). Extended follow-up and spatial analysis of the American Cancer Society study linking particulate air pollution and mortality. *Res. Rep. Health Eff. Inst.* *5*-114; discussion 115-136.
- Krishnan, R.M., Adar, S.D., Szpiro, A.A., Jorgensen, N.W., Van Hee, V.C., Barr, R.G., O'Neill, M.S., Herrington, D.M., Polak, J.F., and Kaufman, J.D. (2012). Vascular responses to long- and short-term exposure to fine particulate matter: MESA Air (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis and Air Pollution). *J. Am. Coll. Cardiol.* *60*, 2158–2166.
- Kumaran, R.S., Choi, Y.-K., Kim, H.J., and Kim, K.J. (2014). Quantitation of oxidative stress gene expression in MCF-7 human cell lines treated with water-dispersible CuO nanoparticles. *Appl. Biochem. Biotechnol.* *173*, 731–740.
- Laden, F., Schwartz, J., Speizer, F.E., and Dockery, D.W. (2006). Reduction in fine particulate air pollution and mortality: Extended follow-up of the Harvard Six Cities study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *173*, 667–672.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2002). Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr. Biol. CB* *12*, 735–739.
- Lai, N.-S., Yu, H.-C., Chen, H.-C., Yu, C.-L., Huang, H.-B., and Lu, M.-C. (2013). Aberrant expression of microRNAs in T cells from patients with ankylosing spondylitis contributes to the immunopathogenesis. *Clin. Exp. Immunol.* *173*, 47–57.

Références bibliographiques

- Landkocz, Y., Ledoux, F., André, V., Cazier, F., Genevray, P., Dewaele, D., Martin, P.J., Lepers, C., Verdin, A., Courcot, L., et al. (2017). Fine and ultrafine atmospheric particulate matter at a multi-influenced urban site: Physicochemical characterization, mutagenicity and cytotoxicity. *Environ. Pollut. Complete*, 130–140.
- Larrieu, S., Jusot, J.-F., Blanchard, M., Prouvost, H., Declercq, C., Fabre, P., Pascal, L., Le Tertre, A., Wagner, V., and riviére, S. (2007). Short term effects of air pollution on hospitalizations for cardiovascular diseases in eight French cities: the PSAS program. - PubMed - NCBI.
- Lecuyer, I., Peter, H., Ungar, A., and Karl, U. (2004). Émissions atmosphériques de métaux lourds par les centrales à charbon : estimations et incertitudes.
- Ledderose, C., Heyn, J., Limbeck, E., and Kreth, S. (2011). Selection of reliable reference genes for quantitative real-time PCR in human T cells and neutrophils. *BMC Res. Notes* 4, 427.
- Ledoux, F., Kfoury, A., Delmaire, G., Roussel, G., El Zein, A., and Courcot, D. (2017). Contributions of local and regional anthropogenic sources of metals in PM_{2.5} at an urban site in northern France. *Chemosphere* 181, 713–724.
- Lee, J.-T., Son, J.-Y., and Cho, Y.-S. (2007). The adverse effects of fine particle air pollution on respiratory function in the elderly. *Sci. Total Environ.* 385, 28–36.
- Lenaz, G., Baracca, A., Fato, R., Genova, M.L., and Solaini, G. (2006). New insights into structure and function of mitochondria and their role in aging and disease. *Antioxid. Redox Signal.* 8, 417–437.
- Leonardi, G.S., Houthuijs, D., Steerenberg, P.A., Fletcher, T., Armstrong, B., Antova, T., Lochman, I., Lochmanová, A., Rudnai, P., Erdei, E., et al. (2000). IMMUNE BIOMARKERS IN RELATION TO EXPOSURE TO PARTICULATE MATTER: A Cross-Sectional Survey in 17 Cities of Central Europe. *Inhal. Toxicol.* 12, 1–14.
- Lepers, C., Dergham, M., Armand, L., Billet, S., Verdin, A., Andre, V., Pottier, D., Courcot, D., Shirali, P., and Sichel, F. (2014). Mutagenicity and clastogenicity of native airborne particulate matter samples collected under industrial, urban or rural influence. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* 28, 866–874.
- Lepeule, J., Laden, F., Dockery, D., and Schwartz, J. (2012). Chronic exposure to fine particles and mortality: an extended follow-up of the Harvard Six Cities study from 1974 to 2009. *Environ. Health Perspect.* 120, 965–970.
- Leung, L.Y., Chan, C.P.Y., Leung, Y.K., Jiang, H.L., Abrigo, J.M., Wang, D.F., Chung, J.S.H., Rainer, T.H., and Graham, C.A. (2014). Comparison of miR-124-3p and miR-16 for early diagnosis of hemorrhagic and ischemic stroke. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 433, 139–144.
- Lewin, A., Buteau, S., Brand, A., Kosatsky, T., and Smargiassi, A. (2013). Short-term risk of hospitalization for asthma or bronchiolitis in children living near an aluminum smelter. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 23, 474–480.
- Li, Y., and Kurlander, R.J. (2010). Comparison of anti-CD3 and anti-CD28-coated beads with soluble anti-CD3 for expanding human T cells: Differing impact on CD8 T cell phenotype and responsiveness to restimulation. *J. Transl. Med.* 8, 104.
- Li, A., Yu, J., Kim, H., Wolfgang, C.L., Canto, M.I., Hruban, R.H., and Goggins, M. (2013). MicroRNA array analysis finds elevated serum miR-1290 accurately distinguishes patients with low-stage pancreatic cancer from healthy and disease controls. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 19, 3600–3610.
- Li, M., He, X.-Y., Zhang, Z.-M., Li, S., Ren, L.-H., Cao, R.-S., Feng, Y.-D., Ji, Y.-L., Zhao, Y., and Shi, R.-H. (2015a). MicroRNA-1290 promotes esophageal squamous cell carcinoma cell proliferation and metastasis. *World J. Gastroenterol.* 21, 3245–3255.
- Li, P., Spolski, R., Liao, W., and Leonard, W.J. (2014a). Complex interactions of transcription factors in mediating cytokine biology in T cells. *Immunol. Rev.* 261, 141–156.
- Li, W., Wu, Y.-F., Xu, R.-H., Lu, H., Hu, C., and Qian, H. (2014b). miR-1246 releases RTKN2-dependent resistance to UVB-induced apoptosis in HaCaT cells. *Mol. Cell. Biochem.* 394, 299–306.
- Li, X., Huang, S., Jiao, A., Yang, X., Yun, J., Wang, Y., Xue, X., Chu, Y., Liu, F., Liu, Y., et al. (2017). Association between ambient fine particulate matter and preterm birth or term low birth weight: An updated systematic review and meta-analysis. *Environ. Pollut. Barking Essex 1987*.
- Li, Y., Liu, S., Zhang, F., Jiang, P., Wu, X., and Liang, Y. (2015b). Expression of the microRNAs hsa-miR-15a and hsa-miR-16-1 in lens epithelial cells of patients with age-related cataract. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 8, 2405–2410.

Références bibliographiques

- Liamin, M., Boutet-Robinet, E., Jamin, E.L., Fernier, M., Khoury, L., Kopp, B., Le Ferrec, E., Vignard, J., Audebert, M., and Sparfel, L. (2017). Benzo[a]pyrene-induced DNA damage associated with mutagenesis in primary human activated T lymphocytes. *Biochem. Pharmacol.*
- Liang, X., Zeng, J., Wang, L., Fang, M., Wang, Q., Zhao, M., Xu, X., Liu, Z., Li, W., Liu, S., et al. (2013). Histone demethylase retinoblastoma binding protein 2 is overexpressed in hepatocellular carcinoma and negatively regulated by hsa-miR-212. *PloS One* 8, e69784.
- Liao, L., Wang, J., Ouyang, S., Zhang, P., Wang, J., and Zhang, M. (2015). Expression and clinical significance of microRNA-1246 in human oral squamous cell carcinoma. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* 21, 776–781.
- Lim, H., Kwon, H.-J., Lim, J.-A., Choi, J.H., Ha, M., Hwang, S.-S., and Choi, W.-J. (2016). Short-term Effect of Fine Particulate Matter on Children's Hospital Admissions and Emergency Department Visits for Asthma: A Systematic Review and Meta-analysis. *J. Prev. Med. Public Health Yebang Uihakhoe Chi* 49, 205–219.
- Lin, M., Shi, C., Lin, X., Pan, J., Shen, S., Xu, Z., and Chen, Q. (2016). sMicroRNA-1290 inhibits cells proliferation and migration by targeting FOXA1 in gastric cancer cells. *Gene* 582, 137–142.
- Linton, P.J., and Dorshkind, K. (2004). Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nat. Immunol.* 5, 133–139.
- Lio, D., Balistreri, C.R., Candore, G., D'Anna, C., Di Lorenzo, G., Gervasi, F., Listi, F., Scola, L., and Caruso, C. (2000). In vitro treatment with interleukin-2 normalizes type-1 cytokine production by lymphocytes from elderly. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 22, 195–203.
- Lipsett, M.J., Ostro, B.D., Reynolds, P., Goldberg, D., Hertz, A., Jerrett, M., Smith, D.F., Garcia, C., Chang, E.T., and Bernstein, L. (2011). Long-term exposure to air pollution and cardiorespiratory disease in the California teachers study cohort. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 184, 828–835.
- Liu, J., Han, Y., Tang, X., Zhu, J., and Zhu, T. (2016). Estimating adult mortality attributable to PM_{2.5} exposure in China with assimilated PM_{2.5} concentrations based on a ground monitoring network. *Sci. Total Environ.* 568, 1253–1262.
- Liu, Y., Huang, X., Timani, K.A., Broxmeyer, H.E., and He, J.J. (2015). MicroRNA-124 Targets Tip110 Expression and Regulates Hematopoiesis. *Stem Cells Dev.* 24, 2009–2017.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif* 25, 402–408.
- Lombaert, N., Castrucci, E., Decordier, I., Van Hummelen, P., Kirsch-Volders, M., Cundari, E., and Lison, D. (2013). Hard-metal (WC-Co) particles trigger a signaling cascade involving p38 MAPK, HIF-1 α , HMOX1, and p53 activation in human PBMC. *Arch. Toxicol.* 87, 259–268.
- Longhin, E., Holme, J.A., Gutzkow, K.B., Arlt, V.M., Kucab, J.E., Camatini, M., and Gualtieri, M. (2013). Cell cycle alterations induced by urban PM_{2.5} in bronchial epithelial cells: characterization of the process and possible mechanisms involved. *Part. Fibre Toxicol.* 10, 63.
- Longhin, E., Capasso, L., Battaglia, C., Proverbio, M.C., Cosentino, C., Cifola, I., Mangano, E., Camatini, M., and Gualtieri, M. (2016). Integrative transcriptomic and protein analysis of human bronchial BEAS-2B exposed to seasonal urban particulate matter. *Environ. Pollut. Barking Essex* 1987 209, 87–98.
- Loomis, D., Grosse, Y., Lauby-Secretan, B., El Ghissassi, F., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Baan, R., Mattock, H., Straif, K., et al. (2013). The carcinogenicity of outdoor air pollution. *Lancet Oncol.* 14, 1262–1263.
- López-Otín, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., and Kroemer, G. (2013). The Hallmarks of Aging. *Cell* 153, 1194–1217.
- Lu, M.-C., Yu, C.-L., Chen, H.-C., Yu, H.-C., Huang, H.-B., and Lai, N.-S. (2014). Increased miR-223 expression in T cells from patients with rheumatoid arthritis leads to decreased insulin-like growth factor-1-mediated interleukin-10 production. *Clin. Exp. Immunol.* 177, 641–651.
- Machemer, S.D. (2004). Characterization of airborne and bulk particulate from iron and steel manufacturing facilities. *Environ. Sci. Technol.* 38, 381–389.

