

**Programme Environnement – Santé - Travail  
AFSSET 2007**

**Rapport final  
Janvier 2010**

**Convention EST-2007-65**

**Etude physico-chimique d'aérosols urbains et ruraux et effets sur des cellules  
respiratoires épithéliales et endothéliales**

**(PUFFIN2 : Particules UltraFines et FINes 2)**

**Responsable scientifique:**

**Armelle BAEZA, MCU, HDR**  
Laboratoire des Réponses Cellulaires et Moléculaires aux Xénobiotiques  
Institut Biologie Fonctionnelle et Adaptative, EAC CNRS 4413  
Université Paris Diderot Paris 7,  
Case 7073, 5 rue Thomas Mann 75205 Paris cédex 13  
Tel : 01 57 27 83 35  
Fax : 01 57 27 83 29  
Mail : [baeza@univ-paris-diderot.fr](mailto:baeza@univ-paris-diderot.fr)

**Equipes impliquées :**

**Laboratoire des Réponses Cellulaires et Moléculaires aux Xénobiotiques (RMCX), EAC  
CNRS 4413, Université Paris Diderot-Paris 7 : A. BAEZA, S. VAL, R. HAMEL**

**Laboratoire d'Etude des Particules Inhalées (LEPI), Ville de Paris :  
L. MARTINON, M.-A. BILLON-GALLAND, P. BRUYER, S. CARRAT, V. COCHET, G. PETIT,  
F. VALLENTIN**

**Laboratoire des Sciences du Climat et de l'Environnement (LSCE), CEA-CNRS :  
H. CACHIER, J. SCIARE**

**Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Respiratoire (LPCR, INSERM U885), I.  
BAUDRIMONT**

**Airparif, H. MARFAING, C. AMPE**

**Lig'Air, A. YAHYAOU, P. COLIN, C. ROBIN, F. HOSMALIN**



DEPARTEMENT DE PARIS





## SOMMAIRE

RESUME .....	4
<b>1- Présentation de l'étude</b> .....	5
<b>2- Contexte scientifique du projet</b> .....	6
2-1 : <i>Caractéristiques des aérosols urbains et ruraux</i> .....	6
2-2 : <i>L'appareil respiratoire, 1<sup>ère</sup> cible des particules inhalées</i> .....	6
2-3 : <i>Caractéristiques physico-chimiques des particules impliquées dans leurs effets biologiques</i> .....	7
2-4 : <i>Rôle du stress oxydant dans le mécanisme d'action des particules</i> .....	7
2-5 : <i>Quelle fraction de l'aérosol est la plus impliquée dans les effets biologiques ?</i> .....	8
<b>3- Méthodologies</b> .....	11
<b>3-1 Collecte des échantillons</b> .....	11
3-1-1 : <i>Campagne en zone urbaine de proximité du trafic</i> .....	13
3-1-2 : <i>Campagne en zone rurale</i> .....	13
<b>3-2- Caractérisation physico-chimique des particules prélevées : Matériel et méthodes</b> .....	14
3-2-1 : <i>Conditions d'analyses gravimétriques</i> .....	14
3-2-2 : <i>Conditions d'analyses de la fraction particulaire carbonée</i> .....	14
3-2-3 : <i>Conditions d'analyses des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) et pesticides</i> .....	15
3-2-4 : <i>Conditions des analyses morphologiques des particules</i> .....	17
<b>3-3- Analyses biologiques : Matériel et méthodes</b> .....	17
3-3-1 : <i>Méthode de récupération des particules pour les tests biologiques</i> .....	17
3-3-2 : <i>Culture cellulaire</i> .....	18
3-3-3 : <i>Evaluation de la cytotoxicité</i> .....	18
<i>par insertion d'Iodure de propidium</i> .....	18
<i>par évaluation de l'activité métabolique : test WST-1</i> .....	19
3-3-4 : <i>Mesure de l'expression des gènes par PCR quantitative</i> .....	19
3-3-5 : <i>Dosage des sécrétions de cytokines pro-inflammatoires et de facteurs de croissance par test ELISA</i> .....	21
3-3-6 : <i>Test EROD : mesure de l'activité enzymatique du CYP1A1</i> .....	21
3-3-7 : <i>Test hydroxyethidine : mise en évidence d'une augmentation intracellulaire d'anion superoxyde</i> .....	21
3-3-8 : <i>Test dichlorofluorescéine diacétate : mise en évidence d'une augmentation intracellulaire d'espèces réactives de l'oxygène</i> .....	21
<b>5- Résultats</b> .....	23
5-1 : <i>Distribution granulométrique</i> .....	23
5-2 : <i>Typologie des particules</i> .....	27
5-3 : <i>Analyses chimiques</i> .....	31
5-4 : <i>Teneurs en HAP</i> .....	35
<i>Teneurs en HAP des particules échantillonnées en site de proximité du trafic</i> .....	35
<i>Teneurs en HAP des particules échantillonnées en zone rurale</i> .....	36
5-5 : <i>Teneurs en pesticides</i> .....	39
5-6 : <i>Etudes toxicologiques</i> .....	47
5-6-1 : <i>Cytotoxicité des particules</i> .....	47
5-6-2 : <i>Effet des particules sur l'expression de gènes du métabolisme des xénobiotiques</i> .....	47
5-6-3 : <i>Effet des particules sur la production d'Espèces Activées de l'Oxygène (EAO) et l'expression d'enzymes antioxydantes</i> .....	51
5-6-4 : <i>Effet pro-inflammatoire des particules</i> .....	55
5-6-5 : <i>Rôle des endotoxines dans les effets pro-inflammatoires des particules</i> .....	60
5-6-6 : <i>Discussion des résultats toxicologiques</i> .....	61
<b>6- Conclusions</b> .....	63
<b>8- Bibliographie</b> .....	66
<b>9- Valorisation scientifique</b> .....	69
<b>ANNEXE I</b> .....	70

## **RESUME**

Ce projet avait pour objectifs d'étudier la toxicité relative des principales fractions granulométriques de particules issues de différentes atmosphères (urbaine et rurale) sur des cellules pulmonaires humaines *in vitro* et de la mettre en relation avec leurs caractéristiques physico-chimiques.

Des particules ont été prélevées en milieu urbain (Paris, Porte d'Auteuil près du périphérique) et en milieu rural (Oysonville, Eure et Loire à activité agricole). En milieu urbain un tiers des particules en masse est constitué de particules ultrafines (PUF), cette fraction étant très peu abondante en milieu rural. Les particules urbaines sont caractérisées par l'abondance de composés primaires (carbone-suie BC et matière organique) ainsi qu'une forte présence d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) préférentiellement associés aux fractions fines (PF) puis PUF alors que les PM issues du milieu rural contiennent surtout des composés secondaires (nitrates et dans une moindre mesure sulfates et organiques) ainsi que des pesticides mais en quantité faible relativement aux concentrations présentes en phase gazeuse.

Des cellules épithéliales bronchiques (CEpB) et des cellules endothéliales pulmonaires (CEnP) ont été exposées à des concentrations non cytotoxiques (de 0,1 à 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) des trois fractions granulométriques d'intérêt : PUF, PF et PG (grossières). Seules les PF et PUF<sub>[ $\leq 0,25-0,03$ ]</sub> quelles soient urbaines ou rurales induisent après une exposition de 24h l'expression d'enzymes du métabolisme des xénobiotiques (Cytochrome P450 1A1 et NADPH Quinone Oxydoréductase-1), l'expression d'une enzyme anti-oxydante (Hème Oxygénase-1) et l'expression et la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires (GM-CSF, l'IL-6 et l'amphiréguline dans les CEpB, l'IL-8 et le TNF $\alpha$  dans les CEnP). Les PG<sub>[10-> 1,65  $\mu\text{m}$ ]</sub> n'ont pratiquement aucun effet sur ces différents biomarqueurs. Les deux types cellulaires répondent de façon similaire avec des nuances dans les niveaux d'induction pour certains biomarqueurs. Les PUF rurales apparaissent à masse équivalente aussi réactives voire pour certains biomarqueurs plus réactives que les PUF urbaines, ceci étant à relativiser car la proportion de PUF dans l'aérosol rural est très faible.

## 1- Présentation de l'étude

De nombreuses études épidémiologiques ont révélé l'implication des particules atmosphériques dans l'augmentation de la mortalité et de la morbidité respiratoire et cardiovasculaire et les populations urbaines vivant dans des villes à fort trafic automobile, gros producteur de particules, apparaissent particulièrement exposées et susceptibles de développer ces pathologies. Une expertise récente souligne la vraisemblance d'une relation causale entre l'exposition aux particules ultrafines et la survenue d'effets sanitaires identifiant parmi les mécanismes possibles une inflammation respiratoire et une thrombose (Knol et coll., 2009).

Pour autant dans d'autres environnements, le rôle des différentes fractions physico-chimiques des particules dans les effets biologiques est loin d'être parfaitement éclairci et la contribution de certains composés comme les pesticides dans des environnements ruraux très impactés par ces composés voire même en zone urbaine n'a pour l'instant pas fait l'objet d'études. Ainsi 25 à 75 % des pesticides utilisés seraient transférés vers l'atmosphère selon les modes d'application et les conditions météorologiques.

### Objectifs :

**Le but de ce projet était, d'une part, d'évaluer la toxicité relative des principales fractions granulométriques de particules issues de différentes atmosphères (urbaines et rurales), et, d'autre part, de la mettre en relation avec la nature physico-chimique de ces particules.**

Notre projet avait pour objectif d'apporter des éléments de réponse aux questions suivantes :

- Le profil granulométrique de PM urbaines se distingue-t-il de celui des PM rurales impactées par des produits phytosanitaires ?
- Quelles sont les caractéristiques physico-chimiques des particules inhalées par les populations dans ces 2 situations?
- Dans ces 2 situations, quelle est la réactivité biologique des différentes fractions granulométriques? Est-elle plutôt associée aux fractions fines [1-0,1 $\mu$ m] et ultrafines (< 0,1  $\mu$ m) comme l'ont montré les recherches précédentes sur un aérosol urbain de fond (rapport Primequal-Predit) ou s'observe-t-elle sur d'autres classes granulométriques ?
- La réactivité biologique est-elle la même pour les différentes cellules respiratoires cibles (cellules épithéliales bronchiques humaines et cellules endothéliales vasculaires pulmonaires humaines) ?

Des réponses à ces questions ont pu être apportées

1. en réalisant des prélèvements sélectifs d'aérosols urbains et ruraux en utilisant des impacteurs 13 étages
2. en précisant les caractéristiques physico-chimiques de ces aérosols pour chaque classe de taille en terme de morphologie, distribution granulométrique en masse, de teneurs en ions, carbone élémentaire et carbone organique (soluble et insoluble), d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et 57 pesticides
3. en étudiant l'expression de divers biomarqueurs de l'exposition aux particules sur des cellules cibles respiratoires. Des *biomarqueurs d'exposition* ont été étudiés: il s'agit du cytochrome P450 1A1, enzyme de phase I du métabolisme des xénobiotiques dont l'expression est spécifiquement induite par les hydrocarbures aromatiques polycycliques ainsi que la NADPH quinone oxydoréductase et la glutathion-S-transférase, enzymes de phase II dont l'expression traduit la mise en place des mécanismes de détoxification suite à l'exposition à des xénobiotiques. Des *biomarqueurs d'effet de l'exposition* ont également été suivis: il s'agit des cytokines pro-inflammatoires (GM-CSF, TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8) dont l'expression traduit une adaptation des cellules au stress particulaire et qui peut conduire à une réponse physiopathologique et des enzymes anti-oxydantes (superoxyde dismutase, hème oxygénase) dont l'expression est induite par de nombreux xénobiotiques ayant une activité radicalaire ou dont les processus de métabolisation génèrent des espèces réactives de l'oxygène

Cette recherche s'est appuyée sur une étude précédente réalisée par quelques membres du présent projet qui a révélé que les fractions les plus fines de l'aérosol urbain de fond sont les plus impliquées dans l'apparition d'une réponse pro-inflammatoire dans des cellules épithéliales bronchiques en culture (Ramgolam et al, 2007,) et que la PM1 serait plus représentative de la fraction fine de l'aérosol de fond d'une ville comme Paris que la PM2.5 classiquement mesurée actuellement (Ramgolam et al, 2009). L'étude actuelle permettra de conforter ou non la représentativité et la pertinence de nos résultats antérieurs en ayant accès à des particules à chimie très contrastée prélevées d'une part au plus près de la source « trafic » et d'autre part en zone rurale à la saison de l'utilisation massive de pesticides. L'étude permettra également des investigations sur 2 types cellulaires différents au travers d'une batterie de biomarqueurs d'effets de l'exposition.

## **2- Contexte scientifique du projet**

### **2-1 : Caractéristiques des aérosols urbains et ruraux**

L'aérosol urbain est globalement dominé par des particules fines (PM<sub>2.5</sub> : Particulate Matter, particules au diamètre aérodynamique <2,5 µm) et ultra-fines (PM<sub>0.1</sub>) majoritairement issues des processus de combustion et en particulier du trafic automobile. Ces particules sont formées de noyaux carbonés associés à des molécules organiques et inorganiques susceptibles d'être très réactives vis à vis de l'organisme. Des études récentes menées dans le cadre de divers programmes (PIPAPPO, ESCOMPTE, Pékin –Aérosols et PUFFIN)) ont permis d'explorer plus précisément la spéciation chimique des aérosols résolue en taille. Certaines espèces d'origine primaire sont présentes dans des modes bien définis (submicronique pour le carbone-suie, super-micronique pour les sels de mer ou les poussières crustales) alors que les espèces secondaires en particulier les nitrates ou les organiques ont une répartition qui varie avec la saison (Cachier et coll., 2005 ; Guinot et coll., 2007a). La formation de l'aérosol organique et inorganique secondaire peut être favorisée par un ensoleillement et des températures élevées. En accord avec les études théoriques (Seinfeld and Pandis, 1996 ; Liousse et coll., 2005) il a été confirmé récemment que cette formation pouvait soit (le plus souvent) modifier les particules préexistantes soit conduire à la création de particules ultrafines. La répartition granulométrique des espèces particulaires anthropiques présente donc une saisonnalité marquée. De plus, de toutes nouvelles études sur le caractère hydrosoluble des particules organiques à Paris ont montré que cette fraction n'avait pas le même comportement suivant la taille des particules, les plus petites montrant un caractère hydrosoluble très prononcé (Cachier et coll., 2007).

En dehors des zones urbaines, il existe des situations en zones rurales où la proximité d'activités agricoles provoque l'exposition à d'autres sources polluantes comme les pesticides. Ceux-ci pourraient être incriminés dans l'apparition de cancers et dans des effets reprotoxiques et neurologiques. La position de la France qui occupe le 3<sup>e</sup> rang mondial sur le marché des produits phytosanitaires en quantités de substances vendues a conduit les autorités à définir un plan interministériel de réduction des risques liés aux pesticides dont l'un des axes vise à renforcer la connaissance et la transparence en matière d'impact sanitaire et environnementale des pesticides (PIRRP, 2006). Une étude d'évaluation de l'exposition aérienne aux pesticides des populations à risque, réalisée à l'initiative de l'Institut de Veille Sanitaire, a révélé la présence non négligeable de divers pesticides dans l'atmosphère de zones à forte activité agricole dont certains sont pourtant interdits depuis plusieurs années (rapport INVS, 2006). C'est ce qui ressort du suivi fait par la Lig'Air, association agréée pour la surveillance de la qualité de l'air de la région Centre depuis 2000 et du suivi plus récent mené par Airparif en milieu urbain (rapports Lig'Air, 2006, 2007, Airparif 2007). La voie respiratoire pourrait donc constituer une voie d'entrée importante de ces composés. La répartition gaz/particules des pesticides est peu connue car fonction du pesticide considéré et il n'existe à notre connaissance à l'heure actuelle aucune donnée sur la répartition granulométrique de ces composés ni sur les effets biologiques de PM rurales potentiellement enrichies en pesticides.

Dans les deux cas, aérosol urbain et rural, on peut s'attendre à voir des profils granulométriques marqués par une fraction de particules ultrafines liée à la conversion gaz/particules et une fraction de grosses particules liée au soulèvement, ces dernières, par leurs propriétés de surface pouvant agir comme vecteurs de substances semi-volatiles adsorbées.

### **2-2 : L'appareil respiratoire, 1<sup>ère</sup> cible des particules inhalées**

L'excès de mortalité constatée par les études épidémiologiques est principalement associé aux pathologies respiratoires (telles que les broncho-pneumopathies chroniques obstructives (BPCO), l'asthme et les cancers pulmonaires), mais également aux pathologies cardio-vasculaires (Gold et al., 2000 ; Dockery, 2001 ; Pope et al., 2002 ; Pope et al., 2004).

Les études expérimentales menées *in vivo* et *in vitro* pour étayer ces données épidémiologiques montrent que l'effet principal à court terme d'une exposition aiguë aux particules est une inflammation respiratoire et pulmonaire (Behndig et coll., 2006, Baulig et coll., 2007) qui pourrait expliquer l'aggravation des pathologies respiratoires et cardio-vasculaires chez les personnes sensibles (Zeka et coll., 2006). L'inflammation se manifeste par un afflux de cellules de l'inflammation dans les voies respiratoires, attirées et activées par des médiateurs inflammatoires (cytokines et chimiokines) sécrétées par les cellules épithéliales respiratoires et les macrophages alvéolaires exposés.

Ces médiateurs de l'inflammation vont, également, agir sur les cellules endothéliales (cibles principales des cytokines pro-inflammatoires) qui tapissent la lumière interne des vaisseaux et qui possèdent une fonction de régulation de la vasomotricité. En effet, une voie importante de modulation du tonus vasculaire met en jeu le monoxyde d'azote (NO) produit à partir de la N-arginine grâce à une NO synthase endothéliale. Celle-ci est activée, d'une part, par des agonistes se fixant sur des récepteurs membranaires des cellules et, d'autre part, par des contraintes mécaniques exercées sur la paroi vasculaire. En plus de ses propriétés relaxantes, le NO exerce d'autres effets sur les cellules musculaires lisses (inhibition de la prolifération et de la migration) et sur les cellules circulantes (inhibition de l'adhésion et de l'agrégation plaquettaires) ce qui lui confère un rôle vasculoprotecteur (Gewaltig et coll., 2002, Courtois et coll., 2008).

Cependant la cellule endothéliale peut également être la cible directe des particules. En effet, il a été montré chez l'homme que les particules fines et ultrafines pénètrent profondément dans les voies respiratoires, peuvent franchir les barrières épithéliales, atteindre le parenchyme pulmonaire profond jusqu'aux alvéoles pulmonaires où elles peuvent s'accumuler. Dans le cas des particules ultrafines, il a également, été montré chez l'homme, un passage rapide dans la circulation systémique après inhalation (Nemmar et coll., 2002). Il est, par ailleurs, fort probable que la circulation pulmonaire constitue une cible privilégiée lors de l'inhalation de ces particules. Cependant, il existe à l'heure actuelle peu de données dans la littérature concernant les effets des particules sur la cellule endothéliale vasculaire pulmonaire. Une étude très récente vient de montrer que les particules ultrafines induisent un dysfonctionnement de la cellule endothéliale vasculaire pulmonaire, lequel s'expliquerait par une augmentation de l'expression d'un certain nombre de gènes impliqués, d'une part, dans la réponse inflammatoire (IL-8, MCP1) et, d'autre part, dans les processus de coagulation (Karoly et al., 2007).

### **2-3 : Caractéristiques physico-chimiques des particules impliquées dans leurs effets biologiques**

Les caractéristiques physico-chimiques des particules impliquées dans leurs effets biologiques ont principalement été identifiées en utilisant des particules modèles. Les particules diesel, fraction importante des aérosols urbains riches en composés organiques et les ROFA ou cendres volantes résiduelles de pétrole riches en métaux ont permis de mettre en évidence le rôle important de la composition chimique des particules dans leurs effets cellulaires (Boland et coll., 2001, Ghio et coll., 2002), tandis que d'autres études utilisant des particules de composition chimique biologiquement inerte comme le noir de carbone ou le dioxyde de titane ont montré un rôle déterminant de la taille des particules (Oberdorster et coll., 1994, Dick et coll., 2003). Les études avec les particules atmosphériques ont conforté ces observations (Baulig et coll., 2004) et ont par ailleurs souligné le rôle des endotoxines dans les effets inflammatoires (Becker et coll., 2002). Les endotoxines sont des fragments de la paroi des bactéries Gram (-) qui lorsqu'ils sont reconnus par des récepteurs spécifiques présents sur les membranes des cellules épithéliales provoquent une activation cellulaire aboutissant à la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires.