Références bibliographiques

- Maciejczyk, P., Zhong, M., Lippmann, M., and Chen, L.-C. (2010). Oxidant generation capacity of source-apportioned PM_{2.5}. *Inhal. Toxicol.* 22, 29–36.
- MacIntyre, E.A., Karr, C.J., Koehoorn, M., Demers, P.A., Tamburic, L., Lencar, C., and Brauer, M. (2011). Residential air pollution and otitis media during the first two years of life. *Epidemiol. Camb. Mass* 22, 81–89.
- Mallone, S., Stafoggia, M., Faustini, A., Gobbi, G.P., Marconi, A., and Forastiere, F. (2011). Saharan dust and associations between particulate matter and daily mortality in Rome, Italy. *Environ. Health Perspect.* 119, 1409–1414.
- Mandal, P.K. (2005). Dioxin: a review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology. *J. Comp. Physiol. [B]* 175, 221–230.
- Mane, V.P., Heuer, M.A., Hillyer, P., Navarro, M.B., and Rabin, R.L. (2008). Systematic Method for Determining an Ideal Housekeeping Gene for Real-Time PCR Analysis. *J. Biomol. Tech. JBT* 19, 342–347.
- Mao, Y., Liu, J., Zhang, D., and Li, B. (2015). MiR-1290 promotes cancer progression by targeting nuclear factor I/X(NFIX) in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* 76, 82–93.
- Marchand, A., Barouki, R., and Garlatti, M. (2004). Regulation of NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase 1 Gene Expression by CYP1A1 Activity. *Mol. Pharmacol.* 65, 1029–1037.
- Mazzei, F., D'Alessandro, A., Lucarelli, F., Nava, S., Prati, P., Valli, G., and Vecchi, R. (2008). Characterization of particulate matter sources in an urban environment. *Sci. Total Environ.* 401, 81–89.
- McElhaney, J.E., Xie, D., Hager, W.D., Barry, M.B., Wang, Y., Kleppinger, A., Ewen, C., Kane, K.P., and Bleackley, R.C. (2006). T cell responses are better correlates of vaccine protection in the elderly. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 176, 6333–6339.
- McNerlan, S., Armstrong, M., Ross, O.A., and Maeve Rea, I. (2009). Handbook on Immunosenescence - basic understanding and clinical - Cytokine Expression and Production Changes in Very Old Age (Springer Science).
- MEDDE (2010). Décret n° 2010-1250 du 21 octobre 2010 relatif à la qualité de l'air.
- MEDDE (2017). Base des Installations Classées.
- Medina-Ramón, M., Zanobetti, A., and Schwartz, J. (2006). The effect of ozone and PM₁₀ on hospital admissions for pneumonia and chronic obstructive pulmonary disease: a national multicity study. *Am. J. Epidemiol.* 163, 579–588.
- Meister, K., Johansson, C., and Forsberg, B. (2012). Estimated Short-Term Effects of Coarse Particles on Daily Mortality in Stockholm, Sweden. *Environ. Health Perspect.* 120, 431–436.
- Mescher, A. (2009). Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, 12th Edition : Text and Atlas: Text and Atlas (McGraw Hill Professional).
- Miao, L., and St. Clair, D.K. (2009). Regulation of Superoxide Dismutase Genes: Implications in Diseases. *Free Radic. Biol. Med.* 47, 344–356.
- Miao, W., Hu, L., Scrivens, P.J., and Batist, G. (2005). Transcriptional regulation of NF-E2 p45-related factor (NRF2) expression by the aryl hydrocarbon receptor-xenobiotic response element signaling pathway: direct cross-talk between phase I and II drug-metabolizing enzymes. *J. Biol. Chem.* 280, 20340–20348.
- Miller, K.A., Siscovick, D.S., Sheppard, L., Shepherd, K., Sullivan, J.H., Anderson, G.L., and Kaufman, J.D. (2007). Long-term exposure to air pollution and incidence of cardiovascular events in women. *N. Engl. J. Med.* 356, 447–458.
- Milner, J.D., Fazilleau, N., McHeyzer-Williams, M., and Paul, W. (2010). Cutting edge: lack of high affinity competition for peptide in polyclonal CD4+ responses unmasks IL-4 production. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 184, 6569–6573.
- Minty, A., Asselin, S., Bensussan, A., Shire, D., Vita, N., Vyakarnam, A., Wijdenes, J., Ferrara, P., and Caput, D. (1997). The related cytokines interleukin-13 and interleukin-4 are distinguished by differential production and differential effects on T lymphocytes. *Eur. Cytokine Netw.* 8, 203–213.
- Mo, D., Gu, B., Gong, X., Wu, L., Wang, H., Jiang, Y., Zhang, B., Zhang, M., Zhang, Y., Xu, J., et al. (2015). miR-1290 is a potential prognostic biomarker in non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Dis.* 7, 1570–1579.

Références bibliographiques

- Mondal, N.K., Mukherjee, B., Das, D., and Ray, M.R. (2010). Micronucleus formation, DNA damage and repair in premenopausal women chronically exposed to high level of indoor air pollution from biomass fuel use in rural India. *Mutat. Res.* 697, 47–54.
- Monticelli, S. (2013). MicroRNAs in T helper cell differentiation and plasticity. *Semin. Immunol.* 25, 291–298.
- Mordukhovich, I., Coull, B., Kloog, I., Koutrakis, P., Vokonas, P., and Schwartz, J. (2015). Exposure to sub-chronic and long-term particulate air pollution and heart rate variability in an elderly cohort: the Normative Aging Study. *Environ. Health Glob. Access Sci. Source* 14, 87.
- Moreno, T., Querol, X., Alastuey, A., Viana, M., Salvador, P., Sánchez de la Campa, A., Artiñano, B., de la Rosa, J., and Gibbons, W. (2006). Variations in atmospheric PM trace metal content in Spanish towns: Illustrating the chemical complexity of the inorganic urban aerosol cocktail. *Atmos. Environ.* 40, 6791–6803.
- Mori, I., Nishikawa, M., and Iwasaka, Y. (1998). Chemical reaction during the coagulation of ammonium sulphate and mineral particles in the atmosphere. *Sci. Total Environ.* 224, 87–91.
- Morris, R. (2001). Airborne particulates and hospital admissions for cardiovascular disease: a quantitative review of the evidence. *109*, 495–500.
- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., and Coffman, R.L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol. Baltim. Md* 136, 2348–2357.
- Motamedi, M., Xu, L., and Elahi, S. (2016). Correlation of transferrin receptor (CD71) with Ki67 expression on stimulated human and mouse T cells: The kinetics of expression of T cell activation markers. *J. Immunol. Methods* 437, 43–52.
- Motta, V., Favero, C., Dioni, L., Iodice, S., Battaglia, C., Angelici, L., Vigna, L., Pesatori, A.C., and Bollati, V. (2016). MicroRNAs are associated with blood-pressure effects of exposure to particulate matter: Results from a mediated moderation analysis. *Environ. Res.* 146, 274–281.
- Murasko, D.M., Bernstein, E.D., Gardner, E.M., Gross, P., Munk, G., Dran, S., and Abrutyn, E. (2002). Role of humoral and cell-mediated immunity in protection from influenza disease after immunization of healthy elderly. *Exp. Gerontol.* 37, 427–439.
- Murphy, K. (2011). *Janeway's Immunobiology* (Garland Science).
- Mustafic, H., Jabre, P., Caussin, C., Murad, M.H., Escolano, S., Tafflet, M., Périer, M.-C., Marijon, E., Vernerey, D., Empana, J.-P., et al. (2012). Main air pollutants and myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 307, 713–721.
- Nagalingam, R.S., Sundaresan, N.R., Gupta, M.P., Geenen, D.L., Solaro, R.J., and Gupta, M. (2013). A cardiac-enriched microRNA, miR-378, blocks cardiac hypertrophy by targeting Ras signaling. *J. Biol. Chem.* 288, 11216–11232.
- Nature Education (2014). general transcription factor / transcription factor.
- Nemery, B., Hoet, P.H., and Nemmar, A. (2001). The Meuse Valley fog of 1930: an air pollution disaster. *The Lancet* 357, 704–708.
- Nguyen, N.T., Hanieh, H., Nakahama, T., and Kishimoto, T. (2013). The roles of aryl hydrocarbon receptor in immune responses. *Int. Immunol.* 25, 335–343.
- Nijhuis, E.W., Remarque, E.J., Hinloopen, B., Van der Pouw-Kraan, T., Van Lier, R.A., Ligthart, G.J., and Nagelkerken, L. (1994). Age-related increase in the fraction of CD27-CD4+ T cells and IL-4 production as a feature of CD4+ T cell differentiation in vivo. *Clin. Exp. Immunol.* 96, 528–534.
- Noren Hooten, N., Abdelmohsen, K., Gorospe, M., Ejiogu, N., Zonderman, A.B., and Evans, M.K. (2010). microRNA expression patterns reveal differential expression of target genes with age. *PLoS One* 5, e10724.
- O'Connell, R.M., Rao, D.S., and Baltimore, D. (2012). microRNA Regulation of Inflammatory Responses.
- Oh, J.-H., Son, M.-Y., Choi, M.-S., Kim, S., Choi, A.-Y., Lee, H.-A., Kim, K.-S., Kim, J., Song, C.W., and Yoon, S. (2016). Integrative analysis of genes and miRNA alterations in human embryonic stem cells-derived neural cells after exposure to silver nanoparticles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 299, 8–23.

Références bibliographiques

Olson, N.C., Sallam, R., Doyle, M.F., Tracy, R.P., and Huber, S.A. (2013). T helper cell polarization in healthy people: implications for cardiovascular disease. *J Cardiovasc. Transl. Res.* 6, 772–786.

OMS (2012). Décès lié à la pollution extérieur 2012.

Oraviskärvi, K., Timonen, K.L., Wiikinkoski, T., Ruuskanen, A.R., Heinänen, K., and Ruuskanen, J. (2003). Source contributions to PM_{2.5} particles in the urban air of a town situated close to a steel works. *Atmos. Environ.* 37, 1013–1022.

Ostro, B., Broadwin, R., Green, S., Feng, W.-Y., and Lipsett, M. (2006). Fine particulate air pollution and mortality in nine California counties: results from CALFINE. *Environ. Health Perspect.* 114, 29–33.

Ostro, B., Lipsett, M., Reynolds, P., Goldberg, D., Hertz, A., Garcia, C., Henderson, K.D., and Bernstein, L. (2010). Long-term exposure to constituents of fine particulate air pollution and mortality: results from the California Teachers Study. *Environ. Health Perspect.* 118, 363–369.

Ostro, B., Hu, J., Goldberg, D., Reynolds, P., Hertz, A., Bernstein, L., and Kleeman, M.J. (2015). Associations of mortality with long-term exposures to fine and ultrafine particles, species and sources: results from the California Teachers Study Cohort. *Environ. Health Perspect.* 123, 549–556.

Øvrevik, J., Arlt, V.M., Øya, E., Nagy, E., Møllerup, S., Phillips, D.H., Låg, M., and Holme, J.A. (2010). Differential effects of nitro-PAHs and amino-PAHs on cytokine and chemokine responses in human bronchial epithelial BEAS-2B cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 242, 270–280.

Oya, E., Øvrevik, J., Arlt, V.M., Nagy, E., Phillips, D.H., and Holme, J.A. (2011). DNA damage and DNA damage response in human bronchial epithelial BEAS-2B cells following exposure to 2-nitrobenzanthrone and 3-nitrobenzanthrone: role in apoptosis. *Mutagenesis* 26, 697–708.

de P Pablo-Romero, M., Román, R., Limón, J.M.G., and Praena-Crespo, M. (2015). Effects of fine particles on children's hospital admissions for respiratory health in Seville, Spain. *J. Air Waste Manag. Assoc.* 1995 65, 436–444.

Paganelli, R., Scala, E., Quinti, I., and Ansotegui, I.J. (1994). Humoral immunity in aging. *Aging Milan Italy* 6, 143–150.

Paganelli, R., Scala, E., Rosso, R., Cossarizza, A., Bertollo, L., Barbieri, D., Fabrizi, A., Lusi, E.A., Fagiolo, U., and Franceschi, C. (1996). A shift to Th0 cytokine production by CD4⁺ cells in human longevity: studies on two healthy centenarians. *Eur. J. Immunol.* 26, 2030–2034.

Palli, D., Saieva, C., Munnia, A., Peluso, M., Grechi, D., Zanna, I., Caini, S., Decarli, A., Sera, F., and Masala, G. (2008). DNA adducts and PM₁₀ exposure in traffic-exposed workers and urban residents from the EPIC-Florence City study. *Sci. Total Environ.* 403, 105–112.

van Panhuys, N. (2016). TCR Signal Strength Alters T–DC Activation and Interaction Times and Directs the Outcome of Differentiation. *Front. Immunol.* 7.

van Panhuys, N., Klauschen, F., and Germain, R.N. (2014). T-cell-receptor-dependent signal intensity dominantly controls CD4⁺ T cell polarization In Vivo. *Immunity* 41, 63–74.

Park, E.-J., Roh, J., Kim, Y., Park, K., Kim, D.-S., and Yu, S.-D. (2011). PM 2.5 collected in a residential area induced Th1-type inflammatory responses with oxidative stress in mice. *Environ. Res.* 111, 348–355.

Park, J., Kang, S.I., Lee, S.-Y., Zhang, X.F., Kim, M.S., Beers, L.F., Lim, D.-S., Avruch, J., Kim, H.-S., and Lee, S.B. (2010). Tumor Suppressor Ras Association Domain Family 5 (RASSF5/NORE1) Mediates Death Receptor Ligand-induced Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 285, 35029–35038.

Peglion, F. (2012). Mécanismes moléculaires responsables des propriétés migratoires des gliomes [Texte imprimé] : rôle et dynamique des jonctions adhérentes dans la migration des astrocytes sains et tumoraux. phdthesis. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI.

Pellegrini, K.L., Gerlach, C.V., Craciun, F.L., Ramachandran, K., Bijol, V., Kissick, H.T., and Vaidya, V.S. (2016). Application of small RNA sequencing to identify microRNAs in acute kidney injury and fibrosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 312, 42–52.

Peltier, H.J., and Latham, G.J. (2008). Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA N. Y. N* 14, 844–852.

Références bibliographiques

- Peluso, M., Ceppi, M., Munnia, A., Puntoni, R., and Parodi, S. (2001). Analysis of 13 ³²P-DNA Postlabeling Studies on Occupational Cohorts Exposed to Air Pollution. *Am. J. Epidemiol.* *153*, 546–558.
- Pennock, N.D., White, J.T., Cross, E.W., Cheney, E.E., Tamburini, B.A., and Kedl, R.M. (2013). T cell responses: naïve to memory and everything in between. *Adv. Physiol. Educ.* *37*, 273–283.
- Pereira, G., Bracken, M.B., and Bell, M.L. (2016). Particulate air pollution, fetal growth and gestational length: The influence of residential mobility in pregnancy. *Environ. Res.* *147*, 269–274.
- Peterson-Roth, E., Reynolds, M., Quievryn, G., and Zhitkovich, A. (2005). Mismatch repair proteins are activators of toxic responses to chromium-DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 3596–3607.
- Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C., and Neuvians, T.P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.* *26*, 509–515.
- Pfeiffer, C., Stein, J., Southwood, S., Ketelaar, H., Sette, A., and Bottomly, K. (1995). Altered peptide ligands can control CD4 T lymphocyte differentiation in vivo. *J. Exp. Med.* *181*, 1569–1574.
- Pietschmann, P., Gollob, E., Brosch, S., Hahn, P., Kudlacek, S., Willheim, M., Woloszczuk, W., Peterlik, M., and Tragl, K.H. (2003). The effect of age and gender on cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells and markers of bone metabolism. *Exp. Gerontol.* *38*, 1119–1127.
- Pinault, L., Tjepkema, M., Crouse, D.L., Weichenthal, S., van Donkelaar, A., Martin, R.V., Brauer, M., Chen, H., and Burnett, R.T. (2016). Risk estimates of mortality attributed to low concentrations of ambient fine particulate matter in the Canadian community health survey cohort. *Environ. Health Glob. Access Sci. Source* *15*, 18.
- Piret, J.-P., Jacques, D., Audinot, J.-N., Mejia, J., Boilan, E., Noël, F., Fransolet, M., Demazy, C., Lucas, S., Saout, C., et al. (2012). Copper(II) oxide nanoparticles penetrate into HepG2 cells, exert cytotoxicity via oxidative stress and induce pro-inflammatory response. *Nanoscale* *4*, 7168–7184.
- Plé, C., Fan, Y., Ait Yahia, S., Vorng, H., Everaere, L., Chenivesse, C., Balsamelli, J., Azzaoui, I., de Nadai, P., Wallaert, B., et al. (2015). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Reciprocally Regulate IL-22 and IL-17 Cytokines in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Both Healthy and Asthmatic Subjects. *PLoS ONE* *10*.
- Pope, C.A., and Dockery, D.W. (2006). Health effects of fine particulate air pollution: lines that connect. *J. Air Waste Manag. Assoc.* *1995* *56*, 709–742.
- Pope, C.A., Burnett, R.T., Thun, M.J., Calle, E.E., Krewski, D., Ito, K., and Thurston, G.D. (2002). Lung Cancer, Cardiopulmonary Mortality, and Long-term Exposure to Fine Particulate Air Pollution. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* *287*, 1132–1141.
- Pope, C.A., Hansen, M.L., Long, R.W., Nielsen, K.R., Eatough, N.L., Wilson, W.E., and Eatough, D.J. (2004). Ambient particulate air pollution, heart rate variability, and blood markers of inflammation in a panel of elderly subjects. *Environ. Health Perspect.* *112*, 339–345.
- Pope, C.A., Renlund, D.G., Kfoury, A.G., May, H.T., and Horne, B.D. (2008). Relation of heart failure hospitalization to exposure to fine particulate air pollution. *Am. J. Cardiol.* *102*, 1230–1234.
- Pope, C.A., Ezzati, M., and Dockery, D.W. (2009). Fine Particulate Air Pollution and US County Life Expectancies. *N. Engl. J. Med.* *360*, 376–386.
- Prasad, K.N. (2017). Oxidative stress and pro-inflammatory cytokines may act as one of the signals for regulating microRNAs expression in Alzheimer's disease. *Mech. Ageing Dev.* *162*, 63–71.
- Prigent, L., Robineau, M., Jouneau, S., Morzadec, C., Louarn, L., Vernhet, L., Fardel, O., and Sparfel, L. (2014). The aryl hydrocarbon receptor is functionally upregulated early in the course of human T-cell activation. *Eur. J. Immunol.* *44*, 1330–1340.
- Puett, R.C., Hart, J.E., Yanosky, J.D., Paciorek, C., Schwartz, J., Suh, H., Speizer, F.E., and Laden, F. (2009). Chronic fine and coarse particulate exposure, mortality, and coronary heart disease in the Nurses' Health Study. *Environ. Health Perspect.* *117*, 1697–1701.