### **2-4 : Rôle du stress oxydant dans le mécanisme d'action des particules**

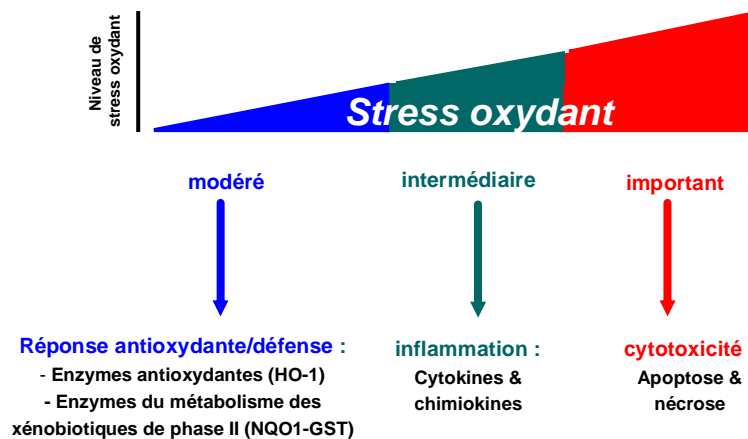
En l'état actuel des connaissances, il apparaît que la taille comme la composition chimique sont impliqués dans les effets biologiques des particules au niveau cellulaire et moléculaire et que le dénominateur commun de ces déterminants de l'activité biologique des particules est la production d'un stress oxydant (Baeza et Marano, 2007).

Plus le diamètre des particules est faible, plus le nombre de particules par unité de masse est important et plus la surface spécifique augmente. Ceci s'accompagne d'une augmentation de la réactivité de surface qui se traduit par la production d'espèces radicalaires. Ainsi les particules ultrafines de carbone (diamètre : 14 nm et surface : 253,9 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup>) produisent en condition acellulaire davantage d'espèces activées de l'oxygène (EAO) que les particules fines (diamètre : 260 nm et surface : 7,9 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup>) (Wilson et coll., 2002). Cette différence se retrouve également dans leur capacité à induire des cassures au niveau d'ADN de plasmide qui, par ailleurs, ne se produisent plus en présence d'antioxydants (Donaldson et coll 1997). Récemment, il a été montré par des observations en microscopie électronique que les particules les plus fines (< 0,1 µm) pénétraient dans les cellules et pouvaient s'accumuler dans les mitochondries. L'altération du fonctionnement de ces organites cellulaires, siège d'une production endogène d'anion superoxyde, contribuerait à la production du stress oxydant induit par les particules (Li et coll., 2003).

Les métaux de transition comme le fer et le cuivre vont, dans la réaction de Fenton en présence d'eau oxygénée, produire du radical hydroxyle, espèce radicalaire très réactive qui va immédiatement agir avec les molécules de son environnement et donc générer des lésions oxydatives touchant les macromolécules biologiques (Donaldson et coll., 1997). Une production de radical hydroxyl a été observée en condition acellulaire avec des PM<sub>2.5</sub> prélevées à Paris et apparait corrélée à la teneur en cuivre (Baulig et coll., 2004).

De nombreux composés organiques plus ou moins réactifs sont présents sur les particules. Parmi eux, les quinones sont capables de générer des EAO par l'intermédiaire de cycles rédox (Squadrito et coll 2001) et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) induisent spécifiquement le cytochrome P450 1A1 ou CYP1A1, mono-oxygénase qui produit au cours de son cycle catalytique des EAO et génèrent des intermédiaires réactifs pouvant avoir des propriétés radicalaires. Des mesures en conditions acellulaires de l'activité rédox de PM prélevées à Los Angeles ont montré une activité rédox plus élevée des particules ultrafines (à masse équivalente) par rapport aux autres classe de taille qui est corrélée à leur teneur en carbone organique, aux HAP et à certains métaux (Ntziachristos et coll., 2007).

Le stress oxydant pourrait donc jouer un rôle central dans les cascades de signalisation qui conduisent à la sécrétion des médiateurs impliqués dans l'inflammation contribuant à l'exacerbation de l'inflammation chronique caractéristique de pathologies respiratoires comme l'asthme et la BPCO. La production excessive d'espèces activées de l'oxygène (EAO) est à l'origine du stress qui, selon son niveau, peut conduire à des réponses cellulaires progressives et des lésions plus ou moins importantes (Fig .2-1). Une faible surproduction d'EAO provoque l'activation des systèmes antioxydants cellulaires (comme l'hème-oxygénase, HO-1) et des systèmes de métabolisation des xénobiotiques (comme la glutathion-S-transférase, GST). Si cette protection est insuffisante, l'augmentation du stress oxydant est tout d'abord à l'origine de la réponse inflammatoire. Enfin, dans une dernière étape où toutes les défenses sont débordées, il peut conduire à la mort cellulaire par apoptose (mort cellulaire programmée) ou par nécrose. Cette hiérarchisation de la réponse est directement liée à la balance pro-oxydants/antioxydants. L'hypothèse du rôle central d'une perturbation de l'homéostasie redox est donc avancée pour expliquer la relation entre pollution atmosphérique et asthme (Li et coll 2003) ou BPCO (Mac Nee et Donaldson 2003). Les personnes ayant de moindre capacité à métaboliser les xénobiotiques et à éliminer les EAO présenteraient alors une susceptibilité accrue comme le suggère les observations d'une plus grande sensibilité aux effets adjuvants des particules Diesel, des individus présentant un génotype *GSTM1*-null ou *GSTP1*-Ile/Ile c'est-à-dire chez lesquels l'activité de la GST est absente ou atténuée (Saxon et Diaz-Sanchez, 2005).



**Figure 2-1 :** modèle de la réponse hiérarchisée au stress oxydant induit par les particules

**2-5 : Quelle fraction de l'aérosol est la plus impliquée dans les effets biologiques ?**

Ces dernières années tant les études épidémiologiques (Ibald-Mulli et coll., 2002) qu'expérimentales (Dick et coll., 2003, Reibman et coll., 2002, Li et coll., 2003) ont mis l'accent sur le rôle des fractions fines et ultrafines dans les effets sanitaires (Sioutas et coll., 2005, Ostro et coll., 2006). Une étude réalisée par un certain nombre de partenaires du présent projet (A. Baeza-RMCX, L. Martinon-LEPI, H. Cachier-LSCE) et portant sur l'aérosol urbain de fond a montré que les particules fines et ultrafines induisent des effets biologiques plus marqués que les particules grossières (Primequal PUFFIN). Il a en effet été montré sur un aérosol fractionné (PM grossières 10-2.5µm, PM fines 2.5-1, et 1-0.1µm, PM ultrafines 0.03-0.1µm) que plus les particules sont petites plus la sécrétion de GM-CSF,



médiateur proinflammatoire, par les cellules épithéliales bronchiques humaines est élevée (K. Ramgolam, 2007) et que cette sécrétion est corrélée à la composante organique de l'aérosol (Ramgolam et coll., 2009).

Néanmoins il existe également des arguments épidémiologiques et expérimentaux en faveur d'un effet supérieur de la fraction grossière de l'aérosol par rapport à la fraction fine. Dans un certain nombre de cas, la présence d'endotoxines sur la fraction grossière serait le facteur principalement responsable (Osornio-Vargas et coll., 2003, Schins et coll. 2004). Cependant les comparaisons entre toutes ces études pour tenter d'expliquer ces différences de réactivité selon les fractions granulométriques sont difficiles à réaliser du fait de la diversité des méthodologies utilisées à la fois pour collecter les particules et pour évaluer leurs effets biologiques.

Il apparaît donc souhaitable de tester, selon les méthodes mises au point dans le cadre du projet PUFFIN, des aérosols prélevés dans différents environnements. Il est nécessaire de pouvoir disposer d'aérosols aux profils granulométriques bien établis afin d'évaluer la réponse biologique de chaque classe de taille.

**En résumé, l'analyse de la littérature met clairement en évidence que la compréhension des mécanismes impliqués dans les effets biologiques des particules a progressé faisant ressortir de rôle central joué par le stress oxydant. La petite taille des particules associée à une composition chimique réactive apparaissent comme les caractéristiques les plus importantes à considérer dans les effets biologiques des particules atmosphériques. Cependant pour l'instant trop peu d'études associant la caractérisation physico-chimique des particules et leurs effets biologiques ont été réalisées sur des aérosols naturels et encore moins sur des aérosols fractionnés issus de différentes atmosphères. Ces données sont essentielles afin d'apporter des explications causales aux relations : expositions aux particules atmosphériques - maladies respiratoires et cardiovasculaires révélées par les études épidémiologiques. Elles sont également nécessaires pour une meilleure caractérisation du danger lié à ces expositions impliquant des mélanges complexes.**

Impacteur	RUN n°	i1	i2	i3	i4	i5	RUN n°	i1	i2	i3	i4	i5	RUN n°	i1	i2	i3	i4	i5		
Traceur	1 au 4/04/08	20L/mn	30L/mn	30L/mn	30L/mn	30L/mn	25 au 29/04/08	20L/mn	30L/mn	30L/mn	30L/mn	30L/mn	31/03 au 14/04/09	20L/mn	30L/mn	30L/mn	30L/mn	30L/mn		
		HP	EPI	ENDO	ION	ION		HP	CAR	EPI	ENDO	HP		EPI	ENDO	CAR	ION			
	67,5	67,5	67,5	67,5	94,28	94,28		94,28	94,28	94,28	226,17	226,17		226,17	226,17	226,17				
	59,33	114,01	117,25	117,65	103,15	156,41		160,09	163,57	162,63	240,189	377,246		379,960	366,390	384,031				
Durée (h)																				
Vol éch. (m³)																				
Impacteur	RUN n° 14-2	i1	i2	i3	i4	i5	RUN n° 17-1	i1	i2	i3	i4	i5	RUN n° 14-15	i1	i2	i3	i4	i5		
Traceur	4 au 8/04/08	20L/mn	30L/mn	30L/mn	30L/mn	30L/mn	29/04 au 2/5/08	20L/mn	30L/mn	30L/mn	30L/mn	30L/mn	15/04 au 27/04/09	20L/mn	30L/mn	30L/mn	30L/mn	30L/mn		
		HP	EPI	ENDO	ION	ION		HP	CAR	EPI	ENDO	HP		EPI	ENDO	CAR	ION			
	94,75	94,75	94,75	94,75	70,42	70,42		70,42	70,42	70,42	283,92	283,92		283,92	283,92	283,92				
	82,52	162,59	165,15	165,43	77,00	114,08		118,41	123,23	120,76	301,520	466,759		475,277	451,428	471,870				
Durée (h)																				
Vol éch. (m³)																				
Impacteur	RUN n° 15-1	i1	i2	i3	i4	i5	RUN n° 18-2	i1	i2	i3	i4	i5	RUN n° 16-17	i1	i2	i3	i4	i5		
Traceur	8 au 11/04/08	20L/mn	30L/mn	30L/mn	30L/mn	30L/mn	02 au 09/05/08	20L/mn	30L/mn	30L/mn	30L/mn	30L/mn	27/04 au 11/05/09	20L/mn	30L/mn	30L/mn	30L/mn	30L/mn		
		ION	EPI/ENDO	CAR	HP	ENDO		HP	CAR	EPI	ION	HP		EPI	ENDO	CAR	ION			
	70,08	70,08	70,08	70,08	166,67	166,67		166,67	166,67	166,67	334,00	334,00		334,00	334,00	334,00				
	77,81	119,12	119,40	98,39	185,65	275,36		285,66	291,81	290,66	341,682	553,104		578,154	558,114	565,128				
Durée (h)																				
Vol éch. (m³)																				
Impacteur	RUN n° 15-2	i1	i2	i3	i4	i5	RUN n° 19-1	i1	i2	i3	i4	i5	RUN n° 20-21	i1				i4	i5	
Traceur	11 au 15/04/08	20L/mn	30L/mn	30L/mn	30L/mn	30L/mn	09 au 16/05/08	20L/mn	30L/mn	30L/mn	30L/mn	30L/mn	13 au 22/05/09	20L/mn				30L/mn	30L/mn	
		ION	HP	CAR	EPI/ENDO	ENDO		HP	CAR	EPI	ION	HP					EPI	ENDO		
	94,67	94,67	94,67	94,67	165,55	165,55		165,55	165,55	165,55	214,17					214,17	214,17			
	105,08	108,78	160,92	165,86	183,76	275,64		283,59	290,54	287,56	228,730					373,035	361,727			
Durée (h)																				
Vol éch. (m³)																				
Impacteur	RUN n° 16-1	i1	i2	i3	i4	i5	RUN n° 20-1	i1				i4	i5	RUN n° 22-23	i1				i4	i5
Traceur	15 au 18/04/08	20L/mn	30L/mn	30L/mn	30L/mn	30L/mn	16 au 23/05/08	20L/mn				30L/mn	30L/mn	27/05 au 08/06/09	20L/mn				30L/mn	30L/mn
		ION	HP	CAR	EPI/ENDO	ENDO				EPI	ION	HP					EPI	ENDO		
	70,05	70,05	70,05	70,05	166,22				166,22	166,22	?					286,67				
	77,04	115,58	119,79	121,19	184,50				290,87	289,22	?					489,598				
Durée (h)																				
Vol éch. (m³)																				
Impacteur	RUN n° 16-2	i1	i2	i3	i4	i5	RUN n° 21-1	i1				i4	i5							
Traceur	18 au 22/04/08	20L/mn	30L/mn	30L/mn	30L/mn	30L/mn	23 au 30/05/08	20L/mn				30L/mn	30L/mn							
		ION	HP	CAR	EPI	ENDO		ENDO			EPI	ION								
	93,5	93,5	93,5	93,5	93,5	164,08				164,08	164,08									
	104,71	157,53	162,66	163,62	163,17	179,67				285,65	283,04									
Durée (h)																				
Vol éch. (m³)																				
							RUN n° 22-1	i1				i4	i5							
								20L/mn				30L/mn	30L/mn							
							30/5 au 06/06/08	ENDO				EPI	ION							
								166,66				166,66	166,66							
								183,49				287,99	288,34							

Tableau 3-1 : synthèse des caractéristiques des différents prélèvements effectués à Paris, porte d'Auteuil en 2008 (à gauche), à Oysonville en 2008 (au centre) et Oysonville en 2009 (à droite)

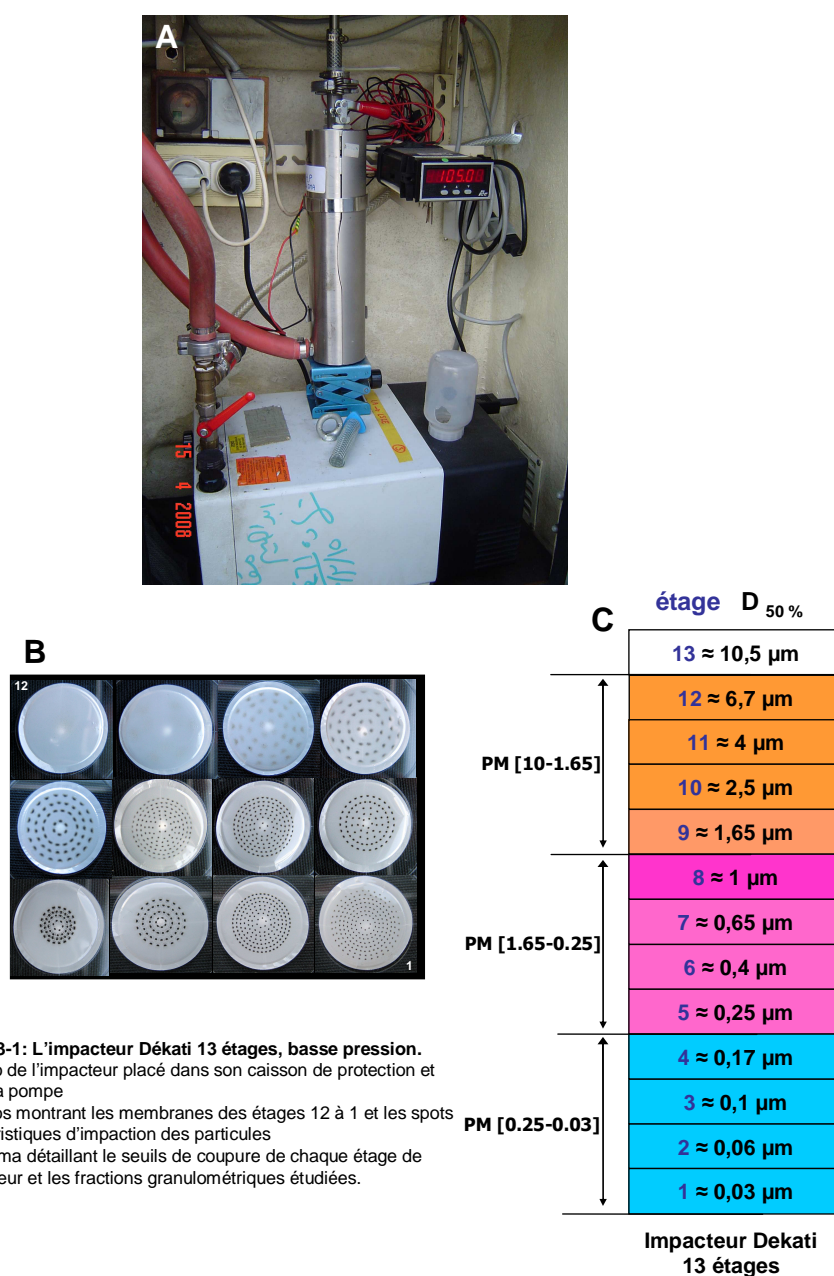
### 3- Méthodologies

#### 3-1 Collecte des échantillons

Cinq impacteurs basse pression Dekati à 13 étages ont été utilisés (figure 3-1), l'un fonctionnant à un débit de 20 L/mn, les quatre autres à 30 L/mn. Ces appareils permettent de séparer les aérosols en fonction de leur taille, en 13 fractions de 10 µm jusqu'à 30 nm (figure 2C). L'air est aspiré au moyen de pompes à vide à une pression de sortie d'impacteur de 100 mbar (Figure 3-1A), pression permettant la collecte des particules ultrafines.

Chaque impacteur est attribué à une analyse spécifique (tableau 3-1) et en conséquence est équipé des membranes adaptées à chacune de ces analyses à savoir

- des membranes en téflon (Zefluor) pour la gravimétrie, les ions et le carbone soluble (noté ION sur le tableau 3-1)
- des membranes en polycarbonate (Nucléopore) pour les études toxicologiques (noté EPI ou ENDO sur le tableau 1 pour cellules épithéliales et cellules endothéliales respectivement)
- des membranes en fibre de quartz pour les mesures de carbone (noté CAR) et les dosages de HAP et pesticides (noté HP).



**Figure 3-1: L'impacteur Dekati 13 étages, basse pression.**  
 A: photo de l'impacteur placé dans son caisson de protection et relié à la pompe  
 B: photos montrant les membranes des étages 12 à 1 et les spots caractéristiques d'impaction des particules  
 C: schéma détaillant les seuils de coupure de chaque étage de l'impacteur et les fractions granulométriques étudiées.



**Figure 3-2: illustrations de la station à la porte d'Auteuil en bordure du périphérique parisien.**  
A: Les impacteurs sont placés sur le toit de l'édifice et placés dans des caissons de protection  
B: photo prise du toit de l'édifice montrant le périphérique et une voie de circulation sur le pont



### **3-1-1 : Campagne en zone urbaine de proximité du trafic**

Les impacteurs ont été installés à Paris, Porte d'Auteuil en bordure du périphérique au niveau de la station utilisée par Airparif pour le suivi de la qualité de l'air parisien. Il s'agit d'une station de proximité du trafic. Les impacteurs ont été placés sur le toit d'un petit édifice situé à quelques mètres des voies de circulation (Figure 3-2).

Six séries de prélèvements ont été menées entre le 1 et le 22 avril 2008 (Tableau 3-1) avec seulement 4 impacteurs pour les 5 premières. Les prélèvements ont été faits de façon continue pour des durées oscillant entre 67 et 95 heures (Tableau 3-1)

### **3-1-2 : Campagne en zone rurale**

Le site rural sélectionné est situé à Oisonville en Eure-et-Loir (28) à 55 km au nord d'Orléans, au cœur de la Beauce chartraine (Figure 3-3). Il s'agit d'une station utilisée par Lig'Air pour le suivi de la qualité de l'air en région Centre. Cette zone est caractérisée par une activité agricole importante axée principalement sur les grandes cultures céréalières (Figure 3-4). On trouve principalement autour de la station des cultures de printemps : blé, orge, maïs, colza et des cultures d'été : betterave, pois, pomme de terre.



**Figure 3-3: illustrations de la station rurale située à Oisonville en région centre.**  
A: vue satellite montrant la localisation du site  
B: photo de la station de prélèvement située à proximité de cultures de céréales  
C: détail de la station montrant les impacteurs sur le toit

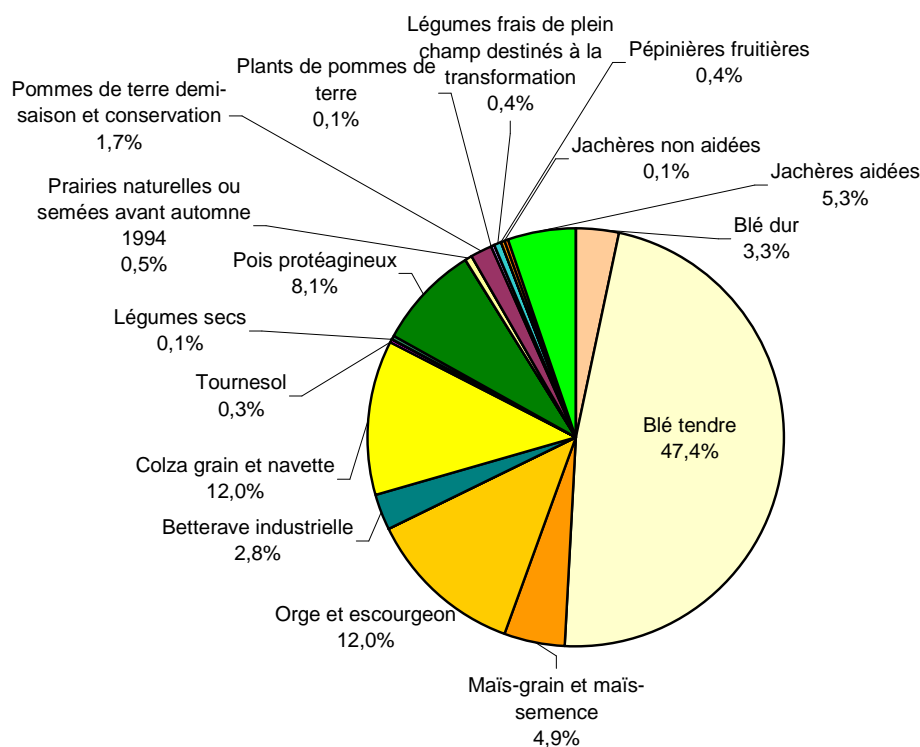


Figure 3-4 : types de cultures sur le canton d'Auneau (Source : Agreste – Recensement Agricole 2000)

En 2008, sept séries de prélèvements ont été menées entre le 25 avril et le 6 juin (Tableau 3-1). Les prélèvements ont été faits de façon continue sur 4 jours pour les 2 premiers prélèvements puis sur une semaine pour les suivants, les concentrations de particules beaucoup plus faibles ici qu'à Auteuil nécessitant des temps de prélèvement plus longs. La campagne initialement prévue sur 3 semaines a été poursuivie durant 3 autres semaines afin d'échantillonner davantage de particules. Cependant pour ces 3 semaines, seuls 3 impacteurs restaient disponibles. Aussi, l'analyse chimique n'a pu être réalisée dans son intégralité.

En raison d'une part des faibles quantités recueillies qui ont limitées le nombre d'expériences biologiques possibles et d'autre part d'une campagne de prélèvement décalée par rapport à l'usage des pesticides cette année là, nous avons décidé de refaire une seconde campagne de prélèvement en 2009 avec des séquences de prélèvement plus longues.

En 2009, cinq séries de prélèvements ont été menées entre le 30 mars et le 8 juin (Tableau 3-1). Les prélèvements ont été faits de façon continue sur 15 jours. Cependant pour les 2 derniers prélèvements, seuls 3 impacteurs restaient disponibles et de nouveau l'analyse chimique n'a pu être réalisée dans son intégralité. De plus le premier prélèvement (semaines 14/15) et le dernier (semaines 22/23) ayant été émaillés de problèmes techniques (certaines pompes en panne), ils n'ont pu être analysés en totalité.

En annexe I sont présentées les conditions météorologiques connues pendant les campagnes 2008 et 2009 à Oysonville.

## **3-2- Caractérisation physico-chimique des particules prélevées : Matériel et méthodes**

### **3-2-1 : Conditions d'analyses gravimétriques**

Les membranes en téflon dédiées à l'analyse des ions sont au préalable pesées afin de déterminer la masse de particules collectée sur chaque étage. Les mesures gravimétriques sont obtenues par pesées des membranes avant et après échantillonnage au moyen d'une balance de précision au microgramme (Mettler) dans un local à température régulée. Après un conditionnement de 24 h en dessiccateur, chaque membrane est pesée trois fois, et la moyenne des trois pesées retenue.

### **3-2-2 : Conditions d'analyses de la fraction particulaire carbonée**

Une autre série de membrane, en fibres de quartz, est dédiée à la quantification des espèces carbonées par méthode thermique. La membrane est coupée en deux. Une moitié sert à la détermination du

Carbone Total (TC) à 950°C, l'autre moitié subit une étape de précombustion (340°C pendant 2 heures) permettant d'éliminer le carbone organique (OC) tout en laissant présent sur la membrane le Black Carbon (BC). Après détermination du BC à 950°C, le carbone organique est calculé comme la différence TC – BC.

Les analyses comprendront les 2 fractions de l'aérosol carboné (le carbone-suie ou « black carbone » BC et le carbone organique OC) La fraction insoluble de l'aérosol sera évaluée par différence avec la masse totale obtenue par pesée. Cette méthode de fermeture chimique en masse de l'aérosol a été mise au point récemment au laboratoire (Guinot et coll., 2007b). Des analyses de carbone organique hydrosoluble (WSOC), permettront d'apprécier la facilité des polluants organiques à franchir la circulation systémique. Les outils analytiques ont été testés sur des aérosols urbains fractionnés par impacteurs Dekati 13 étages. Ils sont les suivants :

- pesée au microgramme sous atmosphère contrôlée (balance électronique Mettler)
- analyse coulométrique des fractions BC et OC (Coulomat 702C) après pré-traitement thermique (méthode mise au point au laboratoire, Cachier et coll., 1989)
- analyse du carbone WSOC (appareil TOC Sievers) après dissolution des aérosols en suivant un protocole nouvellement mis au point au laboratoire.

### **3-2-3 : Conditions d'analyses des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) et pesticides**

Les membranes d'une même classe granulométrique sont extraites au soxhlet avec un mélange d'hexane/diéthyléther (90/10 ou 95/5) pendant 16 heures, de 4 à 6 cycles par heure. Les échantillons sont marqués avec 500 nanogrammes d'octachloronaphtalène, qui tient lieu de marqueur avant extraction, de manière à estimer les pertes lors de la préparation de l'échantillon.

L'extrait obtenu est concentré à l'évaporateur rotatif. Après ajout de standards internes (mélange de HAP deutériés) utilisés pour la quantification, les extraits doivent être stockés à une température inférieure à -18 °C et à l'abri de la lumière. L'analyse est effectuée par Chromatographie en Phase gaz couplée à la Spectrométrie de Masse en basse résolution en mode SIM (Selected Ion Monitoring). On ne détecte que les masses des ions correspondant aux molécules ciblées, de manière à augmenter la sensibilité et la spécificité de l'analyse. L'ajout de 6 étalons internes deutérés permet de caractériser les problèmes chromatographiques pouvant intervenir lors de l'analyse. Ces étalons servent aussi à quantifier les analytes recherchés. La quantification s'effectue sur au moins deux fragments si possible par GC/MS. Les pourcentages de récupération des différents pesticides et HAP sont obtenus en dopant des filtres par un mélange des molécules recherchées à 500 ng. Après extraction et concentration, on dose les quantités de composés retrouvés dans les extraits. 17 HAP ont été dosés (Tableau 3-2)

#### **HAP dosés :**

Naphtalene	Chrysene
Acenaphtylene	Benzo(b)fluoranthene
Acenaphtene	Benzo(k)fluoranthene
Fluorene	Benzo(e)pyrene
Phenanthrene	Benzo(a)pyrene
Anthracene	Dibenzo(ah)anthracene
Fluoranthene	Indeno(1;2;3-cd)pyrene
Pyrene	Benzo(g;h;i)perylene
Benzo(a)anthracene	

**Tableau 3-2 : Liste des HAP recherchés**

#### **Pesticides dosés :**

56 pesticides ont été recherchés (tableau 3-3) à partir d'une sélection faite par Lig'air sur trois critères : Toxicité (prise en compte à travers la Dose Journalière Admissible, représentant la toxicité chronique), Tonnage (utilisation de la molécule active dans la région), Volatilité (prise en compte des molécules susceptibles d'être présentes dans l'air). Cette sélection est améliorée en introduisant un quatrième critère ponctuel « type de culture » qui permet de rendre compte de la spécificité du site d'étude.

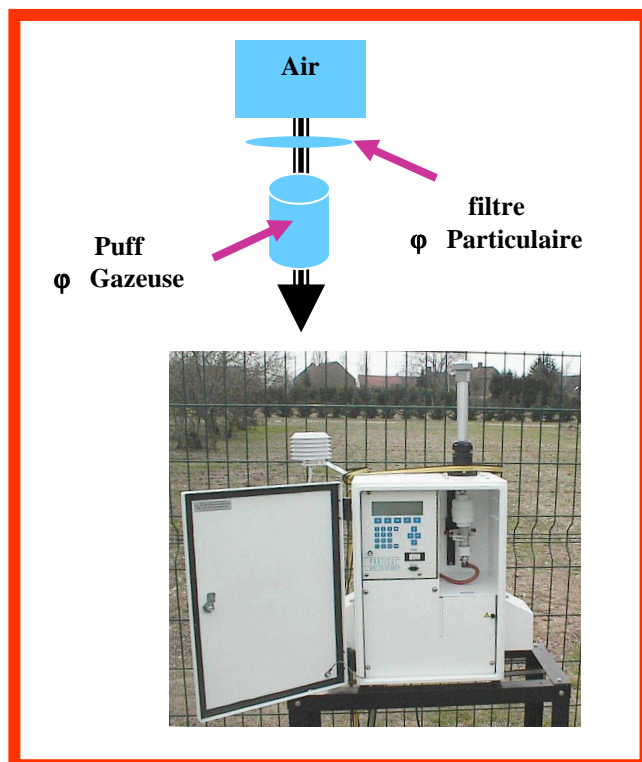
<b>Pesticides recherchés</b>	<b>Caractéristiques (famille + DJA (mg/kg/jour) + utilisation)</b>
2,4' DDD	Insecticide / 0,3 / interdit depuis 1972
2,4' DDE	Insecticide / 0,3 / interdit depuis 1972
2,4' DDT + 4,4' DDD	Insecticide / 0,3 / interdit depuis 1972
4,4' DDE	Insecticide / 0,3 / interdit depuis 1972
4,4' DDT	Insecticide / 0,3 / interdit depuis 1972
Aclonifen	Herbicide / 0,02 / pois, tournesol, lentille, pomme de terre ...
A-endosulfan	Insecticide / 0,006 / grandes cultures, arbo, légumes, rosiers/interdit depuis 2007
A-HCH	Insecticide / 0,008 / interdit depuis 1998
Acétochlore	Herbicide / 0,02 / maïs
Alachlore	Herbicide / 0,0005 / maïs, soja /Interdit
Azoxystrobine	Fongicide / 0,1 / grandes cultures, légumes, vigne
Captane	Fongicide / 0,1 / vigne, arbo
Carbaryl	Insecticide /0,008/pomme de terre, vigne, pêcher, pommier, asperge /interdit
Chlorothalonil	Fongicide / 0,03 / grandes cultures, légumes
Chlorpyrifos ethyl	Insecticide / 0,003 / vigne, pêcher, poirier, pommier
Cyprodinil	Fongicide / 0,03 / blé, orge, poirier, pommier
Diazinon	Insecticide / 0,002 / betterave, vigne, arbo, asperge, choux, rosiers
Dichlobenil	Herbicide / 0,01 / vigne, rosier, arbustes/interdit
Diflufenicanil	Herbicide / 0,25 / blé, orge
Dimenthomorphe I	Fongicide / 0,05 / vigne, arbustes et fleurs
Dimenthomorphe II	Fongicide / 0,05 / vigne, arbustes et fleurs
Dimethenamide	Herbicide / 0,04 / maïs, gazons /interdit
Epoxiconazole	Fongicide / 0,005 / grandes cultures
Esfenvalerate	Insecticide / 0,007 / grandes cultures, arbo, légumes, fleurs
Ethofumesate	Herbicide / 0,3 / betterave, haricot
Ethoprophos	Insecticide / 0,0003 / pomme de terre, légumes
Ethyl parathion	Insecticide / 0,006 / interdit depuis 2003
Fenoxycarbe	Insecticide / 0,1 / vigne, noyer, pêcher, poirier, pommier, prunier
Fenpropridine	Fongicide / 0,005 / blé, orge
Fenpropimorphe	Fongicide / 0,003 / blé, betterave, orge, tournesol
Fluazinam	Fongicide / 0,01 / pomme de terre, vigne
Fludioxonil	Fongicide / 0,033 / vigne
Folpel	Fongicide / 0,1 / pois, pomme de terre, vigne, pommier, poirier
Lindane	Insecticide / 0,001 / interdit depuis 1998
Iprodione	Fongicide / 0,06 / GC, vigne, arbres fruitiers, légumes, arbres ornement
Malathion	Insecticide / 0,3 / grandes cultures, vigne, arbo, légumes
Metazachlore	Herbicide / 0,036 / choux, colza
Methidathion	Insecticide / 0,001 / arbo (! 2004 et 2007 !) / interdit depuis 2007
Methomyl	Insecticide / 0,03 / lin, vigne, arbres fruitiers, cultures légumières, rosier, plantes à parfum
Methyl parathion	Insecticide / 0,003 / interdit depuis 2003
Métolachlore	Herbicide / 0,03 / interdit depuis 2003
Oryzalin	Herbicide /0,05 / vigne, arbres fruitiers, bananier, asperges
Oxadiazon	Herbicide / 0,0036 / riz, vigne, arbo, arbustes, carotte, persil ...
Oxydemeton-S-methyl	Insecticide / 0,0003 / betterave, poirier, pommier, rosier
Oxyfluorene	Herbicide / 0,004 / vigne, arbo
Pendimethaline	Herbicide / 0,05 / légumes, grandes cultures, vigne, arbo, tabac
Phosmet	Insecticide / 0,01 / noyer, poirier, pommier, pomme de terre
Propachlor	Herbicide / 0,05 / choux, poireau, oignon
Propargite	Insecticide / 0,02 / arboriculture, houblon , maïs, vigne
Propyzamide	Herbicide / 0,085 / grandes cultures, arbo, légumes, forêt
Prosulfocarbe	Herbicide / / blé tendre, orge d'hiver, seigle d'hiver, triticale, pomme de terre
Spiroxamine	Fongicide / 0,025 / grandes cultures, vigne
Tébutame	Herbicide / 0,15 / interdit depuis 2003
Tolyfluanide	Fongicide / 0,1 / amandier, noisetier, pommier, poirier
Trifluraline	Herbicide / 0,0024 / colza, soja, tournesol, choux, arbustes/interdit depuis 2009
Vinchlozoline	Fongicide / 0,005 / vigne, arbo, légumes, oléagineux/ interdit

**Tableau 3-3 : Liste des pesticides recherchés, leurs propriétés, dose journalière admissible en mg/kg/jour et utilisation**



Lors des campagnes et parallèlement à l'étude par impaction, des prélèvements hebdomadaires des phases gazeuse et particulaire des pesticides ont été réalisés avec un débit de  $1 \text{ m}^3/\text{h}$  et sans coupure granulométrique (utilisation d'une tête TSP) (figure ci-contre). Ces derniers prélèvements ont été réalisés dans le cadre du programme de surveillance des pesticides en région Centre par Lig'Air.

Les résultats de ces prélèvements seront utilisés dans le cadre de cette étude, afin de compléter l'information comportementale des pesticides observés par impaction ainsi que pour situer notre campagne vis-à-vis des concentrations totales en pesticides dans l'air.



**systeme de prélèvement des pesticides suivant la norme NFX 43-058**

### **3-2-4 : Conditions des analyses morphologiques des particules**

Sur chaque site, des prélèvements de courte durée (15 mn à 2 heures) ont été réalisés directement sur des grilles de microscopie électronique de 200 mesh recouvertes de membranes en polycarbonates métallisées au carbone afin d'accéder aux caractéristiques morphologiques des particules individuelles. Ces grilles étaient disposées sur chacun des 13 étages d'impaction d'un impacteur Dekati.

Les observations sont réalisées avec un Microscope Electronique à Transmission Analytique (Jeol Temscan 1200EXII). Des photos sont réalisées au moyen d'une caméra numérique Gatan-Erlangshen ES500W et analysées à l'aide d'un logiciel d'analyse d'image (Microvision-Saisam) afin de documenter les paramètres géométriques des particules : diamètre géométrique, facteur de forme, surface.

La composition chimique élémentaire peut être obtenue au moyen d'un spectromètre dispersif en énergies de rayons X (Link Isis 300, Oxford).

### **3-3– Analyses biologiques : Matériel et méthodes**

#### **3-3-1 : Méthode de récupération des particules pour les tests biologiques**

Les membranes sont découpées en deux ou trois et les bordures éliminées. L'ensemble des morceaux de membranes correspondant à une même classe granulométrique de particules est soniqué dans quatre tubes Eppendorf contenant chacun  $300 \mu\text{L}$  de milieu de culture DMEM-F12 (Life Technologies) sans rouge de phénol et avec hépès, trois fois 5 secondes à 60 W (Ultrasonic processor, Bioblock scientific). Les membranes sont soniquées par morceaux afin de rester dans le minimum de liquide car les particules se détachent mieux puisque plus proches de la source d'ultrasons. Enfin le contenu des quatre tubes est mis en commun et les tubes sont rincés pour donner la solution de particules correspondant à une classe de taille définie dans un volume final de  $1700 \mu\text{L}$ , solution qui servira pour les différents tests biologiques. En parallèle, la même procédure est reproduite avec des membranes vierges afin de déterminer l'effet de la sonication, du milieu de culture et des membranes sur les cellules.

L'effet des suspensions particulaires correspondant à chaque classe granulométrique de particules est évalué par rapport à l'effet provoqué par les membranes vierges soniquées dans du milieu de culture. Les suspensions particulaires sont conservées au congélateur jusqu'à utilisation ; elles sont alors

brèvement soniquées (3 fois 20 sec) après décongélation, diluées selon la concentration voulue et ramenées à 37°C par incubation au bain-marie puis appliquées sur les cellules.

### **3-3-2 : Culture cellulaire**

#### **Cellules épithéliales bronchiques humaines :**

##### **\* Lignée 16HBE**

Les expériences ont été menées sur la lignée 16HBE<sup>o-</sup>, fournie par le Dr Gruenert (Colchester, Vermont University). Il s'agit d'un clone de cellules immortalisées, obtenues par transfection du gène T du virus SV40 de cellules épithéliales bronchiques d'un petit garçon d'un an ayant subi une greffe cœur-poumon. Elles ne présentent pas d'inhibition de contact et ne développent pas de cils en culture, mais gardent certains marqueurs épithéliaux tant qu'elles ne sont pas confluentes.

La lignée est cultivée dans des flacons plastiques de 75cm<sup>2</sup> (Costar, Cambridge, MA, USA) contenant 12 ml de milieu de culture Dubelcco's Modified Eagle Medium – Nutrient Mixture F12 HAM (DMEM-F12, Life Technologies) complété avec de la pénicilline (100 U/ml, Sigma), de la streptomycine (100 µg/mL, Sigma), 2% d'UltroserG (UG, Life technologies), 0,3 mg/mL de glutamine (Sigma) et 1 µg/mL de fungizone (Life Technologies).

Les supports de culture (flacons plastiques de 25 ou 75 cm<sup>2</sup>, plaques 24 puits ; Costar, Cambridge, MA, USA) sont préalablement recouverts par du collagène de type I bovin à 4 µg/cm<sup>2</sup> à partir d'une solution de collagène I bovin (Vitrogen 2,9 mg/ml, BD Laboratories), fibronectine humaine (1 mg/ml, BD Laboratories), BSA (Bovine Serum Albumine 1mg/ml, Biosource Int't/Biofluids343-020) dans du milieu basal LHC (Biosource Int't/Biofluids343-020).

Les cellules sont incubées en atmosphère humide à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> et un pH de 7,4. Les milieux sont renouvelés tous les deux jours, et les passages sont effectués une fois par semaine : les cellules sont décollées par de la trypsine (0,05%)-EDTA (acide éthylène glyco-bis-(amino éthyléte)N,N,tétraacétique (0,2 mg/mL)) (Life Technologies) pendant 10 min; l'action de la trypsine est inhibée par 2% d'UG et les cellules sontensemencées à la densité voulue.

Les cellules sont mises en présence de milieu de culture DMEM/F12 sans rouge de phénol avec Hépès dépourvu d'UG 4h avant les traitements afin d'éviter les interactions entre l'UG et les toxiques, et d'éviter toute interférence des facteurs de croissance de l'UG.