Références bibliographiques

- Pun, V.C., Kazemiparkouhi, F., Manjourides, J., and Suh, H.H. (2017). Long-Term PM_{2.5} Exposures and Respiratory, Cancer and Cardiovascular Mortality in American Older Adults. *Am. J. Epidemiol.*
- Purvis, H.A., Stoop, J.N., Mann, J., Woods, S., Kozijn, A.E., Hambleton, S., Robinson, J.H., Isaacs, J.D., Anderson, A.E., and Hilken, C.M.U. (2010). Low-strength T-cell activation promotes Th17 responses. *Blood* 116, 4829–4837.
- Qian, Z., He, Q., Lin, H.-M., Kong, L., Zhou, D., Liang, S., Zhu, Z., Liao, D., Liu, W., Bentley, C.M., et al. (2010). Part 2. Association of daily mortality with ambient air pollution, and effect modification by extremely high temperature in Wuhan, China. *Res. Rep. Health Eff. Inst.* 91–217.
- Qin, Z., Wang, P.-Y., Su, D.-F., and Liu, X. (2016). miRNA-124 in Immune System and Immune Disorders. *Front. Immunol.* 7.
- Qiu, H., Yu, I., Tian, L., Wang, X., Tse, L., Tam, W., and Wong, T. (2012). Effects of coarse particulate matter on emergency hospital admissions for respiratory diseases: a time-series analysis in Hong Kong. 572.
- Querol, X., Alastuey, A., Lopez-Soler, A., Mantilla, E., and Plana, F. (1996). Mineral composition of atmospheric particulates around a large coal-fired power station. *Atmos. Environ.* 30, 3557–3572.
- Raaschou-Nielsen, O., Andersen, Z.J., Beelen, R., Samoli, E., Stafoggia, M., Weinmayr, G., Hoffmann, B., Fischer, P., Nieuwenhuijsen, M.J., Brunekreef, B., et al. (2013). Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). *Lancet Oncol.* 14, 813–822.
- Rampazzo, G., Masiol, M., Visin, F., Rampado, E., and Pavoni, B. (2008). Geochemical characterization of PM₁₀ emitted by glass factories in Murano, Venice (Italy). *Chemosphere* 71, 2068–2075.
- Ravindra, null, Mittal, A.K., and Van Grieken, R. (2001). Health risk assessment of urban suspended particulate matter with special reference to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. *Rev. Environ. Health* 16, 169–189.
- Ravindra, K., Sokhi, R., and Van Grieken, R. (2008). Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation. *Atmos. Environ.* 42, 2895–2921.
- Redon, C.E., Dickey, J.S., Bonner, W.M., and Sedelnikova, O.A. (2009). γ -H2AX as a biomarker of DNA damage induced by ionizing radiation in human peripheral blood lymphocytes and artificial skin. *Adv. Space Res. Off. J. Comm. Space Res. COSPAR* 43, 1171–1178.
- Ren, Y., Li, X., Wang, W., He, W., Wang, J., and Wang, Y. (2017). Expression of Peripheral Blood miRNA-720 and miRNA-1246 Can Be Used as a Predictor for Outcome in Multiple Myeloma Patients. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* 17, 415–423.
- Renard, J.J., Calidonna, S.E., and Henley, M.V. (2004). Fate of ammonia in the atmosphere—a review for applicability to hazardous releases. *J. Hazard. Mater.* 108, 29–60.
- Rider, C.F., Yamamoto, M., Günther, O.P., Hirota, J.A., Singh, A., Tebbutt, S.J., and Carlsten, C. (2016). Controlled diesel exhaust and allergen coexposure modulates microRNA and gene expression in humans: Effects on inflammatory lung markers. *J. Allergy Clin. Immunol.* 138, 1690–1700.
- Rink, L., Cakman, I., and Kirchner, H. (1998a). Altered cytokine production in the elderly. *Mech. Ageing Dev.* 102, 199–209.
- Rink, L., Cakman, I., and Kirchner, H. (1998b). Altered cytokine production in the elderly. *Mech. Ageing Dev.* 102, 199–209.
- Rivera, S.P., Saarikoski, S.T., and Hankinson, O. (2002). Identification of a novel dioxin-inducible cytochrome P450. *Mol. Pharmacol.* 61, 255–259.
- RNSA (2011). Changement climatique, moisissures aéroportées et risques sanitaires associés.
- Roche, C. (2016). Etude des concentrations et de la composition des PM₁₀ sur le littoral du nord de la France – Evaluation des contributions maritimes de l’espace Manche-Mer du Nord.
- Romieu, I., Gouveia, N., Cifuentes, L.A., de Leon, A.P., Junger, W., Vera, J., Strappa, V., Hurtado-Díaz, M., Miranda-Soberanis, V., Rojas-Bracho, L., et al. (2012). Multicity study of air pollution and mortality in Latin America (the ESCALA study). *Res. Rep. Health Eff. Inst.* 5–86.
- de Ronde, M.W.J., Kok, M.G.M., Moerland, P.D., Van den Bossche, J., Neele, A.E., Halliani, A., van der Made, I., de Winther, M.P.J., Meijers, J.C.M., Creemers, E.E., et al. (2017). High miR-124-3p expression identifies smoking individuals susceptible to atherosclerosis. *Atherosclerosis* 263, 377–384.

Références bibliographiques

- Rossi, R.L., Rossetti, G., Wenandy, L., Curti, S., Ripamonti, A., Bonnal, R.J.P., Birolo, R.S., Moro, M., Crosti, M.C., Gruarin, P., et al. (2011). Distinct microRNA signatures in human lymphocyte subsets and enforcement of the naive state in CD4+ T cells by the microRNA miR-125b. *Nat. Immunol.* **12**, 796–803.
- Rushmore, T.H., and Kong, A.-N.T. (2002). Pharmacogenomics, regulation and signaling pathways of phase I and II drug metabolizing enzymes. *Curr. Drug Metab.* **3**, 481–490.
- Rylander, T., Neve, E.P.A., Ingelman-Sundberg, M., and Oscarson, M. (2001). Identification and Tissue Distribution of the Novel Human Cytochrome P450 2S1 (CYP2S1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **281**, 529–535.
- Ryter, S.W., Alam, J., and Choi, A.M.K. (2006). Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol. Rev.* **86**, 583–650.
- Saarikoski, S.T., Rivera, S.P., Hankinson, O., and Husgafvel-Pursiainen, K. (2005). CYP2S1: A short review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **207**, 62–69.
- Sánchez-Pérez, Y., Chirino, Y.I., Osornio-Vargas, A.R., Morales-Bárceñas, R., Gutiérrez-Ruiz, C., Vázquez-López, I., and García-Cuellar, C.M. (2009). DNA damage response of A549 cells treated with particulate matter (PM10) of urban air pollutants. *Cancer Lett.* **278**, 192–200.
- Sandmand, M., Bruunsgaard, H., Kemp, K., Andersen-Ranberg, K., Pedersen, A.N., Skinhøj, P., and Pedersen, B. (2002). Is ageing associated with a shift in the balance between Type 1 and Type 2 cytokines in humans? *Clin. Exp. Immunol.* **127**, 107–114.
- Sansoni, P., Vescovini, R., Fagnoni, F., Biasini, C., Zanni, F., Zanlari, L., Telera, A., Lucchini, G., Passeri, G., Monti, D., et al. (2008). The immune system in extreme longevity. *Exp. Gerontol.* **43**, 61–65.
- Santacatalina, M., Reche, C., Minguillón, M.C., Escrig, A., Sanfelix, V., Carratalá, A., Nicolás, J.F., Yubero, E., Crespo, J., Alastuey, A., et al. (2010). Impact of fugitive emissions in ambient PM levels and composition: a case study in Southeast Spain. *Sci. Total Environ.* **408**, 4999–5009.
- Satyanarayana, A., and Kaldis, P. (2009). A dual role of Cdk2 in DNA damage response. *Cell Div.* **4**, 9.
- Saunders, V., Breyse, P., Clark, J., Sproles, A., Davila, M., and Wills-Karp, M. (2010). Particulate Matter–Induced Airway Hyperresponsiveness Is Lymphocyte Dependent. *Environ. Health Perspect.* **118**, 640–646.
- Schieber, M., and Chandel, N.S. (2014). ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Curr. Biol.* **24**, R453–R462.
- Schmidt, J.V., and Bradfield, C.A. (1996). Ah receptor signaling pathways. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12**, 55–89.
- Schmucker, D.L., Woodhouse, K.W., Wang, R.K., Wynne, H., James, O.F., McManus, M., and Kremers, P. (1990). Effects of age and gender on in vitro properties of human liver microsomal monooxygenases. *Clin. Pharmacol. Ther.* **48**, 365–374.
- Schults, M.A., Chiu, R.K., Nagle, P.W., Wilms, L.C., Kleinjans, J.C., van Schooten, F.J., and Godschalk, R.W. (2013). Genetic polymorphisms in catalase and CYP1B1 determine DNA adduct formation by benzo(a)pyrene ex vivo. *Mutagenesis* **28**, 181–185.
- Sedelnikova, O.A., Horikawa, I., Redon, C., Nakamura, A., Zimonjic, D.B., Popescu, N.C., and Bonner, W.M. (2008). Delayed kinetics of DNA double-strand break processing in normal and pathological aging. *Aging Cell* **7**, 89–100.
- Seinfeld, J.H., and Pandis, S.N. (2006). Atmospheric Chemistry and Physics: From Air Pollution to Climate Change.
- Shah, P.S., and Balkhair, T. (2011). Air pollution and birth outcomes: a systematic review. *Environ. Int.* **37**, 498–516.
- Shang, Y., Sun, Z., Cao, J., Wang, X., Zhong, L., Bi, X., Li, H., Liu, W., Zhu, T., and Huang, W. (2013). Systematic review of Chinese studies of short-term exposure to air pollution and daily mortality. *Environ. Int.* **54**, 100–111.
- Shang, Y., Zhou, Q., Wang, T., Jiang, Y., Zhong, Y., Qian, G., Zhu, T., Qiu, X., and An, J. (2017). Airborne nitro-PAHs induce Nrf2/ARE defense system against oxidative stress and promote inflammatory process by activating PI3K/Akt pathway in A549 cells. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* **44**, 66–73.
- Sharkey, T.D., Wiberley, A.E., and Donohue, A.R. (2008). Isoprene Emission from Plants: Why and How. *Ann. Bot.* **101**, 5–18.