Les cellules ont étéensemencées à 20000 cellules par cm<sup>2</sup> et traitées 2 jours plus tard pendant 24h.

##### **\*Cultures primaires de cellules de cornets nasaux (NHNE)**

Des cellules épithéliales nasales primaires humaines ont été récupérées de cornets nasaux issus de biopsies de patients. Les cellules ont été détachées du cornet, dissociées et congelées dans l'azote. Les cellules ont été décongelées etensemencées en flacon de 25 cm<sup>2</sup> dans 4 mL de milieu contenant 50% de BEGM (Lonza) et 50% de DMEM/F12 blanc contenant les mêmes additifs (Lonza) que le BEGM, c'est à dire : Vitamine A (0,1 µM), Triodothyrosine (6,5 ng/mL), Transferrine (10 µg/mL), Insuline (0,5 µg/mL), Hydrocortisone (0,5 µg/mL), Epinéphrine (0,5 µg/mL), Epidermal growth Factor (25,5 ng/mL), Serum Albumin Bovine (1,5 µg/mL), Gentamicyne (50 µg/mL), Amphotericine (50 ng/mL), Extrait Pituitaire Bovin (0,13 mg/mL). Ces cellules sont cultivées jusqu'à subconfluence et traitées aux passages 1 à 2.

#### **Cellules endothéliales (HPAEC):**

Les expérimentations sont réalisées sur des primocultures de cellules endothéliales vasculaires pulmonaires humaines (HPAEC) commercialisées par PromoCell. Les cellules sont cultivées, dans des flacons de 25cm<sup>2</sup>, dans du milieu ECGM (PromoCell) supplémenté avec du sérum de veau fœtal, de l'ECGS, de l'EGF, du VEGF 165, de l'acide ascorbique, de l'héparine et de l'hydrocortisone selon les recommandations du fournisseur (PromoCell).

Les cellules sont incubées en atmosphère humide à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, pH7,4. Les milieux sont renouvelés tous les deux jours. Les cellules sont cultivées jusqu'à subconfluence et traitées entre les passages 2 et 5.

Pour les diverses expérimentations réalisées, les cellules sont détachées du support à l'aide d'un kit spécifique contenant de l'HEPES, de la trypsine/EDTA ainsi qu'un inhibiteur de trypsine (TNS) selon les recommandations du fournisseur (PromoCell).

### **3-3-3 : Evaluation de la cytotoxicité par insertion d'Iodure de propidium**

La cytotoxicité a été évaluée par la mesure de l'insertion de l'iodure de propidium. Ce fluorochrome ne rentre que dans les cellules mortes. Après le traitement de 24 h par les particules, les cellules sont détachées du support de culture par trypsination puis incubées en présence d'iodure de propidium à 20

µg/mL. Elles sont immédiatement analysées en cytométrie de flux (CyAn LX, DakoCytomation, Trappes, France) qui permet de compter le nombre de cellules mortes sur 10000 cellules analysées.

#### **par évaluation de l'activité métabolique : test WST-1**

La viabilité cellulaire a également été évaluée par la mesure de l'activité métabolique par le test dit WST-1. Le test WST-1 (Water Soluble Tétrazolium) est un test colorimétrique basé sur la transformation d'un sel de tétrasolium en un substrat coloré soluble : le formazan, par des déshydrogénases mitochondriales des cellules viables. Ce test est réalisé grâce à un kit de dosage (Cell Proliferation Reagent WST-1, Roche). Les cellules sontensemencées à 20000 cellules par puits dans des plaques de 96 puits, dans du milieu DMEM/F12 complet (pour les cellules 16HBE) ou du milieu ECGM complet (pour les cellules endothéliales). Après 24 h les cellules subconfluentes sont traitées avec les particules durant 24h dans le DMEM/F12 ou de l'ECGM sans rouge de phénol ni ultrosor G (UG). A l'issue de ce traitement, le milieu de culture est enlevé et les cellules sont rincées avec du milieu DMEM/F12 ou du milieu ECGM sans rouge de phénol ni UG puis elles sont incubées pendant 2h à 37°C avec une solution de WST-1 diluée au 1/10 dans du DMEM/F12 ou du milieu ECGM sans rouge de phénol ni UG. Finalement, l'absorbance est mesurée par un lecteur de plaque (DYNEX MRX 5000, Dynatech Laboratories) à une longueur d'onde de 450 nm.

#### **3-3-4 : Mesure de l'expression des gènes par PCR quantitative**

L'étude de l'expression des gènes est réalisée par RT-PCR.

Les ARN totaux ont été extraits de cellules 16HBE et de cellules HPAEC respectivement à l'aide du kit d'extraction SV Total RNA Isolation system (Promega, Charbonnières, France) et du kit total RNA isolation Nucleospin RNA II (Machery – Nagel, France) selon les recommandations des fournisseurs. Une étape de rétro-transcription (RT) des ARN en ADN complémentaires a été réalisée à partir d'1 µg d'ARN totaux en présence de 200 U/µL de l'enzyme RT M-MuLV Reverse Transcriptase (M-MLV Reverse Transcriptase Kit, Promega), ou de 20 U/ µL de l'enzyme AMV – RT Reverse Transcriptase (Sigma), de tampon 5 X de RT, de 20µg/mL d'amorces oligo-dT (Roche Applied Sciences, Meylan, France, ou Sigma), de 40 U/µL d'inhibiteur de RNase (Promega) et de 0,5 mM de dNTP, selon le protocole fourni par Promega ou Ozyme. L'expression de l'ARNm des gènes d'intérêt est ensuite déterminée par PCR quantitative grâce au kit platinum® SYBR® green qPCR SuperMix-UDG en suivant le protocole indiqué par le fournisseur (Stratagene, La Jolla, CA, USA ou Ozyme). La PCR quantitative en temps réel consiste ensuite à amplifier une cible particulière d'acides nucléiques (ADN génomique ou ADN complémentaire) en présence de fluorochromes, dont l'émission de fluorescence sera proportionnelle à la quantité de cibles dans le milieu réactionnel. Cette technique permet de suivre en temps réel l'amplification grâce à l'enregistrement de la fluorescence des échantillons à chaque cycle à l'aide d'un fluorimètre (MX3000P QPCR System, Stratagene ou Rotor – gene 2000, Real time cycler, Corbett Research) et de quantifier précisément, pendant la phase exponentielle de la PCR, la quantité initiale d'ADNc dans un échantillon.

On utilise une référence (encore appelée gène de ménage) pour calculer l'expression des gènes : RPL19 (Ribosomal Protein L19) dont l'ARNm est connu pour avoir une expression constante dans la cellule dans nos conditions de manipulation. Les cycles de sortie (Ct) (correspondant au début de la phase d'amplification de l'ADN lors des réactions de PCR) des échantillons dépendent de la quantité initiale en ADNc. Les Ct correspondant à chaque échantillon sont respectivement normalisés avec ceux de RPL-19 pour déterminer la variabilité dans les concentrations d'ARNm entre les échantillons obtenus. On obtient alors le ΔCt des gènes d'intérêt (GOI : Gene Of Interest) et du gène de ménage (Norm : normalisateur) :

$$\Delta Ct_{GOI} = (Ct_{GOI\text{témoin}} - Ct_{GOI\text{unknown}})$$

$$\Delta Ct_{norm} = (Ct_{norm\text{témoin}} - Ct_{norm\text{unknown}})$$

Ensuite, les ΔCt sont normalisés à l'efficacité (E) de la réaction de PCR, déterminée grâce à la réalisation d'une gamme avec un ADNc témoin dilué de 1/5 à 1/500 :

$$(1 + E_{norm})^{\Delta Ct_{norm}}$$

$$(1 + E_{GOI})^{\Delta Ct_{GOI}}$$

Enfin, un rapport de ces deux calculs est réalisé afin d'obtenir la quantité relative d'ADNc pour chaque échantillon par rapport au témoin :

$$RQ = \frac{(1 + Eff_{GOI})^{\Delta Ct_{GOI}}}{(1 + Eff_{norm})^{\Delta Ct_{norm}}}$$

Les cycles de PCR sont :

	Cycles de PCR	Fonction
<b>40x</b>	2 min 50°C	Activation de l'Uracile D glycosylase (UDG)
	2 min 95°C	Dénaturation de l'UDG et activation de la polymérase « hot start »
	20 sec 95°C	Dénaturation de la matrice
	30 sec 58°C	Hybridation des amorces sur les brins d'ADN
	30 sec 72°C	Elongation de la matrice d'ADN (brin néoformé)
	1 min 95°C	Dénaturation des ADN
	55°C → 95°C	Courbe de fusion de la matrice

Les séquences des amorces utilisées (Invitrogen, Paisley, UK ou Sigma) sont les suivantes :

**RPL19** (amplicon de 179pb, Tm 87,10°C)

Sens : 5' GGC TCG CCT CTA GTG TCC TC 3'

Antisens : 5' CAA GGT GTT TTT CCG GCA TC 3'

**GM-CSF** (CSF-2 ; amplicon de 115 pb, Tm : 88°C) :

Sens : 5' AGC CGA CCT GCC TAC AGA C 3'

Anti-sens : 5' GGG CAG TGC TGC TTG TAG TG 3'

**CYP1A1** (amplicon de 200 pb, Tm 86,6°C(16 HBE) ou Tm64°C (HPAEC)) :

Sens : 5' GAG CCT CAT GTA TTT GGT GAT G 3'

Anti-sens : 5' TTG TGT CTC TTG TTG TGC TGT G 3'

**HO-1** (amplicon de 169 pb, Tm 87,1°C (16HBE) ou Tm 64,1° C (HPAEC)) :

Sens : 5' CAG GCA GAG AAT GCT GAG TTC 3'

Anti-sens : 5' GCT CTT CTG GGA AGT AGA CAG 3'

**IL-6** (amplicon de 177 pb, Tm 83,2 °C) :

Sens : 5' ACA GCC ACT CAC CTC TTC AG 3'

Anti-sens : 5' TGG AAG CAT CCA TCT TTT TC 3'

**TNF $\alpha$**  (amplicon de 174 pb, Tm 89,35°C, ou Tm 62.5°C) :

Sens : 5' GCT CCC CAA GAA GAC AGG 3'

Anti-sens : 5' GCC AGA GGG CTG ATT AGA 3'

**GSTP1** (amplicon de 133 pb, Tm 85,95°C, ou Tm 65,4°C) :

Sens : 5' CGG GCA AGG ATG ACT ATG TG 3'

Anti-sens : 5' TCC AGC AGG TTG TAG TCA GC 3'

**SOD2** (amplicon de 173 pb, Tm 82,45°C, ou Tm 66,9°C) :

Sens : 5' TTG TCC AAA TCA GGA TCC AC 3'

Anti-sens : 5' TGC AAG CCA TGT ATG ATC TTT CAG 3'

**IL-8** (amplicon de 76 pb, Tm 58,6°C) :

Sens : 5' GTGTAAACATGACTTCCAAGCTGG 3'

Anti-sens : 5' GCACCTTCACACAGAGCTGC 3'

**eNOS**: (amplicon de 116 pb, Tm 60,8°C)

Sens : 5' GTG TTT GGC CGA GTC CTC ACC 3'

Anti-sens : 5' CTC CTG CAA GGA AAA GCT CTG 3'

Les amorces de plusieurs gènes (IL-6, TNF $\alpha$ , GSTP1 et SOD2) ont été sélectionnées et validées au préalable. Pour cela, la séquence de chaque gène d'intérêt a été utilisée pour déterminer les séquences de différentes amorces. Celles-ci ont été testées par PCR standard afin de sélectionner les amorces donnant le maximum de produits spécifiques tout en évitant l'apparition de produits non spécifiques.

### **3-3-5 : Dosage des sécrétions de cytokines pro-inflammatoires et de facteurs de croissance par test ELISA**

Les cellules ont étéensemencées à 20000 cellules par cm<sup>2</sup> dans du DMEM/F12 complet en plaques 12 puits et traitées 2 jours plus tard. Après traitement, les surnageants de culture sont récupérés et conservés à -20°C. Ils sont ensuite centrifugés pour éliminer les particules et les débris cellulaires. Le GM-CSF, l'IL-6 ou l'Amphiréguline sont ensuite dosés selon la méthode ELISA (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay) en utilisant le protocole indiqué par le fournisseur (kit ELISA DuoSet GM-CSF, IL-6 ou AR ; R&D Systems). Ce test est un ELISA en sandwich : des anticorps de capture et de détection sont utilisés pour piéger l'antigène en sandwich. L'anticorps de détection qui est lié à la biotine va permettre de révéler ce complexe grâce à l'ajout de Streptavidine liée à la HRP (Horseradish Peroxidase) qui va catalyser une réaction chimique colorimétrique en présence d'une solution substrat (R&D systems). Un lecteur de plaque est ensuite utilisé pour lire la DO à 450 nm (MRX 500, Dynatech Laboratories) et la quantité de protéine est ensuite déterminée par rapport à une gamme standard.

Pour étudier le rôle de endotoxines dans la réponse pro-inflammatoire, les cellules ont été tout d'abord prétraitées pendant 30 min avec soit rENP (recombinant Endotoxin Neutralizing Protein, Sigma) à 2µg/ml, soit avec l'anticorps bloquant le récepteur TLR4 (appelé Ac TLR4, R&D Systems) à 10µg/ml ou bien avec du milieu blanc. Les cellules sont ensuite traitées 24h avec les particules et/ou rENP et Ac TLR4. Les surnageants sont récupérés pour le dosage de cytokines par la méthode ELISA.

### **3-3-6 : Test EROD : mesure de l'activité enzymatique du CYP1A1**

Le cytochrome P450 1A1 est une enzyme du métabolisme des xénobiotiques de phase I qui époxyde les HAP intracellulaires. Il est faiblement exprimé au niveau constitutif et son expression peut être induite par les HAP via le facteur AhR. La mesure du CYP1A1 s'effectue sur des cellules épithéliales nasales humaines en culture primaire exposées aux particules. Les cellules sont cultivées à 80% de confluence dans des plaques 48 puits et traitées 24h avec les particules. Après rinçage, les cellules sont incubées avec une solution de salicylamide (Sigma, 2mM final) et d'éthoxyrésorufine (ERO, Sigma, 5µM final), à 37°C. L'ERO est alors transformé en un produit fluo rescent par le CYP1A1 (longueur d'onde d'excitation 530nm ; longueur d'onde d'émission 590nm). L'apparition de ce produit est mesurée grâce à un lecteur de plaque (FluoStar, BMG Labtech, Champigny sur Marnes, France) toutes les 2 minutes pendant 40 minutes.

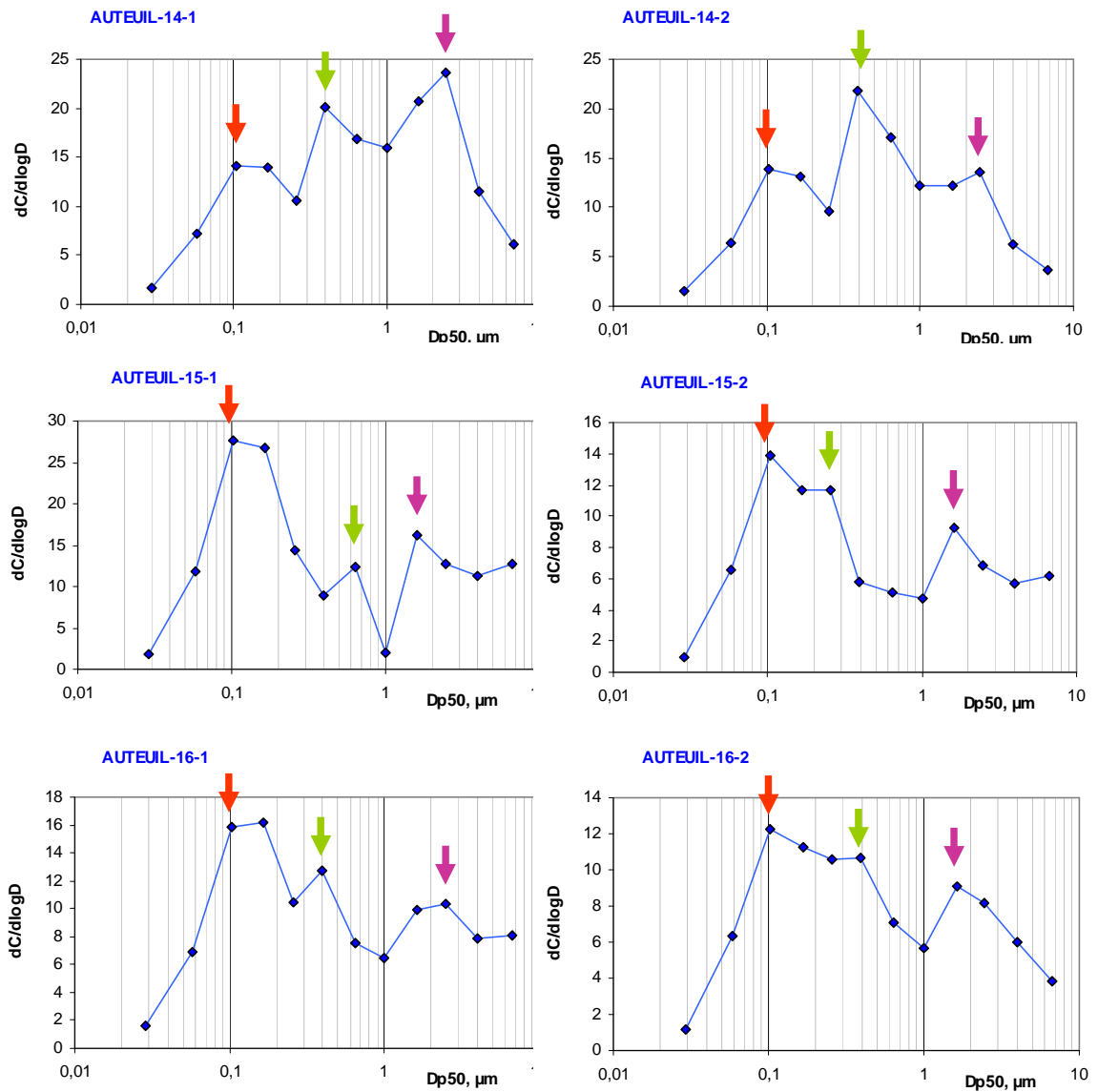
### **3-3-7 : Test hydroxyéthidine : mise en évidence d'une augmentation intracellulaire d'anion superoxyde**

La mesure de la production d'anion superoxyde a été effectuée sur les cellules 16HBE subconfluentes en plaques 24 puits exposées pendant 4h aux particules, grâce à la sonde hydroxyéthidine (HE) qui fluoresce lorsqu'elle est oxydée par l'anion superoxyde (longueur d'onde d'excitation 488 nm ; longueur d'onde d'émission 620 nm). Après traitement, les cellules ont été décollées à l'aide de trypsine (0,05%)-EDTA pendant 5 min. L'action de la trypsine est inhibée par l'ajout de 2% UG, les cellules sont alors incubées 10 min à 37°C avec une solution d'HE (Invi trogen) à 1 µM final. La fluorescence est ensuite analysée sur 10000 cellules au cytomètre de flux (CyAn LX, DakoCytomation, Trappes, France).

### **3-3-8 : Test dichlorofluorescéine diacétate : mise en évidence d'une augmentation intracellulaire d'espèces réactives de l'oxygène**

La mesure de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) a été effectuée sur les cellules HPAEC subconfluentes exposées pendant 4h aux différentes particules, grâce à une sonde H<sub>2</sub>DCF – DA. La 2', 7' – dichlorofluorescéine diacétate (Sigma) est non fluorescente à l'état acétylé et réduit. Dans la cellule, les groupes acétylés en 2' et 7' de cette molécule sont coupés par des estérases pour donner la molécule H<sub>2</sub>DCF non fluorescente. Après cette déacétylation, cette molécules est oxydée par les ERO en une molécule fluorescente (longueur d'onde d'excitation 485 nm ; longueur d'onde d'émission 520 nm). Après traitement, les cellules sont détachées par grattage dans le milieu de culture puis homogénéisées. La fluorescence est déterminée grâce à un lecteur de plaque (Optima, BMG Labtech).

## Station urbaine de proximité du trafic: Porte d'Auteuil



**Figure 5-1: Profils granulométriques des six prélèvements réalisés entre le 1 et 22 avril 2008.**

Flèche rouge: mode ultrafin  $\rightarrow 0,1 \mu m$

Flèche verte: mode accumulation  $\rightarrow \approx 0,4 \mu m$

Flèche violette: mode grossier  $\rightarrow \approx 2,5 \mu m$

## 5- Résultats

### 5-1 : Distribution granulométrique

A Auteuil (Figure 5-1, ci-contre), on observe pour tous les prélèvements un profil granulométrique avec trois modes bien distincts : le mode ultrafin centré sur 0,1  $\mu\text{m}$ , le mode fin ou accumulation centré sur 0,4  $\mu\text{m}$  et enfin le mode grossier centré sur 2,5  $\mu\text{m}$ . L'importance du mode ultrafin est particulièrement remarquable et s'explique par la proximité du trafic.

Par contre à Oysonville (Figure 5-2, ci-dessous), la distribution granulométrique révèle essentiellement 2 modes : le mode fin centré sur 0,4  $\mu\text{m}$  et le mode grossier centré sur 2,5  $\mu\text{m}$ . Il en est de même en pour les prélèvements réalisés en 2009 (Figure 5-3). Les masses recueillies sont plus faibles qu'à Auteuil (Figure 5-4).

### Station rurale: Oysonville (Eure et Loire)

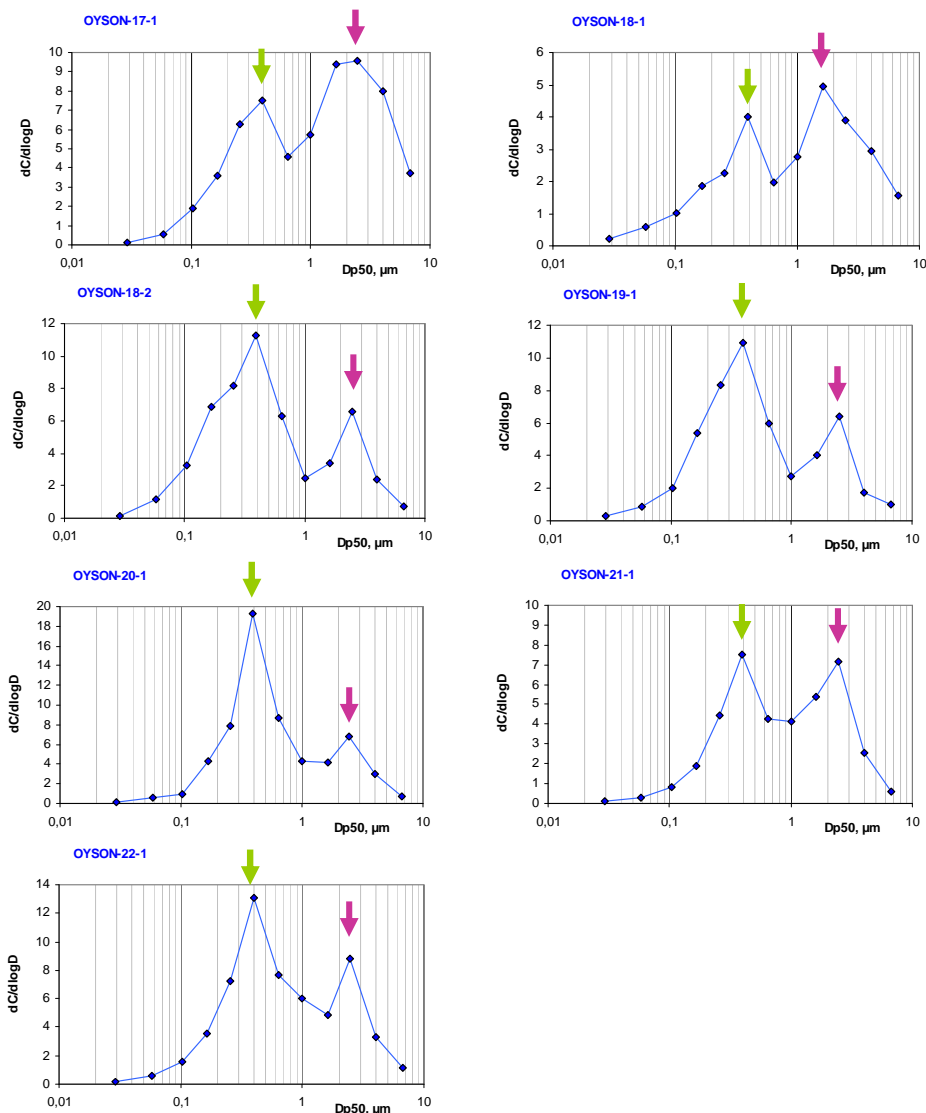
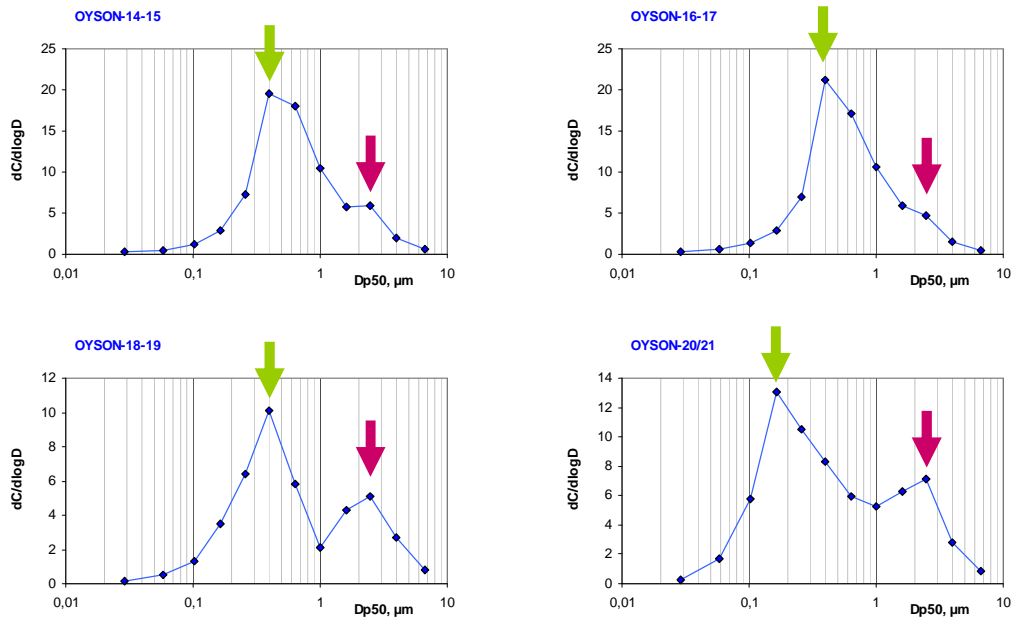


Figure 5-2: Profils granulométriques des sept prélèvements réalisés entre le 29 avril et 30 mai 2008.

Flèche verte: mode accumulation  $\rightarrow \cong 0,4\mu\text{m}$

Flèche violette: mode grossier  $\rightarrow \cong 2,5\mu\text{m}$

## Station rurale: Oysonville 2009

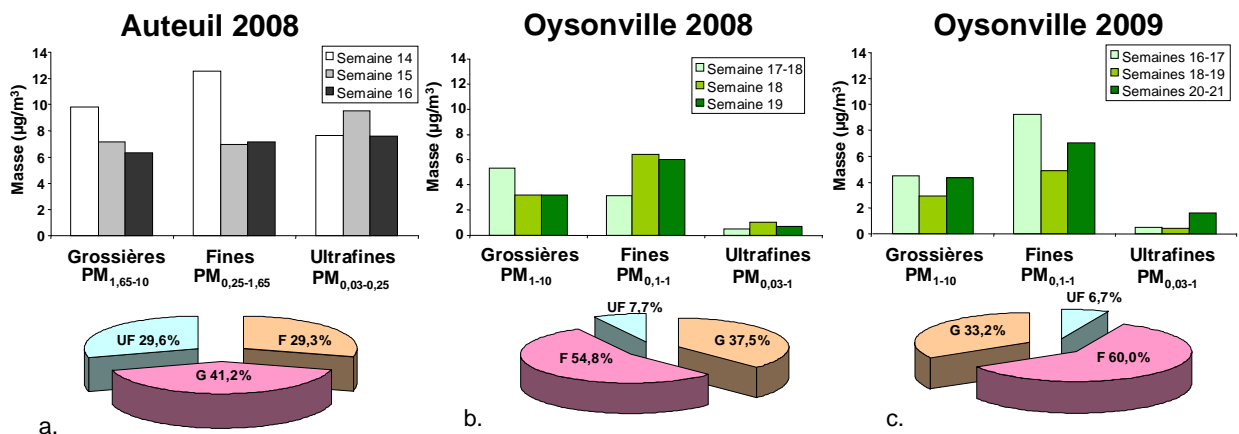


**Figure 5-3: Profils granulométriques des quatre prélèvements réalisés entre le 31 mars et 22 mai 2009.**

Flèche verte: mode accumulation  $\rightarrow \cong 0,4\mu\text{m}$

Flèche violette: mode grossier  $\rightarrow \cong 2,5\mu\text{m}$

L'analyse des distributions relatives en masse des différentes fractions granulométriques souligne à nouveau l'importance de la fraction ultrafine en proximité du trafic (figure 5-4b) par rapport au site rural mais également par rapport à un site urbain de fond (Figure 5-5, données acquises dans un précédent projet selon une méthodologie de prélèvements des particules similaires, Primequal-PUFFIN1). Ceci suggère que les particules ultrafines générées par le trafic subissent une agrégation rapide aboutissant à un accroissement du mode accumulation durant leur vieillissement et leur transport vers un site de fond. La distribution relative observée en zone rurale est similaire à celle observée en site urbain de fond.

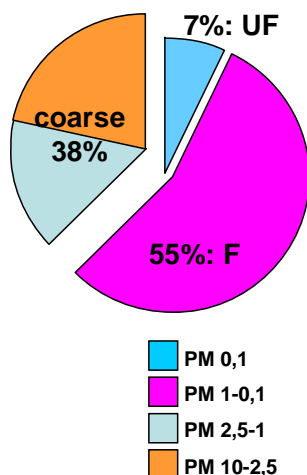


**Figure 5-4: Distribution en masse des différentes fractions granulométriques d'intérêt pour les 3 campagnes de prélèvement (a : Auteuil 2008, b : Oysonville 2008, c : Oysonville 2009)**

Les histogrammes représentent concentrations volumiques des différentes fractions granulométriques pour les 3 séries de prélèvement effectuées lors de chaque campagne. Les camemberts représentent les distributions relatives en masse des différentes fractions granulométriques d'intérêt définies à partir des distributions granulométriques pour les deux sites (urbain de proximité du trafic et rural). Il s'agit de moyennes établies pour les 3 semaines de prélèvements à Auteuil et des 6 semaines à Oysonville.



## Paris Urbain de fond (PUFFIN1)



**Figure 5-5 : Distribution relative en masse des différentes fractions granulométriques** pour les prélèvements du projet PUFFIN1, effectués  **dans un site urbain de fond** (sur le toit du Laboratoire d'Etude des Particules Inhalées dans le 13<sup>e</sup> arrondissement de Paris en 2003)

Compte tenu des profils granulométriques observés, il a été décidé de considérer pour les études toxicologiques les fractions granulométriques suivantes (figure 5-6) :

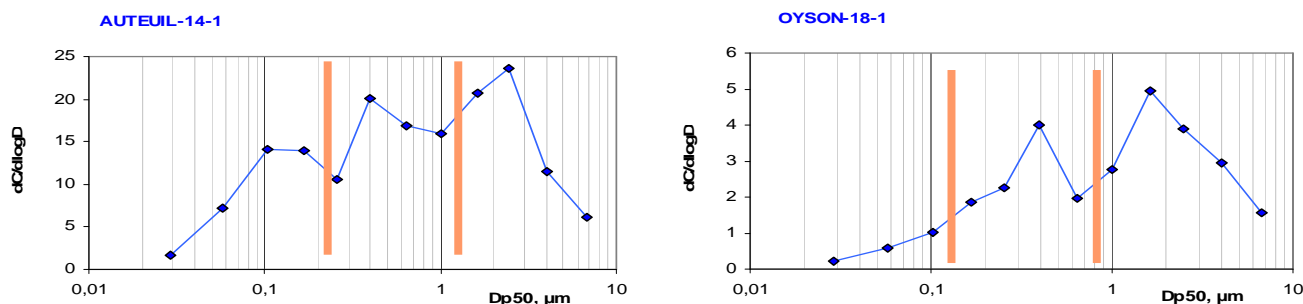
### A Auteuil :

- Ultrafines :  $PM_{0,25-0,03}$  correspondant aux filtres 1, 2, 3, 4 de l'impacteur
- Fines :  $PM_{1,65-0,25}$  correspondant aux filtres 5,6, 7,8
- Grossières :  $PM_{10-1,65}$  correspondant aux filtres 9,10,11,12

Les filtres pour les analyses des HAP et pesticides ayant été envoyés pour analyse très rapidement après leur collecte pour éviter toute dégradation de ces composés et avant que le profil granulométrique en masse ne soit établi, cette analyse a été réalisée selon des coupures granulométriques légèrement différentes car calquées sur ce qui avait été déterminé dans une étude précédente sur des échantillons urbains de fond.

### A Oysonville :

- Ultrafines :  $PM_{0,17-0,03}$  correspondant aux filtres 1, 2, 3 de l'impacteur
- Fines :  $PM_{1-0,17}$  correspondant aux filtres 4, 5,6, 7
- Grossières :  $PM_{10-1}$  correspondant aux filtres 8, 9,10,11,12



**Figure 5-6: définition des fractions granulométriques d'intérêt pour les études toxicologiques** pour les prélèvements en zone urbaine de proximité à gauche et pour les prélèvements en zone rurale à droite

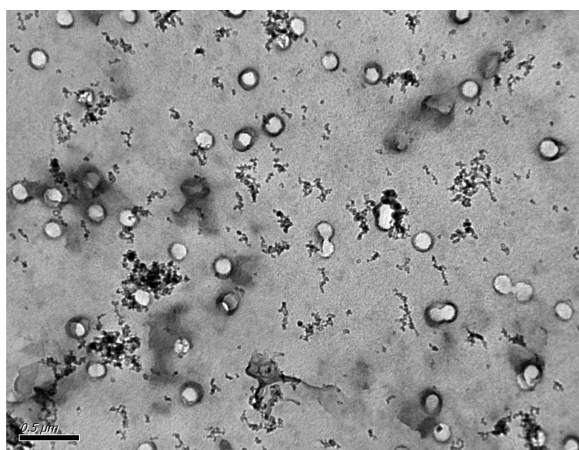


## **5-2 : Typologie des particules**

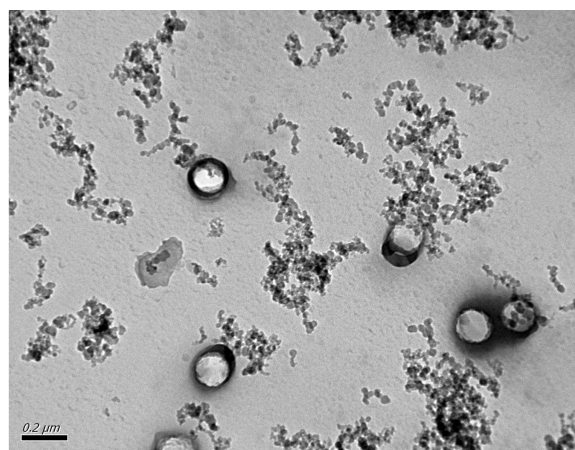
Des prélèvements de courte durée ont été réalisés sur grilles de microscopie électronique sur les deux sites, Auteuil (avril 2008) et Oysonville (mai 2009). Les temps de prélèvement ont été ajustés en fonction de la charge en particules prévalant sur chaque site. En effet, un temps de prélèvement trop long conduit à un empilement des particules et à un recouvrement excessif de la surface des grilles de prélèvement, rendant l'observation détaillée difficile ou impossible.

A Auteuil, en bordure de boulevard périphérique, le nombre de particules, mesuré au moyen d'un compteur de noyaux de condensation (CPC 3007, TSI), allait de 25000 à 60000 particules/cm<sup>3</sup>, pouvant monter jusqu'à 120000 p/cm<sup>3</sup> lors du passage de poids-lourds, quand à Oysonville, ce nombre ne dépassait pas 6000 p/cm<sup>3</sup>. Ainsi, le temps de prélèvement a été pour Auteuil, limité à 15 minutes tandis qu'à Oysonville, il était de 2 heures.

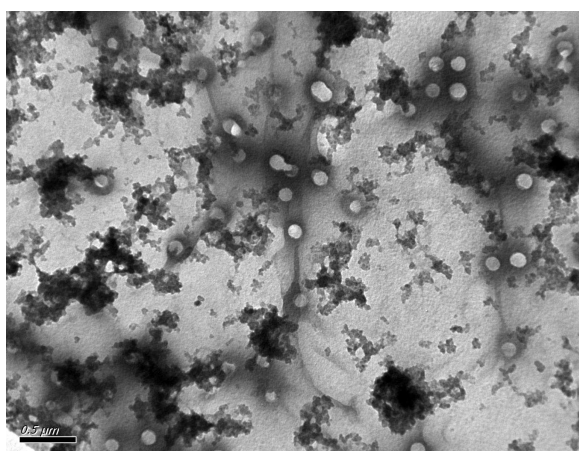
Les particules recueillies sur les premiers étages d'impacteur représentant la fraction ultrafine (étage 1 à 3) sont entièrement composées de microsuires, tant à Auteuil qu'à Oysonville. Ces suies sont en fait agrégées en chapelets de particules de nature essentiellement carbonée et dont la taille individuelle varie de 10 à 30 nm. Cependant, ces suies n'ont pas la même morphologie suivant les sites. A Auteuil (photos 1 et 2), elles sont plus allongées, avec de nombreux angles à 120° d'une branche à l'autre de ces chaînes de particules. A Oysonville (photo 3), par contre, elles apparaissent en général repliées sur elles-mêmes. Les facteurs de forme moyens (ou rapports longueur sur largeur) traduisent ce fait, avec une moyenne de 4,6 +/- 2,2 à Auteuil et 2,8 +/- 1 à Oysonville. Les suies sont évidemment très fraîchement émises en bordure de périphérique quand à Oysonville, les suies semblent plus âgées et ont voyagé. De plus, elles n'ont pas le même relief : plus opaques à Auteuil qu'à Oysonville.



**Photos 1 et 2 : Auteuil - Etage 1 – X30000**

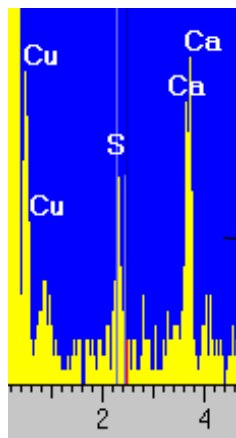


**Auteuil - Etage 2 – X60000**

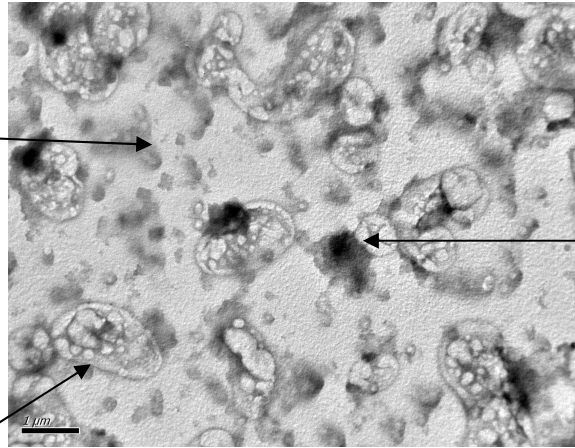


**Photo 3 : Oysonville - Etage 2 – X30000**

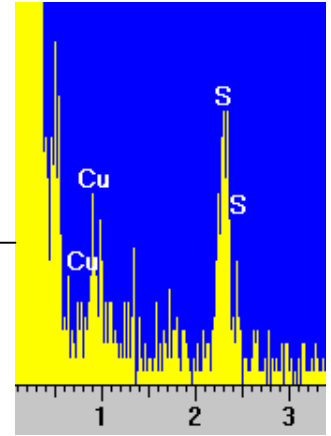
Dans la fraction fine, les différences entre le site urbain et le site rural sont plus nettes. A Oysonville, dès l'étage 4 apparaissent des particules dont le spectre d'analyse X révèle surtout du Soufre, accompagné parfois de Calcium. La plupart sont sous forme de globules sphéroïdaux noirs dont la particularité première est de fondre très rapidement sous le faisceau du microscope électronique, pour laisser ensuite une auréole (photo 4, spectre 2). Ces particules labiles sont probablement sous forme liquide, et sont selon toute vraisemblance des sulfates.