Références bibliographiques

- Shi, L., Zanobetti, A., Kloog, I., Coull, B.A., Koutrakis, P., Melly, S.J., and Schwartz, J.D. (2016). Low-Concentration PM_{2.5} and Mortality: Estimating Acute and Chronic Effects in a Population-Based Study. *Environ. Health Perspect.* **124**, 46–52.
- Shrivastava, R., Raza, S., Yadav, A., Kushwaha, P., and Flora, S.J.S. (2014). Effects of sub-acute exposure to TiO₂, ZnO and Al₂O₃ nanoparticles on oxidative stress and histological changes in mouse liver and brain. *Drug Chem. Toxicol.* **37**, 336–347.
- Silverman, R.A., Ito, K., Freese, J., Kaufman, B.J., De Claro, D., Braun, J., and Prezant, D.J. (2010). Association of ambient fine particles with out-of-hospital cardiac arrests in New York City. *Am. J. Epidemiol.* **172**, 917–923.
- Sinal, C.J., Webb, C.D., and Bend, J.R. (1999). Differential in vivo effects of α -naphthoflavone and β -naphthoflavone on CYP1A1 and CYP2E1 in rat liver, lung, heart, and kidney. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **13**, 29–40.
- Sindermann, J., Kruse, A., Frercks, H.-J., Schütz, R.M., and Kirchner, H. (1993). Investigations of the lymphokine system in elderly individuals. *Mech. Ageing Dev.* **70**, 149–159.
- Sivangala, R., and Sumanlatha, G. (2015). Cytokines that Mediate and Regulate Immune Responses.
- Smerkova, K., Hudcova, K., Vlahova, V., Vaculovicova, M., Pekarik, V., Masarik, M., Adam, V., and Kizek, R. (2015). Label-free and amplification-free miR-124 detection in human cells. *Int. J. Oncol.* **46**, 871–877.
- Smets, W., Moretti, S., Denys, S., and Lebeer, S. (2016). Airborne bacteria in the atmosphere: Presence, purpose, and potential. *Atmos. Environ.* **139**, 214–221.
- Smith, G., Wolf, C.R., Deeni, Y.Y., Dawe, R.S., Evans, A.T., Comrie, M.M., Ferguson, J., and Ibbotson, S.H. (2003). Cutaneous expression of cytochrome P450 CYP2S1: individuality in regulation by therapeutic agents for psoriasis and other skin diseases. *Lancet Lond. Engl.* **361**, 1336–1343.
- Sørensen, M., Autrup, H., Hertel, O., Wallin, H., Knudsen, L.E., and Loft, S. (2003). Personal exposure to PM_{2.5} and biomarkers of DNA damage. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* **12**, 191–196.
- Stafoggia, M., Zauli-Sajani, S., Pey, J., Samoli, E., Alessandrini, E., Basagaña, X., Cernigliaro, A., Chiusolo, M., Demaria, M., Díaz, J., et al. (2016). Desert Dust Outbreaks in Southern Europe: Contribution to Daily PM₁₀ Concentrations and Short-Term Associations with Mortality and Hospital Admissions. *Environ. Health Perspect.* **124**, 413–419.
- Strauch, B.M., Niemand, R.K., Winkelbeiner, N.L., and Hartwig, A. (2017). Comparison between micro- and nanosized copper oxide and water soluble copper chloride: interrelationship between intracellular copper concentrations, oxidative stress and DNA damage response in human lung cells. *Part. Fibre Toxicol.* **14**.
- Sturges, W.T., and Harrison, R.M. (1989). Semi-quantitative x-ray diffraction analysis of size fractionated atmospheric particles. *Atmospheric Environ.* **1967** **23**, 1083–1098.
- Sun, J., Wang, S., Zhao, D., Hun, F.H., Weng, L., and Liu, H. (2011). Cytotoxicity, permeability, and inflammation of metal oxide nanoparticles in human cardiac microvascular endothelial cells: cytotoxicity, permeability, and inflammation of metal oxide nanoparticles. *Cell Biol. Toxicol.* **27**, 333–342.
- Sun, Z., Meng, C., Wang, S., Zhou, N., Guan, M., Bai, C., Lu, S., Han, Q., and Zhao, R.C. (2014). MicroRNA-1246 enhances migration and invasion through CADM1 in hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* **14**, 616.
- Tai, P.T., Nishijo, M., Nghi, T.N., Nakagawa, H., Van Luong, H., Anh, T.H., and Nishijo, H. (2016). Effects of Perinatal Dioxin Exposure on Development of Children during the First 3 Years of Life. *J. Pediatr.* **175**, 159–166.e2.
- Tanaka, E., Terada, M., and Misawa, S. (2000). Cytochrome P450 2E1: its clinical and toxicological role. *J. Clin. Pharm. Ther.* **25**, 165–175.
- Thomas, R., Hubbard, A.E., McHale, C.M., Zhang, L., Rappaport, S.M., Lan, Q., Rothman, N., Vermeulen, R., Guyton, K.Z., Jinot, J., et al. (2014). Characterization of changes in gene expression and biochemical pathways at low levels of benzene exposure. *PLoS One* **9**, e91828.
- Thorpe, A., and Harrison, R.M. (2008a). Sources and properties of non-exhaust particulate matter from road traffic: A review. *Sci. Total Environ.* **400**, 270–282.

Références bibliographiques

- Thorpe, A., and Harrison, R.M. (2008b). Sources and properties of non-exhaust particulate matter from road traffic: A review. *Sci. Total Environ.* 400, 270–282.
- Tobías, A., Pérez, L., Díaz, J., Linares, C., Pey, J., Alastruey, A., and Querol, X. (2011). Short-term effects of particulate matter on total mortality during Saharan dust outbreaks: a case-crossover analysis in Madrid (Spain). *Sci. Total Environ.* 412–413, 386–389.
- Todaro, M., Alea, M.P., Di Stefano, A.B., Cammareri, P., Vermeulen, L., Iovino, F., Tripodo, C., Russo, A., Gulotta, G., Medema, J.P., et al. (2007). Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4. *Cell Stem Cell* 1, 389–402.
- Todaro, M., Lombardo, Y., Francipane, M.G., Alea, M.P., Cammareri, P., Iovino, F., Di Stefano, A.B., Di Bernardo, C., Agrusa, A., Condorelli, G., et al. (2008). Apoptosis resistance in epithelial tumors is mediated by tumor-cell-derived interleukin-4. *Cell Death Differ.* 15, 762–772.
- Torii, K., Saito, C., Furuhashi, T., Nishioka, A., Shintani, Y., Kawashima, K., Kato, H., and Morita, A. (2011). Tobacco smoke is related to Th17 generation with clinical implications for psoriasis patients. *Exp. Dermatol.* 20, 371–373.
- Torres-Ramos, Y.D., Montoya-Estrada, A., Guzman-Grenfell, A.M., Mancilla-Ramirez, J., Cardenas-Gonzalez, B., Blanco-Jimenez, S., Sepulveda-Sanchez, J.D., Ramirez-Venegas, A., and Hicks, J.J. (2011). Urban PM_{2.5} induces ROS generation and RBC damage in COPD patients. *Front. Biosci. Elite Ed.* 3, 808–817.
- Totlandsdal, A.I., Låg, M., Lilleaas, E., Cassee, F., and Schwarze, P. (2015). Differential proinflammatory responses induced by diesel exhaust particles with contrasting PAH and metal content. *Environ. Toxicol.* 30, 188–196.
- Toyooka, T., and Ibuki, Y. (2006). New method for testing phototoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Sci. Technol.* 40, 3603–3608.
- Trickett, A., and Kwan, Y.L. (2003). T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads. *J. Immunol. Methods* 275, 251–255.
- Tsai, M.-Y., Hoek, G., Eeftens, M., de Hoogh, K., Beelen, R., Beregszászi, T., Cesaroni, G., Cirach, M., Cyrys, J., De Nazelle, A., et al. (2015a). Spatial variation of PM elemental composition between and within 20 European study areas — Results of the ESCAPE project. *Environ. Int.* 84, 181–192.
- Tsai, S.-S., Weng, Y.-H., Chiu, Y.-W., and Yang, C.-Y. (2015b). Short-Term Effect of Coarse Particles on Daily Mortality Rate in A Tropical City, Kaohsiung, Taiwan. *J. Toxicol. Environ. Health A* 78, 1409–1420.
- Valavanidis, A., Fiotakis, K., Vlahogianni, T., Bakeas, E.B., Triantafyllaki, S., Paraskevopoulou, V., and Dassenakis, M. (2006). Characterization of atmospheric particulates, particle-bound transition metals and polycyclic aromatic hydrocarbons of urban air in the centre of Athens (Greece). *Chemosphere* 65, 760–768.
- Valavanidis, A., Fiotakis, K., and Vlachogianni, T. (2008). Airborne particulate matter and human health: toxicological assessment and importance of size and composition of particles for oxidative damage and carcinogenic mechanisms. *J. Environ. Sci. Health Part C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* 26, 339–362.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., and Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160, 1–40.
- Van der Pouw-Kraan, T., Van Kooten, C., Rensink, I., and Aarden, L. (1992). Interleukin (IL)-4 production by human T cells: differential regulation of IL-4 vs. IL-2 production. *Eur. J. Immunol.* 22, 1237–1241.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3, research0034.
- Vattanasit, U., Navasumrit, P., Khadka, M.B., Kanitwithayanun, J., Promvijit, J., Autrup, H., and Ruchirawat, M. (2014). Oxidative DNA damage and inflammatory responses in cultured human cells and in humans exposed to traffic-related particles. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 217, 23–33.