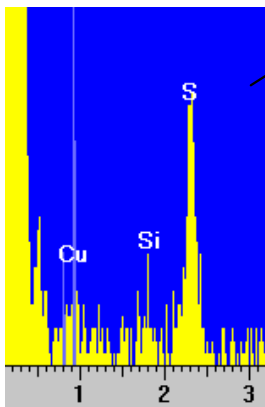
**Spectre 1**



**Photo 4 : Oysonville - Etage 4 – X15000**



**Spectre 3**

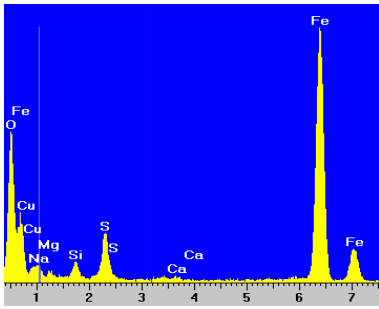


**Spectre 2**

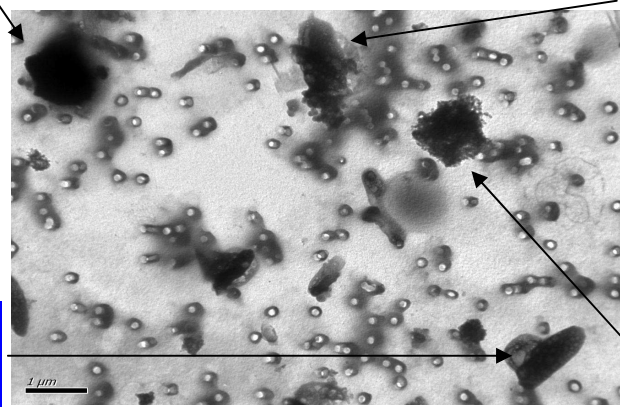
On retrouve ces particules instables sous le faisceau d'électrons jusque sur les étages 6 à 8. Les photos 5 et 6 illustrent ce phénomène d'érosion de certaines particules : la photo 6 étant prise au même endroit que la photo 5 après quelques minutes de bombardement électronique.

Les particules correspondant aux spectres 5 et 6 sont composées de Soufre, accompagné de Na, Mg, Ca et K. La présence fréquente de K plaide pour une source liée à des feux de végétation mais également à des apports terrigènes dans toutes les classes granulométriques ce qui est confirmé par les analyses chimiques. Remarquons que le nitrate, encore plus abondant n'est pas détecté par analyse X. De même les associations en surface de sulfate et nitrate sur les grosses particules ne sont à priori pas mises en évidence.

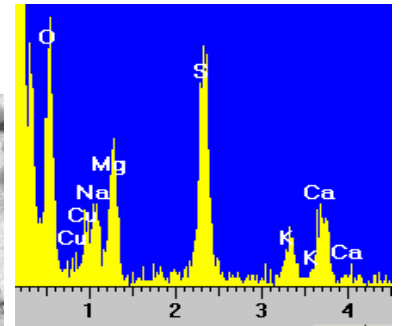
On peut observer également d'autres particules qui sont stables sous le faisceau d'électrons, l'une composée de Fer (spectre 4), une autre composée de Silicium, de Sodium et de Soufre (spectre 7).



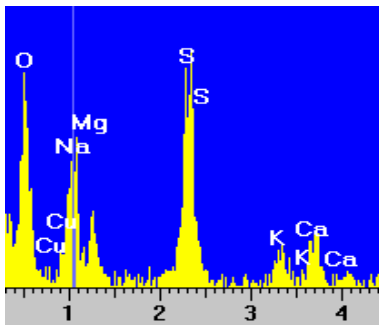
**Spectre 4**



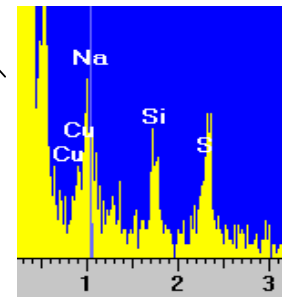
**Photo 5 : Oysonville - Etage 6 – X15000**



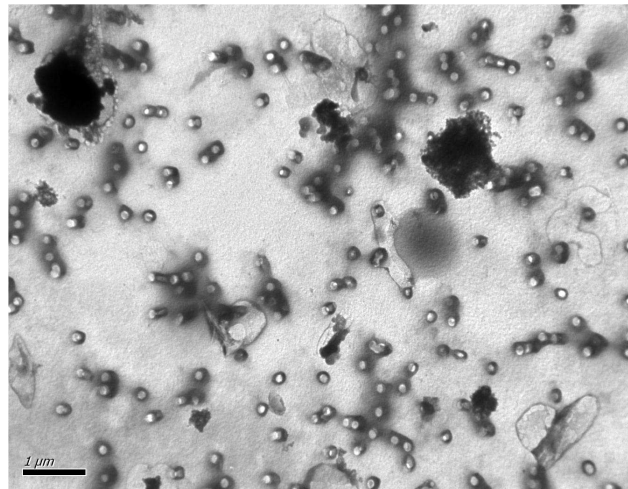
**Spectre 6**



**Spectre 5**

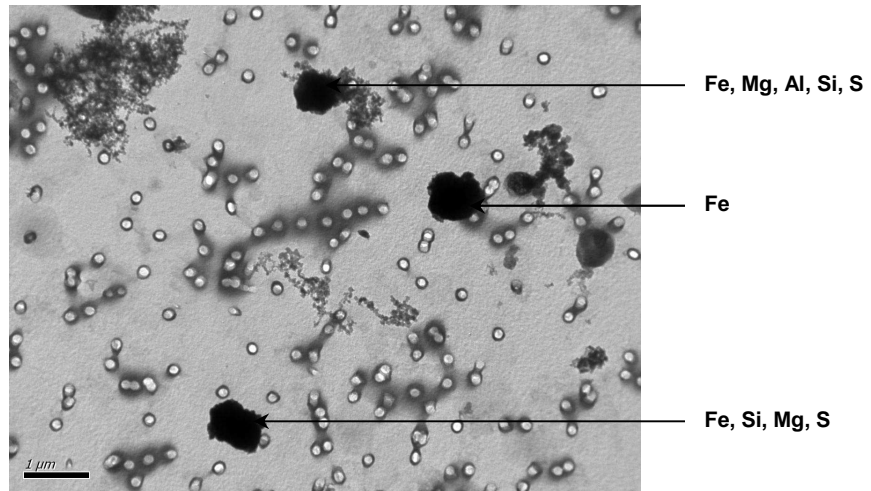


**Spectre 7**



**Photo 6 : Oysonville - Etage 6 – X15000**  
**Mêmes photos que n°5 après quelques minutes**

A Auteuil, ces particules de sulfates, instables sous le faisceau ne sont pas présentes. La photo 7 montre des particules présentes sur l'étage 6, au niveau du pic d'accumulation (étage 6, D50% = 0,4 µm). Celles-ci sont opaques et résistantes au faisceau d'électrons. De relief fort, anguleuses, elles sont composées principalement de Fer, plus ou moins associé à de l'Aluminium, du Silicium et de Magnésium, voire du Soufre. Il s'agit *a priori* de poussières d'origine minérale.



**Photo 7 : Auteuil - Etage 6 – X15000**

En résumé, *la fraction ultrafine*, tant sur le site rural que sur le site urbain à proximité du trafic automobile, est composée exclusivement d'agrégats de suies carbonées, se présentant sous la forme de chaînes de nanoparticules. Ces suies cependant n'ont pas la même forme : fraîches en bordure de périphérique, elles se développent de manière fractale ; plus âgées, sur le site rural, elles se présentent une forme plus ramassée et sphérique.

*La fraction fine* du site rural est dominée par la présence de sulfates.

### 5-3 : Analyses chimiques

Les résultats de la fermeture chimique obtenus avec les prélèvements effectués à **Auteuil** sont présentés figure 5-7. Cet aérosol de proximité de trafic présente les caractéristiques d'un aérosol de combustion très jeune auquel se superposent des poussières minérales soulevées par les véhicules.

Le rapport EC/TC est très élevé (61% en moyenne pour les particules fines), en particulier dans la fraction PUF[0,25-0,03]. Cette fraction représente à elle seule 39% de la masse totale de l'aérosol, ce qui est tout à fait considérable et inusuel. Plus des ¾ sont formées d'espèces insolubles.

D'une façon surprenante également, nitrate et sulfate sont abondants dans la phase ultra-fine ce qui indique une formation secondaire très rapide de ces espèces dans la phase particulaire, avec peut-être les poussières comme médiateur, là-encore.

La phase la plus grossière est relativement riche en composés organiques (BC/TC~13%) ce qui pourrait indiquer l'importance du pool de composés organiques semi-volatils à proximité de l'échappement des véhicules et la rapidité de piégeage de ces composés organiques sur les grosses particules. Il est à noter que la flotte mobile sur le périphérique est particulière car elle comporte un nombre élevé de poids lourds ou véhicules semi-légers fonctionnant au diesel. Comme attendu, les sulfates ne sont pas abondants car le diesel est maintenant bien désulfurisé. D'une façon un peu plus étonnante, le nitrate (en particulier le nitrate grossier) n'est pas très abondant lui aussi. Nitrate et sulfate sont donc relativement peu abondants aux cotés d'une phase ionique résiduelle dont l'origine est à déterminer.

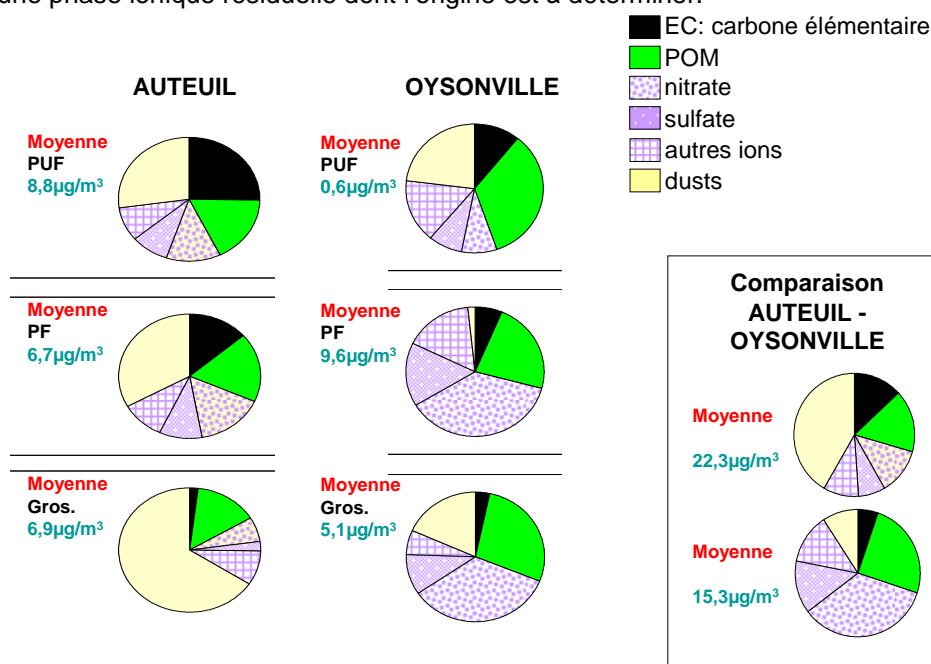


Figure 5-7 : résultats de la fermeture chimique effectuée pour les différentes fractions de chaque site

Les résultats de la fermeture chimique obtenus avec les prélèvements effectués à **Oysonville** sont présentés figure 5-7. Ils ne concernent que ceux obtenus en 2009. Les quantités limitées de particules recueillies en 2008, n'ont pas permis de calculer la fermeture chimique par manque de fiabilité sur la mesure de certains composés. Sur les 3 prélèvements analysés complètement (semaines 14/15, 16/17, 18/19 2009), les 2 premiers sont similaires, le troisième est moins abondant et semble encore plus "rural".

L'aérosol est riche en substances secondaires (organique, nitrate et dans une moindre mesure sulfate). C'est un aérosol de bruit de fond vieilli mais qui cependant recueille localement un autre aérosol aux propriétés particulières. Cet aérosol local porté par les très fines particules (PUF) est riche en espèces organiques solubles et donc assez fonctionnalisés.

Les ions sont ici très importants (majoritaires) en comparaison avec un aérosol urbain de bruit de fond étudié dans le cadre d'un projet précédent réalisé à Paris dans le 13<sup>e</sup> arrondissement (PUFFIN1) (Ramgolam et coll., 2009).

La richesse en nitrate pourrait témoigner de l'influence de l'usage d'engrais. Il n'y a pas de trace de feux car le potassium et l'oxalate varient en chœur avec le calcium. Le faible rapport EC/TC est sans doute dû à l'abondance d'espèces organiques dont vraisemblablement une grande partie est d'origine secondaire.

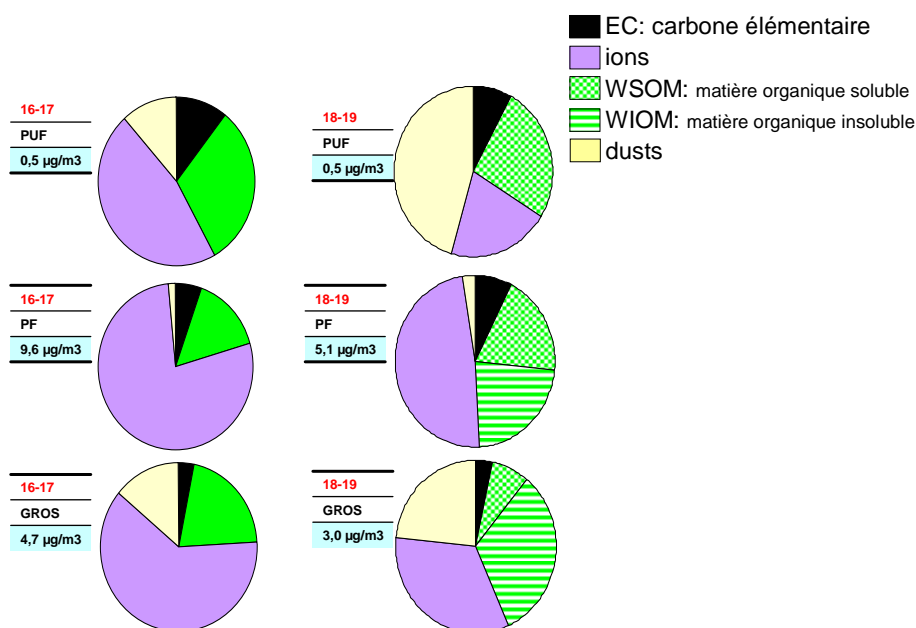


Le potassium lui aussi marqueur de feu potentiel est vraisemblablement lié aux apports crustaux ou terrigènes abondants marqués par le calcium et le magnésium.

L'abondance de l'organique sur les grosses particules témoigne d'interactions importantes dust/acides organiques conduisant à une fixation irréversible (car le carbone organique est trouvé majoritairement insoluble). On avait déjà vu cela à Paris et avons formulé l'hypothèse de formation de particules organiques secondaires par réaction acide/base tout comme le nitrate nitrate (sous forme d'acide gazeux  $\text{HNO}_3$ ) se fixe aussi sur les grosses particules.

Le faible rapport BC/TC (18% au lieu de 35%) du 3ème prélèvement (semaine 18/19, Figure 5-8) montre l'importance des apports locaux de composés organiques (biogéniques, pesticides??) semi-volatils qui viennent enrichir la phase particulaire.

Enfin la présence de poussières crustales dans toutes les fractions y compris la fraction ultra-fine est tout à fait particulière. Cependant la faible proportion 4% en masse de cette fraction PUF est dans les normes de ce qui est attendu pour un aérosol de bruit de fond.



**Figure 5-8 : résultats de la fermeture chimique effectuée pour les différentes fractions de deux prélèvements effectués à Oysonville en 2009.** La composition chimique des semaines 16/17 et 14/15 (non illustré) sont proches et distincts de ceux des semaines 18/19.

#### Comparaison Auteuil-Oysonville :

Ces 2 sites pour des raisons différentes présentent un aérosol très particulier :

Oysonville se distingue par sa richesse exceptionnelle en nitrate (en particulier dans les fines et les grosses), et par ses particules organiques au comportement de solubilité très différent d'une fraction à l'autre.

Auteuil se distingue par l'importance de sa fraction ultra-fine qui est la fraction prédominante. Cette fraction elle, est majoritairement insoluble et les espèces carbonées y sont majoritaires. L'aérosol d'Auteuil a peu de matière organique secondaire. Nitrate et sulfate sont relativement peu abondants. Le carbone-suie (BC) lui, y est particulièrement abondant.

Enfin, il est à noter que contre toute attente, la différence de concentration totale ( $22.3$  et  $15\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) entre les 2 sites d'Auteuil et de Oysonville est faible, montrant là-encore l'importance de l'aérosol secondaire (organique et inorganique) sur ce site récepteur rural qui voit aussi sans doute des apports supplémentaires dûs aux activités locales.

#### Comparaison avec Paris-LHVP (bruit de fond) :

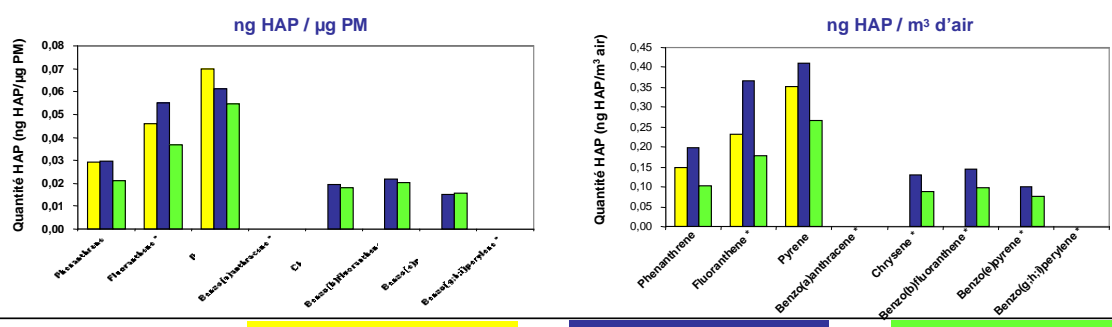
Le profil granulométrique et la composition chimique des particules de Paris indiquent un remaniement très rapide des particules par dilution et coagulation (les particules primaires BC et dusts ultrafins et fins sont relativement beaucoup moins importantes) ainsi que la formation rapide d'espèces secondaires (organiques, nitrates, sulfates) qui vient accentuer cette dilution. D'une façon incontestable, cette comparaison des 3 sites montre qu'une partie très importante de la formation secondaire des composés organiques anthropiques a lieu rapidement en région source, alors que les nitrates et sulfates poursuivent leur formation pendant le transport vers les zones plus éloignées.

#### En résumé :

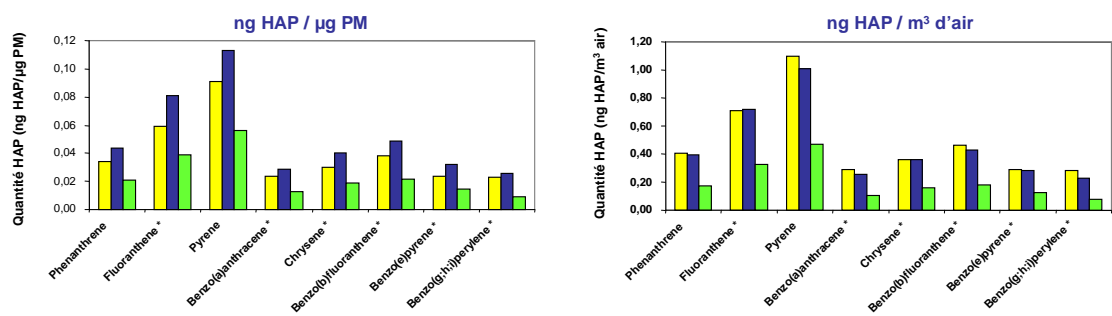


**Ces aérosols à la signature très marquée, devraient avoir des réponses biologiques très différentes : pour le site « trafic » du fait de l'abondance de l'aérosol ultrafin et sa richesse en composés primaires carbonés, l'autre pour l'importance de sa fraction « fine » et l'abondance de composés inorganiques secondaires, avec cependant la marque dans la fraction ultrafine de composés organiques locaux**

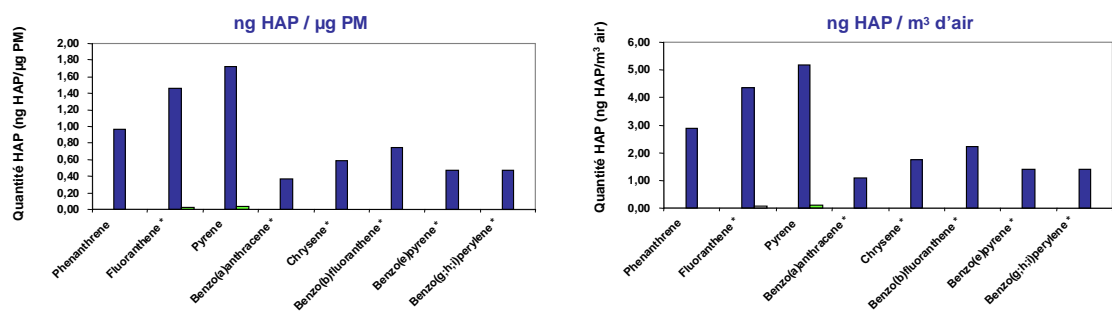
**Fraction ultrafine**    **PM0.038-0.13, Sem 14**    **PM0.034-0.11, Sem 15**    **PM0.03-0.1, Sem 16**



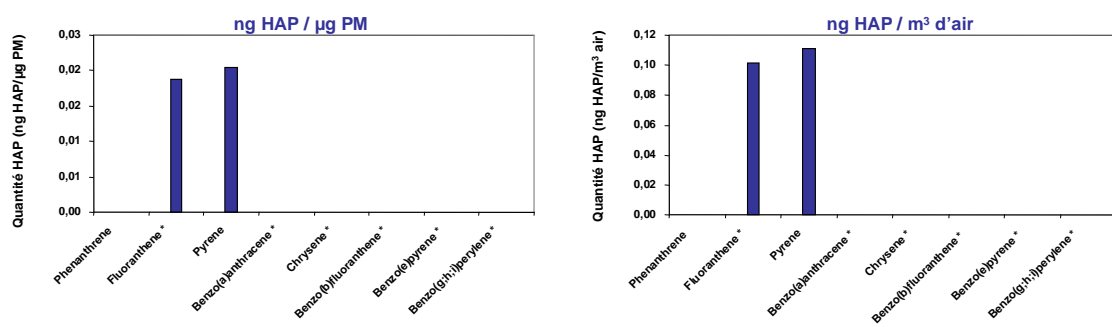
**Fraction fine**    **PM0.13-1.14, Sem 14**    **PM0.11-1.1, Sem 15**    **PM0.1-1, Sem 16**



**Fraction intermodale**    **PM1.14-3, Sem 14**    **PM1.1-2.66, Sem 15**    **PM1-2.5, Sem 16**



**Fraction grossière**    **PM3-12.25, Sem 14**    **PM2.66-11, Sem 15**    **PM2.5-10, Sem 16**



**Figure 5-9 : concentrations de HAP (exprimées en ng/µg de particules pour les graphes de gauche et en ng/m³ d'air prélevé pour les graphes de droite) retrouvées sur les particules selon les fractions granulométriques et pour les 3 séries de prélèvements.**

## 5-4 : Teneurs en HAP

### Teneurs en HAP des particules échantillonnées en site de proximité du trafic

#### Auteuil: site de proximité du trafic

	Semaine 14				Semaine 15				Semaine 16			
	PM0,038 -0,13	PM0,13 -1,14	PM1,14-3	PM3- 12,25	PM0,034- 0,11	PM0,11 -1,1	PM1,1- 2,66	PM2,6- 11	PM0,03- 0,1	PM0,1-1	PM1- 2,5	PM2,5- 10
Naphtalene	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+
Acenaphthylene	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0
Acenaphthene	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0
Fluorene	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0
Phenanthrene	+	+	0	0	+	+	+	0	+	+	0	0
Anthracene	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0
Fluoranthene *	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	0
Pyrene	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	0
Benzo(a)anthracene *	0	+	0	0	0	+	+	0	0	+	0	0
Chrysene *	0	+	0	0	+	+	+	0	+	+	0	0
Benzo(b)fluoranthene *	0	+	0	0	+	+	+	0	+	+	0	0
Benzo(k)fluoranthene *	0	0	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0
Benzo(e)pyrene *	0	+	0	0	+	+	+	0	+	+	0	0
Benzo(a)pyrene *	0	0	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0
Dibenzo(ah)anthracene *	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Indeno(1,2,3-cd)pyrene *	0	0	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0
Benzo(g,h,i)perylene *	0	+	0	0	0	+	+	0	0	+	0	0
<b>Σ des HAP ng/m<sup>3</sup></b>	<b>0,73</b>	<b>3,91</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1,4</b>	<b>4,2</b>	<b>27,4</b>	<b>0,3</b>	<b>0,9</b>	<b>1,7</b>	<b>0,3</b>	<b>0,1</b>

**Tableau 5-1 : Synthèse des HAP trouvés en quantité détectable dans les différentes fractions granulométriques lors des 3 séries de prélèvements effectués à la porte d'Auteuil et somme des concentrations de HAP détectés en ng/m<sup>3</sup>**

Le tableau 5-1 illustre la présence des HAP en quantité détectable parmi les 17 qui ont été dosés : ils sont signalés dans les cases jaunes. Cette représentation révèle la présence préférentielle des HAP dans les fractions ultrafines et fines. Cependant on notera que pour la semaine 15, presque tous les HAP sont retrouvés dans la fraction intermodale (PM1.1-2.66).

Les seuils de coupure ne sont pas similaires pour les 3 séries de prélèvements car il y a eu sur certains impacteurs des problèmes de débit qui ont donc modulé les seuils de coupure.

Les quantités totales de HAP recueillies sont très proches en semaine 14 et 16 (4,64 et 2,96 ng/m<sup>3</sup> respectivement) mais beaucoup plus élevées en semaine 15 (33,22 ng/m<sup>3</sup>). Ceci peut s'expliquer par le fait que cette semaine a été la moins pluvieuse des trois.

La fraction fine est la plus concentrée et diversifiée.

L'analyse de la figure 5-9 ci-contre fait ressortir que :

#### Pour la fraction ultrafine :

- le phénanthrène, fluoranthène et pyrène sont présents pendant les 3 semaines et sont les composés ayant les concentrations les plus élevées.
- le chrysène, benzo(b)fluoranthène et benzo(e)pyrène ne sont observés que lors des semaines 15 et 16.

#### Pour la fraction fine :

- On retrouve les mêmes HAP pendant les 3 semaines.
- il y a une plus grande diversité de HAP détectables que dans la fraction ultrafine
- le phénanthrène, fluoranthène et pyrène sont encore les composés majoritaires et sont présents en quantité plus élevée que dans la fraction ultrafine.

#### Pour la fraction intermodale :

- Dans cette fraction, des HAP n'ont été trouvés que lors de la semaine 15. De nouveau ce sont le phénanthrène, fluoranthène et pyrène qui sont les composés majoritaires.

#### Pour la fraction grossière :

- seuls 2 HAP (fluoranthène et pyrène) sont présents et uniquement lors de la semaine 15.

Les espèces prédominantes (Phénanthrène, Pyrène et Fluoranthène) sont conformes aux observations habituelles réalisées à Auteuil par Airparif.

En termes de concentration, il est assez difficile de comparer les prélèvements PM10 effectués par Airparif sur 24 heures aux mesures effectuées dans ce projet sur 3 jours et séparées en différentes fractions.

Dans le tableau 5-2 ci-dessous sont rapportées les valeurs mesurées à Auteuil au cours des 3 semaines de la campagne. Les niveaux les plus élevés sont bien observés sur les prélèvements effectués au cours de la semaine 15, avec néanmoins des concentrations proches au cours de la semaine 16.

Par rapport au reste de l'année, les valeurs ci-dessous sont des niveaux de concentration faibles à moyens.

pg/m <sup>3</sup>	Benzo(a) Pyrène	Benzo(a) anthracène	Benzo(b) fluoranthène	Benzo(ghi) pérylène	Benzo(k) fluoranthène	Pyrène	Fluoran- thène	Indéno Pyrène	Anthra- cène	Phénan- thrène	Dibenzo(a) anthracène	Chrisène
03/04/2008	250	300	360	510	110	3900	3100	200	490	9700	10	590
06/04/2008	310	380	450	720	160	3800	3000	310	520	9900	20	590
09/04/2008	1000	830	1000	1400	370	5900	4700	620	860	15900	40	1300
12/04/2008	420	340	460	790	140	5100	4200	300	480	10400	20	630
15/04/2008	540	480	530	720	180	4600	3500	280	500	10400	20	920
18/04/2008	250	320	360	530	130	5800	4600	190	690	16800	10	530
21/04/2008	300	330	350	580	130	5500	4400	220	720	15000	10	650

**Tableau 5-2 : concentrations de HAP mesurés sur les PM10 par prélèvements journaliers**

### Teneurs en HAP des particules échantillonnées en zone rurale

Ce sont les mêmes 17 Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) qui ont été recherchés à Oysonville (tableau 5-3).

Les résultats des analyses des HAP pour les deux campagnes de mesures sont regroupés dans le tableau 5-3 suivant la taille des particules :

U : Ultra fines [0,17-0,03]

F : Fines [1-0,17]

G : grossières [10-1].

	2008		2009			
	Ech1 : Semaine 17	Ech2 : Semaines 18/19	Ech3 : Semaines 14/15	Ech4 : Semaines 16/17	Ech5 : Semaines 18/19	Ech6 : Semaines 20/21
	U/F/G	U/F/G	U/F/G	U/F/G	U/F/G	U/F/G
Naphtalène		0,082 / 0,08 / 0,1		0,099 / /		
Phénanthrène	/ / 0,085	/ / 0,044	0,125 / 0,196 / 0,2	0,182 / 0,123 / 0,176	0,14 / 0,202 /	0,25 / 0,16 / 0,194
Fluoranthène	/ / 0,085	/ / 0,044			/ 0,108 /	
Pyrène	/ / 0,081	/ / 0,045			/ 0,097 /	
Chrysène					0,076 / 0,085/	
Benzo(b)fluoranthène			0,108 / 0,167 /			

**Tableau 5-3 : Résultats des mesures HAP à Oysonville au cours des campagnes de 2008 et de 2009 (ng/m<sup>3</sup>)**

(Ech1 : du 25 avril au 2 mai 2008, Ech2 : du 2 au 16 mai 2008, Ech3 : du 30 mars au 14 avril 2009, Ech4 : du 14 au 27 avril 2009, Ech5 : du 27 avril au 11 mai 2009, Ech6 : du 11 au 25 mai 2009)

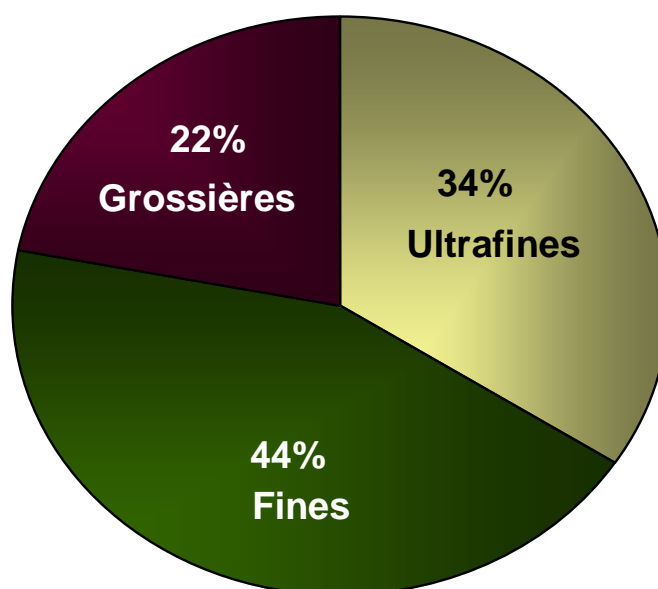
Seul l'échantillon 3 n'a pas été testé sur les cellules.

En 2008, seulement 4 HAP (Naphtalène, phénanthrène, le fluoranthène et le pyrène) ont été détectés avec des concentrations équivalentes et très proches de la limite de quantification. A l'exception du naphtalène qui a été observé dans un échantillon sur les particules ultrafines, fines et grossières et

avec des concentrations proches de la limite de quantification, les 3 autres HAP ont été observés uniquement sur les particules grossières.

Pour échantillonner suffisamment de matière et s'affranchir ainsi des concentrations trop proches de la limite de quantification, en 2009 les prélèvements ont été réalisés sur un pas d'échantillonnage de 15 jours et non hebdomadaire. Les concentrations enregistrées sont relativement plus élevées que celles de l'année précédente (tableau 5-3). En plus des 4 HAP observés en 2008, deux autres HAP ont été mesurés en 2009 : Benzo(b)fluoranthène et le Chrysène.

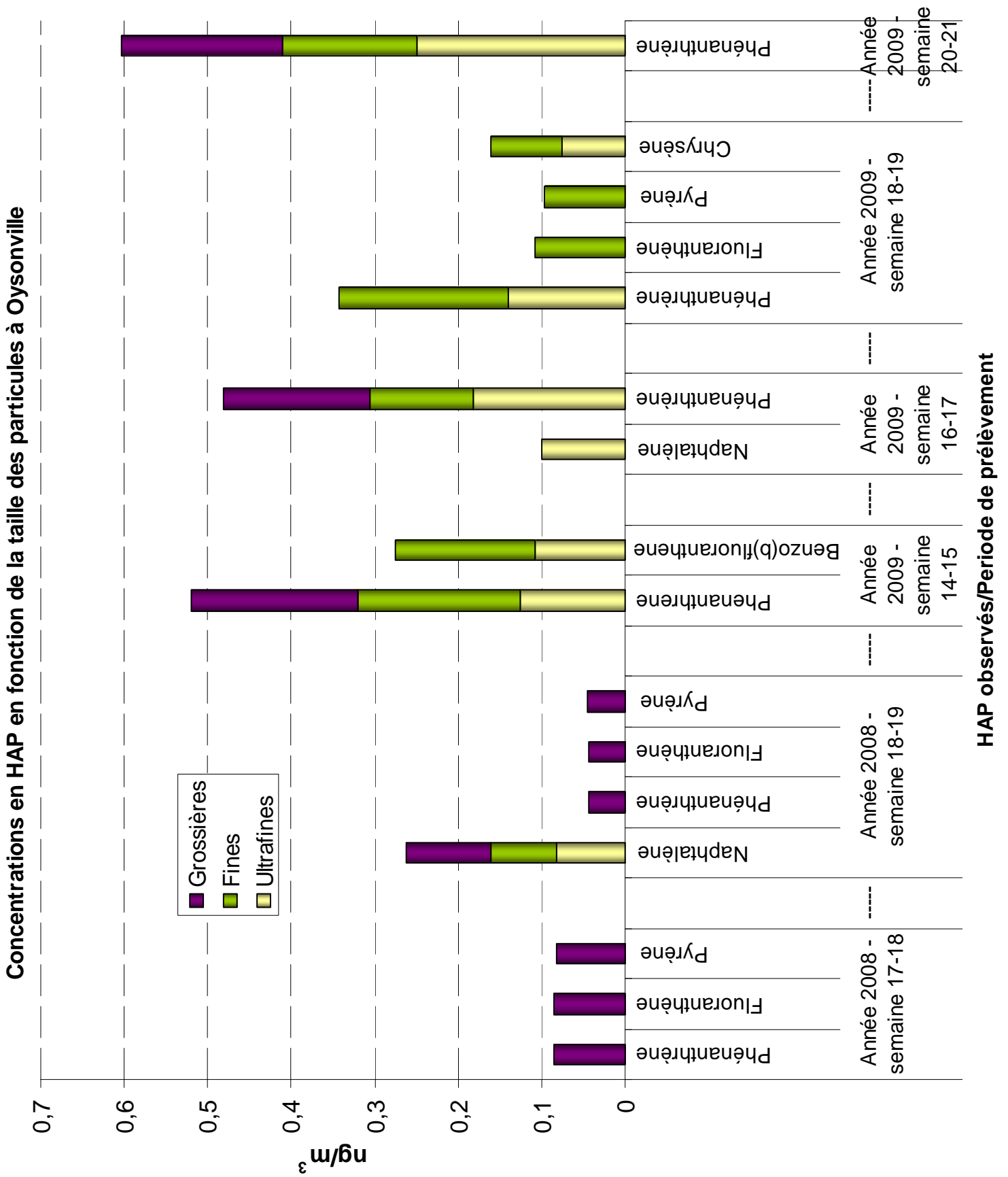
Contrairement aux résultats obtenus lors de la campagne de 2008, ceux de la campagne 2009 montrent que la majorité des HAP est plutôt portée par les particules fines [1-0,17] et Ultrafines [0,17-0,03] (figure 5-10). Seul le phénanthrène est porté par les particules grossières. Ce dernier HAP a été observé sur l'ensemble des prélèvements mais aussi sur toutes les tailles des particules. Il représente à lui seul environ 75% de la masse totale des HAP toutes phases confondues.



**Figure 5-10 : répartition massique des HAP suivant la taille des particules (campagne 2009)**

Les autres HAP, ont été observés chacun une seule fois, durant la campagne 2009 (figure 5-11). Le fluoranthène et le Pyrène ont été observés uniquement sur les particules fines. Le benzo(b)fluoranthène et le chrysène ont été notés sur les particules fines et ultrafines avec des répartitions équivalentes.

Figure 5-11 : répartition des HAP suivant la taille des particules sur le site rural Oysonville



### **5-5 : Teneurs en pesticides**

Les résultats des analyses des pesticides pour les campagnes de 2008 et 2009 à Oysonville sont regroupés dans le tableau 5-4 suivant la taille des particules :

U : Ultra fines [0,17-0,03]

F : Fines [1-0,17]

G : grossières [10-1].

	2008		2009			
	Ech1 : Semaine 17	Ech2 : Semaines 18/19	Ech3 : Semaines 14/15	Ech4 : Semaines 16/17	Ech5 : Semaines 18/19	Ech6 : Semaines 20/21
	U/F/G	U/F/G	U/F/G	U/F/G	U/F/G	U/F/G
Acétochlore	0,30 / 0,55 / 0,37	0,26 / 0,40 / 0,29		/ 0,08 / 0,14	0,06 / 0,09 /	
Alachlore	0,03 / 0,08 /	// 0,03				
Chlorothalonil	0,26 / 0,24 / 0,28					
Cyprodinil	/ 0,05 /	/ 0,08 /	0,04 / 0,27 / 0,18	0,04 / 0,20 / 0,12	/ 0,06 /	
Ethofumésate	/ 0,22 / 0,22					
Fenpropidine	/ 0,07 /	/ 0,15 /		/ 0,09 /	/ 0,24 /	
Fenpropimorphe	/ 0,22 /	/ 0,21 /		/ 0,17 /	/ 0,75 /	/ 0,31 /
Métolachlore		/ 0,03 /		/ 0,05 / 0,06	0,06 / 0,13 /	/ 0,07 / 0,12
Pendiméthaline	0,40 / 0,44 / 0,41	/ 0,09 / 0,04	/ 0,21 / 0,15	/ 0,10 /		
Propachlore	0,08 / 0,09 / 0,09	0,08 / 0,09 / 0,08	// 0,21			
Prosulfocarbe						// 0,04
Spiroxamine	/ 0,96 /	/ 0,63 /	/ 0,97 / 0,14	0,07 / 0,9 / 0,12	0,05 / 1,86 /	0,31 / 2,27 / 0,16

**Tableau 5-4 : Résultats des mesures de pesticides à Oysonville au cours des campagnes de 2008 et de 2009 (ng/m<sup>3</sup>), Ech1 : du 25 avril au 2 mai 2008, Ech2 : du 2 au 16 mai 2008, Ech3 : du 30 mars au 14 avril 2009, Ech4 : du 14 au 27 avril 2009, Ech5 : du 27 avril au 11 mai 2009, Ech6 : du 11 au 25 mai 2009**  
Seul l'échantillon 3 n'a pas été testé sur les cellules.

Sur les 56 pesticides recherchés, seuls 11 pesticides ont été observés lors de la campagne 2008 et 9 lors de la campagne 2009. Au total 12 pesticides, dont 8 communs aux deux campagnes (molécules sur fond jaune dans le tableau 5-4), ont été observés lors de cette étude. Les pesticides détectés, se répartissent en 7 herbicides et 5 fongicides. Toutes ces molécules sont utilisées dans les cultures communément rencontrées en Beauce et notamment autour du site de prélèvement de Oysonville. Aucun insecticide n'a été observé.

La campagne 2008 se distingue de celle de 2009, par la présence du chlorothalonil et l'éthofumésate qui ont été observés uniquement sur le premier prélèvement et par celle de l'alachlore qui a été détecté lors des deux prélèvements en 2008. Ce dernier pesticide a été interdit courant 2008. La campagne 2009, se distingue uniquement par la présence de prosulfocarbe, qui a été observé uniquement lors du dernier échantillon. La spiroxamine, est le seul pesticide qui a été détecté dans tous les échantillons.

D'une manière générale, le premier prélèvement Ech1 (semaine 17, 2008) est plus chargé en pesticides particuliers que les autres : 10 pesticides ont été rencontrés dans ce prélèvement avec une charge totale de 5,33 ng/m<sup>3</sup>.