Références bibliographiques

- Villeneuve, P.J., Chen, L., Rowe, B.H., and Coates, F. (2007). Outdoor air pollution and emergency department visits for asthma among children and adults: a case-crossover study in northern Alberta, Canada. *Environ. Health Glob. Access Sci. Source* 6, 40.
- van Voorhis, M., Knopp, S., Julliard, W., Fechner, J.H., Zhang, X., Schauer, J.J., and Mezrich, J.D. (2013). Exposure to atmospheric particulate matter enhances Th17 polarization through the aryl hydrocarbon receptor. *PLoS One* 8, e82545.
- Vossoughi, M., Schikowski, T., Vierkötter, A., Sugiri, D., Hoffmann, B., Teichert, T., Herder, C., Schulte, T., Luckhaus, C., Raulf-Heimsoth, M., et al. (2014). Air pollution and subclinical airway inflammation in the SALIA cohort study. *Immun. Ageing A* 11, 5.
- Vrijens, K., Bollati, V., and Nawrot, T.S. (2015). MicroRNAs as Potential Signatures of Environmental Exposure or Effect: A Systematic Review. *Environ. Health Perspect.* 123, 399–411.
- Wang, C., Jurk, D., Maddick, M., Nelson, G., Martin-Ruiz, C., and von Zglinicki, T. (2009). DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. *Aging Cell* 8, 311–323.
- Wang, H.G., Pathan, N., Ethell, I.M., Krajewski, S., Yamaguchi, Y., Shibasaki, F., McKeon, F., Bobo, T., Franke, T.F., and Reed, J.C. (1999). Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* 284, 339–343.
- Wang, S., Zeng, Y., Zhou, J.-M., Nie, S.-L., Peng, Q., Gong, J., and Huo, J.-R. (2016). MicroRNA-1246 promotes growth and metastasis of colorectal cancer cells involving CCNG2 reduction. *Mol. Med. Rep.* 13, 273–280.
- Wang, Y.X., Zhang, X.Y., Zhang, B.F., Yang, C.Q., Chen, X.M., and Gao, H.J. (2010). Initial study of microRNA expression profiles of colonic cancer without lymph node metastasis. *J. Dig. Dis.* 11, 50–54.
- Wei, J., Wang, F., Kong, L.-Y., Xu, S., Doucette, T., Ferguson, S.D., Yang, Y., McEnery, K., Jethwa, K., Gjyshi, O., et al. (2013). miR-124 inhibits STAT3 signaling to enhance T cell-mediated immune clearance of glioma. *Cancer Res.* 73, 3913–3926.
- Weifeng, C., Shulin, L., Xiaomei, G., and Xuewen, P. (1986). The Capacity of Lymphokine Production by Peripheral Blood Lymphocytes from Aged Humans. *Immunol. Invest.* 15, 575–583.
- Wellenius, G.A., Schwartz, J., and Mittleman, M.A. (2006). Particulate air pollution and hospital admissions for congestive heart failure in seven United States cities. *Am. J. Cardiol.* 97, 404–408.
- Weng, N.-P. (2006). Aging of the immune system: how much can the adaptive immune system adapt? *Immunity* 24, 495–499.
- White, R.R., Milholland, B., Bruin, A. de, Curran, S., Laberge, R.-M., Steeg, H. van, Campisi, J., Maslov, A.Y., and Vijg, J. (2015). Controlled induction of DNA double-strand breaks in the mouse liver induces features of tissue ageing. *Nat. Commun.* 6, 6790.
- WHO (1993). Biomarkers and risk assessment: concepts and principles.
- WHO (2001). Biomarkers In Risk Assessment: Validity And Validation.
- WHO (2006). Air quality guidelines. Global update 2005. Particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide.
- WHO (2011). WHO | Global health and ageing.
- WHO (2017a). The Health and Environment Lexicon :: Multi-Language Glossary of Health & Environment Terminology.
- WHO (2017b). WHO | Definition of an older person. Proposed working definition of an older person in Africa for the MDS Project.
- WHO (2017c). WHO | 10 facts on ageing and the life course.
- Wilker, E.H., Ljungman, P.L., Rice, M.B., Kloog, I., Schwartz, J., Gold, D.R., Koutrakis, P., Vita, J.A., Mitchell, G.F., Vasan, R.S., et al. (2014). Relation of long-term exposure to air pollution to brachial artery flow-mediated dilation and reactive hyperemia. *Am. J. Cardiol.* 113, 2057–2063.
- Winburn, R.S., Lerach, S.L., Jarabek, B.R., Wisdom, M.A., Grier, D.G., and McCarthy, G.J. (2000). Quantitative XRD analysis of coal combustion by-products by the Rietveld Method. Testing with Standard Mixtures Ryan S. Winburn, Stephanie L. Lerach, Bryan R. Jarabek, Marissa A. Wisdom, Dean G. Grier, Gregory J. McCarthy. *JCPDS-Int. Cent. Diff. Data*.

Références bibliographiques

- Wolf, K., Stafoggia, M., Cesaroni, G., Andersen, Z.J., Beelen, R., Galassi, C., Hennig, F., Migliore, E., Penell, J., Ricceri, F., et al. (2015). Long-term Exposure to Particulate Matter Constituents and the Incidence of Coronary Events in 11 European Cohorts. *Epidemiol. Camb. Mass* 26, 565–574.
- Wu, C., Larson, T.V., Wu, S., Williamson, J., Westberg, H.H., and Liu, L.-J.S. (2007). Source apportionment of PM_{2.5} and selected hazardous air pollutants in Seattle. *Sci. Total Environ.* 386, 42–52.
- Wu, J., Ji, X., Zhu, L., Jiang, Q., Wen, Z., Xu, S., Shao, W., Cai, J., Du, Q., Zhu, Y., et al. (2013). Up-regulation of microRNA-1290 impairs cytokinesis and affects the reprogramming of colon cancer cells. *Cancer Lett.* 329, 155–163.
- Xi, Y., Li, J., Zhang, P., Bai, W., Gao, N., Bai, W., Zhang, Y., Wu, Y., and Ning, Y. (2015). Upregulation of miRNA-17 and miRNA-19 is associated with unfavorable prognosis in patients with T-cell lymphoblastic lymphoma. *Exp. Mol. Pathol.* 99, 297–302.
- Yamane, H., Zhu, J., and Paul, W.E. (2005). Independent roles for IL-2 and GATA-3 in stimulating naive CD4⁺ T cells to generate a Th2-inducing cytokine environment. *J. Exp. Med.* 202, 793–804.
- Yanagita, Y., Senjyu, H., Asai, M., Tanaka, T., Yano, Y., Miyamoto, N., Nishinakagawa, T., Kotaki, K., Kozu, R., Tabusadani, M., et al. (2013). Air pollution irreversibly impairs lung function: a twenty-year follow-up of officially acknowledged victims in Japan. *Tohoku J. Exp. Med.* 230, 177–184.
- Yang, Q., Chen, Y., Krewski, D., Burnett, R.T., Shi, Y., and McGrail, K.M. (2005). Effect of short-term exposure to low levels of gaseous pollutants on chronic obstructive pulmonary disease hospitalizations. *Environ. Res.* 99, 99–105.
- Yang, Y., Xie, Y.J., Xu, Q., Chen, J.X., Shan, N.C., and Zhang, Y. (2015). Down-regulation of miR-1246 in cervical cancer tissues and its clinical significance. *Gynecol. Oncol.* 138, 683–688.
- Ye, L., Jiang, T., Shao, H., Zhong, L., Wang, Z., Liu, Y., Tang, H., Qin, B., Zhang, X., and Fan, J. (2017). miR-1290 Is a Biomarker in DNA-Mismatch-Repair-Deficient Colon Cancer and Promotes Resistance to 5-Fluorouracil by Directly Targeting hMSH2. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 7, 453–464.
- Yentrapalli, R., Azimzadeh, O., Kraemer, A., Malinowsky, K., Sarioglu, H., Becker, K.-F., Atkinson, M.J., Moertl, S., and Tapio, S. (2015). Quantitative and integrated proteome and microRNA analysis of endothelial replicative senescence. *J. Proteomics* 126, 12–23.
- Yue, Z.W., and Fraser, M.P. (2004). Characterization of Nonpolar Organic Fine Particulate Matter in Houston, Texas Special Issue of Aerosol Science and Technology on Findings from the Fine Particulate Matter Supersites Program. *Aerosol Sci. Technol.* 38, 60–67.
- Zanobetti, A., and Schwartz, J. (2005). The effect of particulate air pollution on emergency admissions for myocardial infarction: a multicity case-crossover analysis. *Environ. Health Perspect.* 113, 978–982.
- Zeka, A., Zanobetti, A., and Schwartz, J. (2006). Individual-level modifiers of the effects of particulate matter on daily mortality. *Am. J. Epidemiol.* 163, 849–859.
- Zhang, J.-M., and An, J. (2007). Cytokines, Inflammation and Pain. *Int. Anesthesiol. Clin.* 45, 27–37.
- Zhang, P., Dong, G., Sun, B., Zhang, L., Chen, X., Ma, N., Yu, F., Guo, H., Huang, H., Lee, Y., et al. (2011). Long-term exposure to ambient air pollution and mortality due to cardiovascular disease and cerebrovascular disease in Shenyang, China. - PubMed - NCBI.
- Zhao, A., Chen, R., Kuang, X., and Kan, H. (2014). Ambient Air Pollution and Daily Outpatient Visits for Cardiac Arrhythmia in Shanghai, China. 24, 321–326.
- Zhao, C., Liao, J., Chu, W., Wang, S., Yang, T., Tao, Y., and Wang, G. (2012a). Involvement of TLR2 and TLR4 and Th1/Th2 shift in inflammatory responses induced by fine ambient particulate matter in mice. *Inhal. Toxicol.* 24, 918–927.
- Zhao, J., Xie, Y., Qian, C., Li, L., Jiang, R., Kan, H., Chen, R., and Song, W. (2012b). Imbalance of Th1 and Th2 cells in cardiac injury induced by ambient fine particles. *Toxicol. Lett.* 208, 225–231.
- Zhou, M., Liu, Y., Wang, L., Kuang, X., Xu, X., and Kan, H. (2014). Particulate air pollution and mortality in a cohort of Chinese men. *Environ. Pollut. Barking Essex* 186, 1–6.

Références bibliographiques

- Zhou, W., Yuan, X., Zhang, L., Su, B., Tian, D., Li, Y., Zhao, J., Wang, Y., and Peng, S. (2017). Overexpression of HO-1 assisted PM2.5-induced apoptosis failure and autophagy-related cell necrosis. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **145**, 605–614.
- Zhu, J., and Paul, W.E. (2008). CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* **112**, 1557–1569.
- Zhu, J., Yamane, H., and Paul, W.E. (2010). Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu. Rev. Immunol.* **28**, 445–489.
- Zolnierowicz, J., Ambrozek-Latecka, M., Kawiak, J., Wasilewska, D., and Hoser, G. (2013). Monitoring cell proliferation in vitro with different cellular fluorescent dyes. *Folia Histochem. Cytobiol.* **51**, 193–200.
- Zurawski, S.M., Vega, F., Huyghe, B., and Zurawski, G. (1993). Receptors for interleukin-13 and interleukin-4 are complex and share a novel component that functions in signal transduction. *EMBO J.* **12**, 2663–2670.

ANNEXES

Annexe 1 : Accord du CPP Nord-Ouest

Comité de Protection des Personnes Nord Ouest IV

Président : F. VASSEUR
Vice-Président : S. DUHEM
Secrétaire Général : Y. VENDEL

Lille, le 10 septembre 2015

Membres titulaires :

R. BEUSCART
S. COSTA
A. De BOUVET
X. LABBEE
R. MATIS
P. ODOU
G. MARCHAL
J.L. CHARDRON
N. MESSAADI
F. ASKEVIS - LEHERPEUX

Mr Jean-Jacques VITAGLIANO
Attaché de recherche clinique
Département de la recherche médicale
GHICL
115 rue du Grand But BP 249
59 462 LOMME CEDEX

Membres suppléants :

M. DE MEDEIROS
M. FOULARD
A. LECOCQ
P. MACIAG
C. THERY
F. DANICOURT-BARRIER
S. BONTEMPS
F. MARIE
T. DANIEL
M-C. DALLE
G. BOLET
L. DELASSUS

Mr le Professeur GOSSET
Service d'Anatomie pathologique
GHICL
115 rue du Grand But BP 249
59 462 LOMME CEDEX

COMPTE RENDU DE DELIBERATION : AVIS

Référence à rappeler dans toute correspondance : CPP 15/39
Intitulé du projet : "Recherche des marqueurs biologiques de l'exposition aux polluants atmosphériques"
Promoteur : GHICL
Investigateur principal : PR GOSSET
Référence des documents étudiés :
Courrier du promoteur daté du 9/06/15
Courrier du promoteur daté du 15/06/15 avec CV du Pro GOSSET
Courrier du promoteur daté du 22/06/15 avec attestation d'assurance de la société AXA datée du 17/06/15
Formulaire de demande d'autorisation daté du 9/06/15
Formulaire d'enregistrement IDRCB daté du 8/06/15
Formulaire de déclaration d'une collection d'échantillons biologiques daté du 9/06/15
Document additionnel à la demande d'avis daté du 9/06/15
Protocole AEROTOX référencé 2015RT13 version 1 du 8/06/15
Synopsis version 1 du 8/06/15
Note d'information et formulaire de consentement version 1 du 8/06/15
CV's des investigateurs
N° IDRCB : 2015 A00983 46

Date de la réunion : mardi 8 septembre 2015

Membres présents :

Mme ASKEVIS-LEHERPEUX – Représentant des Psychologues
Mr R. BEUSCART - Représentant des Personnes Qualifiées en Recherche Biomédicale-biostatistique
Mme COSTA – Représentant des Infirmiers
Mme F. DANICOURT-BARRIER – Représentant des Pharmaciens Hospitaliers
Mme DE BOUVET – Représentant en matière d'Ethique
Mme DE MEDEIROS – Représentant des Infirmiers
Mr S. DUHEM – Représentant des Psychologues
Mr M. FOULARD – Représentant en matière d'Ethique
Mme A-F. GERME - Représentant des Personnes Qualifiées en Recherche Biomédicale
Mme L. DELASSUS - Représentant des Personnes Qualifiées en Recherche Biomédicale
Mr T. DANIEL - Représentant des Personnes Qualifiées en Recherche Biomédicale
Mr LABBEE – Représentant en matière juridique
Mr P. MACIAG – Représentant d'Associations

Secrétariat :

Emilie Broux
Bâtiment ex USNB
6 rue du Professeur Laguesse
CHRU LILLE
CS70001
59037 LILLE Cedex

Tel : 03 20 44 41 65 Fax : 03 20 44 41 63 Email : cppnordouestiv@univ-lille2.fr
<http://www.comite-de-protection-des-personnes-nord-ouest-iv.siteweb.fr>

page 1

Mr MARCHAL – Représentant des Associations
Mr F. MARIE - Représentant des Associations
Mr MATIS – Représentant des Personnes Qualifiées en Recherche biomédicale
Mr MESSAADI – Représentant des médecins généralistes
Mr P. ODOU – Représentant des Pharmaciens hospitaliers
Mr C. THERY – Représentant des personnes Qualifiées en Recherche Biomédicale
Mr F. VASSEUR – Représentant des Personnes Qualifiées en Recherche Biomédicale-biostatistique
Mme VENDEL – Représentant des Personnes Qualifiées en Recherche biomédicale
Mme WILLIATE-PELLETERI – Représentant en matière juridique
Mme M-C. DALLE - Représentant en matière juridique
Mme G. BOLET - Représentant en matière juridique

Monsieur, Cher Confrère,

Le Comité de Protection des Personnes Nord Ouest IV, lors de sa réunion du mardi 8 septembre 2015, a pris connaissance des documents concernant l'étude citée en référence.

Le CPP Nord Ouest IV émet un avis favorable à la menée de cette étude avec une remarque non bloquante et non suspensive.

Le Comité souhaiterait connaître les paramètres biologiques qui seront recherchés et analysés dans cette étude.

Je vous remercie de nous faire de votre réponse à cette remarque non bloquantes et non suspensive.

Cette étude est conforme aux articles L1121-1 et L1123-7 du code de la santé publique définissant les conditions de validité de la recherche.

Cet avis a été rendu sans que les membres éventuellement concernés par l'étude aient pris part au vote.

Je vous prie de croire, Monsieur, Cher Confrère, à l'expression de mes meilleures salutations.

Docteur Francis VASSEUR
Président du CPP Nord Ouest IV

CPP Nord Ouest IV
Le Président
Bâtiment ex USN B (RDC)
6 rue du Professeur Laguesse
CHRU LILLE - CS 70001
59037 LILLE CEDEX

D.O. S. Duthem



Annexe 2 : Notice d'information



Page 1 sur 3

- NOTICE D'INFORMATION DE L'ETUDE AEROTOX 2- Recherche de marqueurs biologiques de l'exposition aux polluants atmosphériques

Numéro Protocole : 2015-RT13

Promoteur : GHICL

Investigateur principal : Pr Pierre GOSSET

Madame, Mademoiselle, Monsieur,

Il vous est proposé de participer à un protocole de recherche fondamentale qui recherche des marqueurs biologiques de l'exposition aux polluants atmosphériques.

Nous vous proposons de lire attentivement cette note d'information qui vise à répondre aux questions que vous seriez susceptible de vous poser.

Avant de donner votre réponse, vous disposez d'un délai de réflexion afin de prendre connaissance et de parapher le présent document d'une part et de nous remettre le formulaire de recueil du consentement signé d'autre part.

Vous pourrez à tout moment durant l'essai vous adresser au médecin pour lui poser toute question complémentaire.

1. Quel est l'objectif ?

L'étude cherche à identifier des biomarqueurs d'exposition à la pollution atmosphérique. Cette recherche consistera en l'identification des réactions de vos cellules face à une exposition à des prélèvements d'air.

2. Quelle est la méthode de ce protocole de recherche ?

Un échantillon de votre sang sera prélevé. Les cellules immunitaires contenues dans cet échantillon seront isolées et exposées à des particules atmosphériques provenant d'un prélèvement d'air Dunkerquois. Les effets de cette exposition seront étudiés au niveau moléculaire et biochimique. Tous les tests seront faits sur des prélèvements anonymisés. Vous êtes libre de retirer votre consentement jusqu'au dernier moment, et ceci n'aura aucune conséquence pour vous.

3. Comment se déroule le prélèvement ?

Cette étude ne nécessite qu'un seul prélèvement sanguin qui sera réalisé au centre Naturalpha.

4. Quels sont les bénéfices attendus ?

Aucun bénéfice direct n'est attendu pour vous. Néanmoins, ce projet pourrait avoir des retombées non seulement en termes de connaissances scientifiques mais aussi en termes d'amélioration de la politique de prévention des risques sanitaires.

5. Quels sont les effets indésirables possibles du prélèvement ?

Les effets indésirables possibles sont les conséquences normales et attendues de la prise de sang (ex : hématome, malaise, douleur).

6. Quelles sont les alternatives à ce protocole ?

Il n'existe à ce jour aucune autre alternative pour analyser l'impact sur des cellules immunitaires saines de l'exposition à des polluants atmosphériques.

Paraphe de l'investigateur :

-

Paraphes du patient :

Lettre d'information – AEROTOX 2 – Version 1 du 08/06/2015



7. Indemnisation des sujets

Une indemnité vous sera versée en fin d'étude pour en compenser les contraintes. Pour cela, vous ne devez pas avoir atteint le plafond annuel réglementé de 4 500€ pour votre participation à des essais cliniques, celle-ci comprise.

Couvrant vos éventuels frais de transport, cette indemnité d'un montant de 20€ vous sera versée à la fin de votre participation. Si vous ne réalisez pas le prélèvement sanguin, vous ne serez pas indemnisé.

Vous serez par conséquent inscrit sur le fichier national VRB (Fichier Volontaires Recherches Biomédicales) répertoriant les volontaires sains qui participent aux recherches biomédicales.

8. Quels sont vos droits en tant que participant à ce protocole de recherche ?

Vous êtes libre de décider si vous désirez participer ou non à cette étude. Vous pouvez refuser et, même si vous acceptez, vous pouvez vous retirer de l'étude, sur simple demande écrite, ou orale, à tout moment sans avoir à donner la raison de votre décision et sans conséquence pour la relation avec le médecin qui vous a proposé cette étude.

Pour pouvoir participer à l'étude vous devez être obligatoirement affilié à un régime de sécurité sociale.

Les données recueillies dans le cadre de la recherche feront l'objet d'un traitement informatisé. Ces données seront identifiées par un numéro de code et vos initiales.

A cette fin les données relatives à l'étude seront transmises au Promoteur de la recherche. Le promoteur de l'étude qui en assure la gestion et la responsabilité est le Groupement des Hôpitaux de l'Institut Catholique de Lille (GHICL).

Ces données pourront également, dans des conditions assurant leur confidentialité, être transmises aux autorités de santé, à d'autres entités du Promoteur.

Conformément aux dispositions de la loi relative à l'informatique aux fichiers et aux libertés, vous disposez d'un droit d'accès, de rectification et d'opposition à la transmission de vos données, couvertes par le secret professionnel, susceptibles d'être utilisées dans le cadre de cette recherche et d'être traitées. Vous pouvez également accéder directement ou par l'intermédiaire d'un médecin de votre choix à l'ensemble de vos données médicales en application des dispositions de l'article L 1111-7 du Code de la Santé Publique. Ces droits s'exercent auprès du médecin qui vous suit dans le cadre de la recherche et qui connaît votre identité.

Conformément à l'article L 1122-1 du Code de Santé Publique, à l'issue de la recherche, vous pourrez si vous le souhaitez, être informé des résultats globaux de l'étude par l'intermédiaire du médecin qui suit votre enfant dans le cadre de cette recherche.

Cette étude n'interdit pas votre participation simultanée à une autre recherche.

9. A qui devez-vous vous adresser en cas de questions ou de problèmes ?

Coordonnées des médecins référents du patient
Pr Pierre Gosset Chef du Service d'Anatomie et cytopathologie du GHICL-FLM Hôpital Saint-Vincent de Paul Boulevard de Belfort, B.P. 387 59020 LILLE CEDEX Tél. : 03 20 87 41 82

Paraphe de l'investigateur :

-

Paraphes du patient :



- Cette Recherche Biomédicale est menée conformément à la loi de Santé Publique n° 2004-806 du 9 août 2004 et du décret d'application n° 2006-477 du 26 avril 2006, la loi n° 2004-801 du 6 août 2004 relative à la protection des personnes physiques à l'égard des traitements de données à caractère personnel et modifiant la loi n° 78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés.
- Ce protocole, a obtenu l'autorisation de l'Autorité Compétente (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé-ANSM) le XX/XX/XXXX. Le Comité de Protection des Personnes (CPP Nord-Ouest IV) a rendu un avis favorable le XX/XX/XXXX.
- Le traitement des données sera réalisé dans des conditions de confidentialité définies par la loi du 6 janvier 1978 modifiée relative à l'informatique aux fichiers et aux libertés (CNIL). Conformément aux dispositions de loi relative à l'informatique aux fichiers et aux libertés, vous disposez d'un droit d'accès et de rectification. Vous disposez également d'un droit d'opposition à la transmission des données couvertes par le secret professionnel susceptibles d'être utilisées dans le cadre de cette recherche et d'être traitées.
- Une assurance a été souscrite, conformément à l'article L.1121-10 alinéa 3 du Code de la Santé Publique, auprès de la société AXA Paris, 26 rue Drouot 75458 Paris Cedex 09 (N° de tel : 03 20 45 69 75). Le numéro de contrat de l'assurance souscrite est le n° XXXXXX.

Paraphe de l'investigateur :

-

Paraphes du patient :

Annexe 3 : Formulaire de consentement éclairé



N° Patient |__| |__| |__|

**- FORMULAIRE DE RECUEIL DU CONSENTEMENT DE PARTICIPATION ETUDE AEROTOX-2-
Recherche de marqueurs biologiques de l'exposition aux polluants atmosphériques**

Numéro Protocole : 2015-RT13

Promoteur : GHICL

Investigateur principal : Pr Pierre GOSSET

Je soussigné(e), atteste par le présent consentement que :

- Je suis affilié(e) ou bénéficiaire d'un régime de sécurité sociale ;
- J'ai pris connaissance de la note d'information m'expliquant la nature, les objectifs et la durée du protocole de recherche mentionné ci-dessus ;
- J'ai pu poser toutes les questions que je voulais, j'ai reçu des réponses adaptées et j'ai pu disposer d'un temps de réflexion suffisant entre l'information et ma décision de participer à cette étude ;
- Il m'a été donné le nom d'une personne à contacter pour toute question que je souhaiterais poser durant l'étude ;
- J'ai bien noté que je serai libre à tout moment d'arrêter ma participation sans aucune conséquence pour moi.
- J'accepte que les données enregistrées à l'occasion de cette recherche puissent faire l'objet d'un traitement informatisé par le promoteur.
- J'accepte que ma participation et l'indemnisation que je vais recevoir soit saisie sur le fichier national VRB (Fichier Volontaires Recherches Biomédicales) répertoriant les volontaires sains qui participent aux recherches biomédicales.
- J'ai bien noté que le droit d'accès prévu par la loi "Informatique & Libertés" s'exerce à tout moment auprès du médecin en charge de la recherche, qui seul connaît mon identité. Je pourrai exercer mon droit de rectification et d'opposition auprès du Pr Pierre GOSSET qui contactera le promoteur de la recherche.

Compte-tenu des informations qui m'ont été transmises :

J'accepte librement et volontairement de participer à ce protocole de recherche.

<i>Patient</i>	<i>Personne responsable du recueil du consentement éclairé</i>
Nom :	Nom :
Prénom :	Prénom :
Date :	Date :
Signature :	Signature :

Donner un exemplaire de la lettre d'information et du formulaire de consentement éclairé signé au patient, et conserver un autre exemplaire signé (lettre d'information et formulaire de consentement éclairé).

Consentement AEROTOX 2 – Version 01 du 08/06/2015

Résumé

Les particules fines atmosphériques (PF) sont capables de pénétrer dans les poumons où certains composés transportés peuvent interagir avec les cellules pulmonaires et atteindre la circulation sanguine. L'exposition aux PF affecte particulièrement les populations sensibles telles que les personnes âgées. Cette thèse s'inscrit dans une démarche d'identification des effets des PF sur les lymphocytes T humains (L_T) tout en visant à déterminer des biomarqueurs liés à l'exposition et à évaluer la variation de la réponse cellulaire en fonction de l'âge. Des L_T ont été isolés de prélèvements sanguins de 91 volontaires appartenant à trois classes d'âge (20-30, 45-55, 70-85 ans) puis exposés *ex vivo* pendant 72h à 45 µg/µL de PF collectées à Dunkerque. Les étapes d'isolement, purification et activation des L_T ont d'abord été optimisées. Suite à la caractérisation de la population échantillonnée, une population d'étude homogène a été sélectionnée (10 sujets / classe d'âge). Nous avons mis en évidence une induction génique d'enzymes impliquées dans l'activation métabolique des HAP identifiés dans l'échantillon de PF. La caractérisation du profil des L_T a permis de proposer un profil mixte Th1/Th2 causé par l'exposition. L'étude transcriptomique des miARN a mis en évidence une surexpression de miR-124-3p impliqué dans la régulation de plusieurs fonctions au niveau du système immunitaire et de miR-1290 impliqué dans plusieurs types de cancer. Quant à l'influence de l'âge, une surexpression des gènes codant pour les enzymes antioxydantes (NQO1 et HMOX1), une augmentation de la concentration des cytokines (IL-4 et IL-13) ainsi qu'une modification du profil d'expression de certains miARN ont été notées chez les sujets les plus âgés.

Mots-clés : pollution atmosphérique particulaire fine ; lymphocyte T ; âge ; activation métabolique ; stress oxydant ; profil immunologique ; épigénétique.

Abstract

Atmospheric fine particulate matter (FP) are able to enter the lungs where some compounds can interact with lung cells and reach the bloodstream. Exposure to FP affects in particular susceptible populations such as the elderly. This thesis is part of a project aiming to identify the effects of FP on human T lymphocytes (LT) while attempting to determine biomarkers related to exposure and to evaluate the variation of the cellular response as a function of age. LT were isolated from blood samples of 91 volunteers belonging to three age groups (20-30, 45-55, 70-85 years) then exposed *ex vivo* for 72h to 45 µg/µL of FP collected in Dunkirk. The steps of isolation, purification and activation of LT were first optimized. Following the characterization of the sampled population, a homogeneous study population was selected (10 subjects/age class). We have demonstrated an induction of the genes coding for the enzymes involved in the metabolic activation of PAH identified in the PF sample. Characterization of the LT profile made it possible to propose a mixed Th1/Th2 profile caused by the exposure. The transcriptomic study of miRNAs revealed an overexpression of miR-124-3p involved in the regulation of several functions in the immune system and miR-1290 involved in several types of cancer. As for the influence of age, overexpression of the genes coding for the antioxidant enzymes (NQO1 and HMOX1), an increase in the concentration of cytokines (IL-4 and IL-13) as well as a modification of the expression profile of some miRNAs were noted in the elderly.

Keywords: Fine particulate air pollution; T lymphocyte; age; metabolic activation; oxidative stress; immunological profile; epigenetic