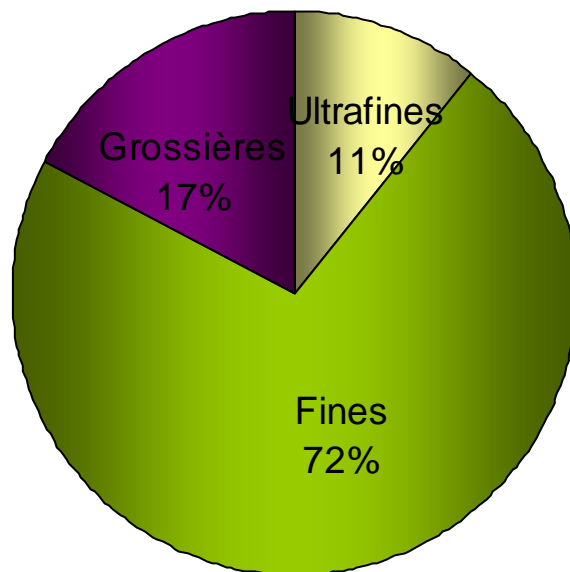
En termes de concentration individuelle, l'acétochlore et la pendiméthaline sont les composés majoritaires en 2008. En 2009, les concentrations de ces molécules sont en nette diminution et la spiroxamine devient le composé principal pour les 4 prélèvements de 2009 (tableau 5-4).

La répartition individuelle de chaque pesticide en fonction de la taille des particules dans chaque prélèvement, est présentée sur la figure 5-12. Les camemberts associés à cette figure, présente la fraction de la charge en pesticide pour chaque prélèvement suivant la taille des particules.

Le fenpropidine et le fenpropimorphe, se distinguent des autres pesticides en montrant une grande affinité pour les particules fines [1-0,17]. Ils n'ont été détectés que dans cette classe de particules. Les autres pesticides ont adopté un comportement variable, suivant la taille des particules, d'un prélèvement à l'autre. Le propachlore par exemple, a été détecté sur les 3 classes des particules durant la campagne 2008 alors qu'en 2009, il était porté uniquement par les particules ultrafines [0,17-0,03] (figure 5-12).

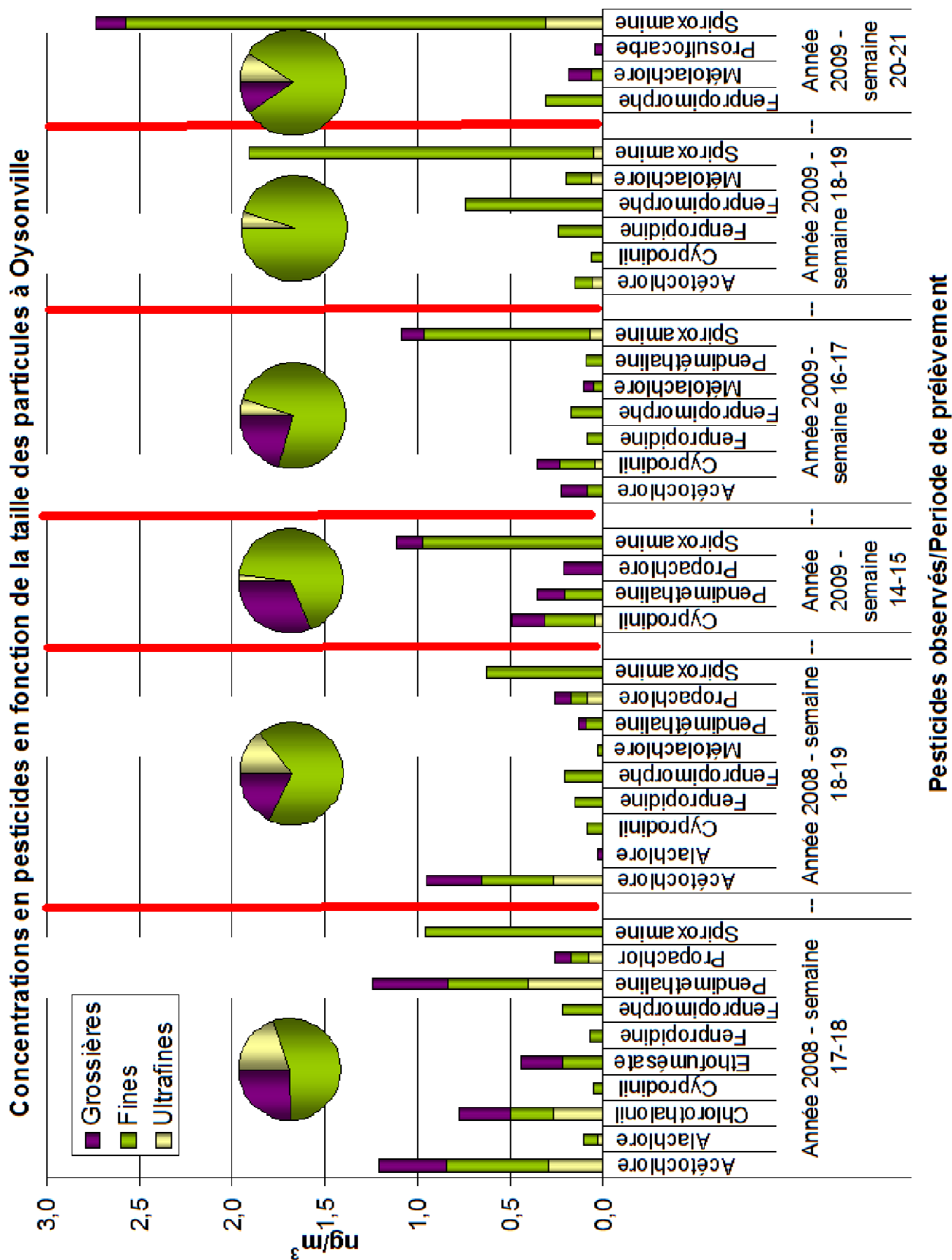
Le cas de la spiroxamine est intéressant, dans le sens où le comportement de ce pesticide, en fonction de la taille des particules, diffère d'un prélèvement à l'autre avec cependant une présence importante, en termes de concentration, dans les particules fines [1-0,17] (figure 5-12). Sa concentration dans ces dernières particules représente entre 82 et 100% de sa concentration totale dans toutes particules confondues.

Enfin quelque soit l'échantillon, les pesticides sur le site de Oysonville semblent être plus portés par les particules fines que par les autres particules (camemberts figure 5-12). En moyenne la charge en pesticides portée par les particules fines, représente environ 72% de la charge totale des pesticides détectés en phase particulaire dans cette étude (figure 5-13).



**Figure 5-13: Distribution moyenne des pesticides en fonction de la taille des particules, sur le site de Oysonville.**

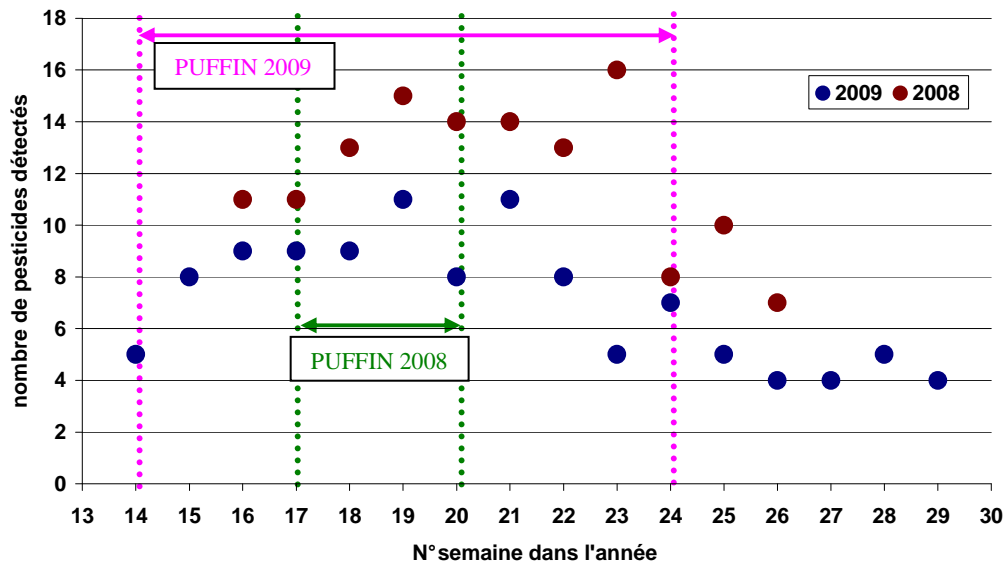
Figure 5-12 : répartition des pesticides suivant la taille des particules sur le site rural



**Comparaison des résultats obtenus par impaction et par mesures hebdomadaires toutes phases confondues**

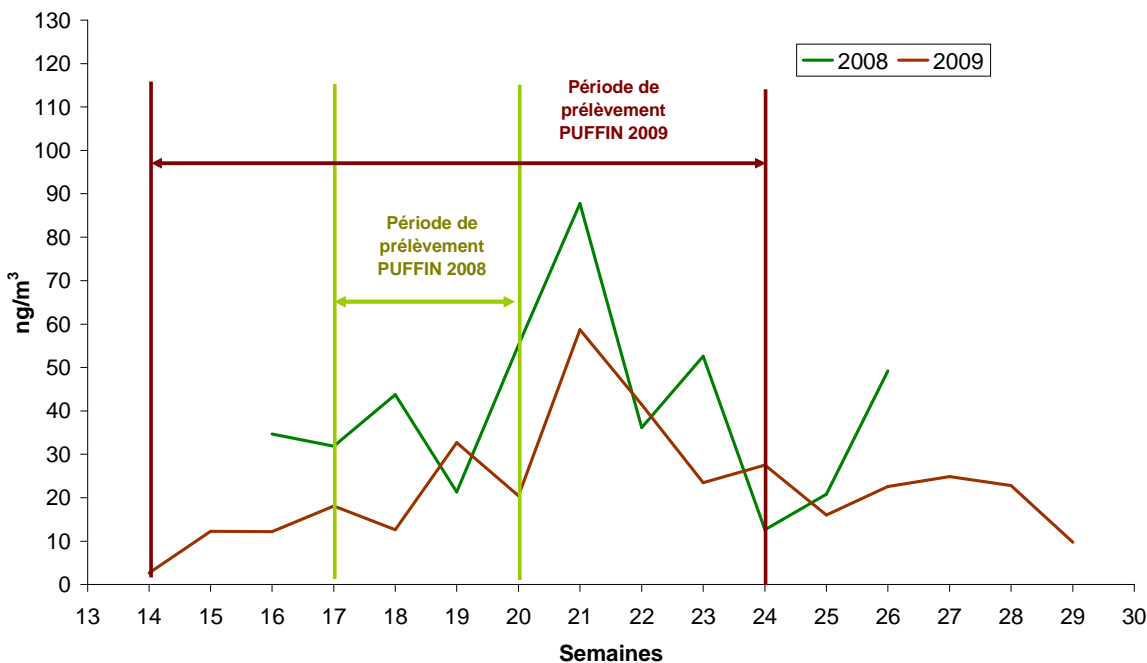
Parallèlement aux prélèvements par impaction, Lig'Air a mené des prélèvements hebdomadaires toutes phases confondues (les analyses sont réalisées sans distinction entre les phases gazeuse et particulaire). Ces prélèvements sont appelés par la suite "prélèvements par partisol".

Dans les prélèvements hebdomadaires réalisés en 2008, 17 pesticides ont été détectés contre 13 pesticides durant la campagne 2009. Le nombre de pesticides observés par prélèvements, a présenté une variation entre 7 et 16 pesticides durant l'année 2008 et entre 4 et 11 pesticides durant l'année 2009 (figure 5-13). Pour les deux campagnes, le nombre maximal des molécules détectées est observé entre les semaines 18 et 23.



**Figure 5-13 : nombre de pesticides détectés par prélèvements sur le site rural de Oysonville.**

En termes de charge totale en pesticides par prélèvement (figure 5-14), les prélèvements réalisés en 2009 sont globalement moins chargés que ceux de la campagne 2008.



**Figure 5-14 : Variation des concentrations hebdomadaires tous pesticides confondus. Oysonville 2008 et 2009**

En 2008, les prélèvements par impaction ont été réalisés dans une période qui coïncide juste avec le début des épandages. Les niveaux enregistrés pendant cette période ne correspondent pas au pic des concentrations mais plutôt à la base de ce pic comme nous

pouvons le constater sur la figure 9. En 2009, la campagne de prélèvement, plus longue, a eu lieu notamment au cours des semaines où les concentrations en pesticides ont été les plus importantes (semaines 21 et 22 sur la figure 5-14). Cependant, les pesticides étaient en plus grand nombre durant la campagne 2008 que durant la campagne 2009 (figure 5-12), ce qui a été aussi observés sur les prélèvements par impaction.

Les résultats des prélèvements par impaction et ceux des prélèvements hebdomadaires toutes phases confondues, sont présentés dans le tableau 5-5.

Unité : ng/m <sup>3</sup>	44' DDD	44' DDE	Acétochlore	Aclonifen	Alachlore	Chlorothalonil	Cyprodinil	Epoxiconazole	Ethofumésate	Fenpropridine	Fenpropimorphe	Folpel	Lindane	Métolachlore	Pendiméthaline	Propachlore	Prosulfocarbe	Spiroxamine	Trifluraline
Ech1			1,20		0,11	0,78	0,05		0,44	0,07	0,22				1,25	0,26		0,96	
Partisol 1	0,4		2,56		0,36	23,04	0,21		0,45	0,09	0,37		0,39	0,09	1,88	0,49		1,60	0,64
Ech2			0,95		0,03		0,08			0,15	0,21			0,03	0,13	0,26		0,63	
Partisol 2	0,5	0,2	1,38	0,39	0,23	20,66	0,06	0,07	0,31	0,50	1,76		0,52	0,14	0,96	0,47		2,55	0,37
Ech3							0,49								0,35	0,21		1,11	
Partisol 3			0,54			0,44	0,80						0,07		3,34	0,62		1,27	1,17
Ech4			0,23				0,36			0,09	0,17			0,10	0,10			1,08	
Partisol 4			0,98			7,41	1,08			0,18	0,53			0,33	1,98	0,10		1,56	1,24
Ech5			0,15				0,06			0,24	0,75			0,20				1,91	
Partisol 5			0,78			11,04	0,21			0,40	1,17		0,06	0,65	2,35		0,14	5,04	0,64
Ech6											0,31			0,18			0,04	2,73	
Partisol 6			0,61			27,16	0,10			0,21	0,44	3,70	0,25	0,76	2,07		0,24	3,19	0,56

**Tableau 5-5 : Résultats cumulés des mesures de pesticides à Oysonville au cours des campagnes de 2008 et de 2009 pour les prélèvements par impacteur et par partisol (ng/m<sup>3</sup>), Ech1 : du 25 avril au 2 mai 2008, Ech2 : du 2 au 16 mai 2008, Ech3 : du 30 mars au 14 avril 2009, Ech4 : du 14 au 27 avril 2009, Ech5 : du 27 avril au 11 mai 2009, Ech6 : du 11 au 25 mai 2009**

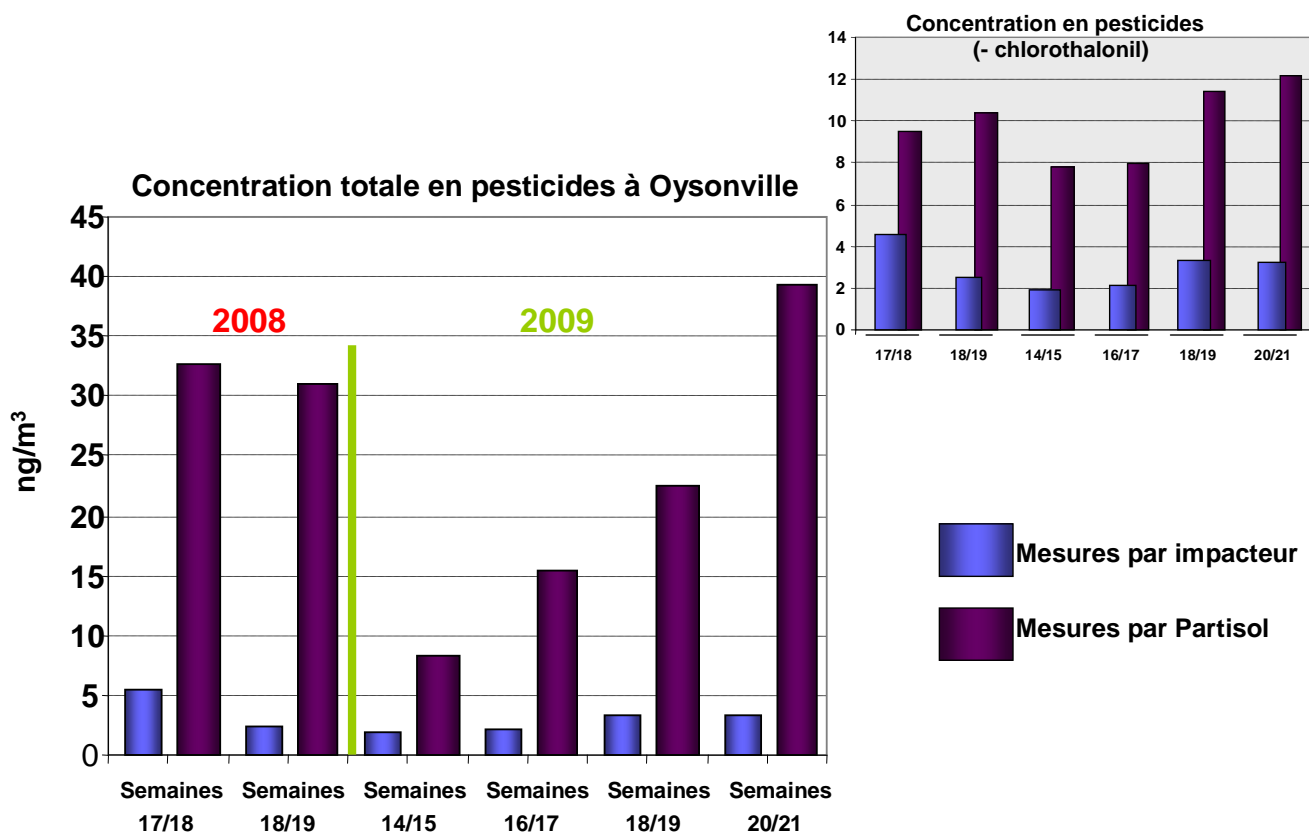
Le tableau 5-5, montre que 7 molécules n'ont pas été détectées lors des prélèvements par impaction (pesticides sur fond jaune dans le tableau 4). Aclonifen, époxiconazole, 44' DDD, 44'DDE, epoxiconazole et folpel et trifluraline, sont des molécules qui ont été détectées lors d'un ou deux prélèvements hebdomadaires. Par contre, le lindane et la trifluraline sont deux pesticides qui ont été rencontrés sur presque tous les prélèvements hebdomadaires, mais jamais dans les prélèvements par impaction. Ces deux molécules sont connues pour leur volatilité et leur piégeage se fait principalement en phase gazeuse. D'où leur absence dans les prélèvements par impaction.

Les résultats des prélèvements toutes phases confondues, montrent que les concentrations les plus élevées sont associées à plus de 60 % au chlorothalonil (fongicide utilisé notamment dans les grandes cultures de blé) pendant les périodes étudiées (lignes vertes dans le tableau 4). Par contre cette molécule a été détectée uniquement lors du premier prélèvement par impaction (Ech1) et avec une faible concentration représentant environ 3% de celle observées dans les prélèvements toutes phases confondues. Ceci suggère que cette molécule est largement présente en phase gazeuse et/ou portée par les particules dont le diamètre aérodynamique est supérieur à 10 µm (particules récoltées lors des prélèvements toutes phases confondues mais non prises en compte dans les prélèvements par impaction).

La comparaison des niveaux de spiroxamine entre les deux types de prélèvements, montre que cette molécule a été rencontrée à plus de 60% en phase particulaire, donc dans les prélèvements par impactions. De la même manière, la phase particulaire représente 48, 47 et 41% des concentrations pour respectivement le fenpropimorphe, cyprodinil et fenpropridine.

D'une manière générale, les niveaux observés lors des prélèvements par impaction sont plus faibles que ceux rencontrés dans les prélèvements hebdomadaires (figure 5-15). On a ainsi sur les particules recueillies par impaction en moyenne toutes tailles confondues 3,077 ng/m<sup>3</sup> soit 14% de la quantité recueillie avec les

prélèvements Partisol. Le chlorothalonil est le principal pesticide qui a conditionné cette différence (Figure 10 encart). En son absence, on obtient environ 30% de la masse des pesticides sur les particules.



**Figure 5-15: Comparaison de la charge totale en pesticide, obtenue par impaction et par prélèvements hebdomadaire à Oysonville en 2008 et 2009 (Dans l'encart comparaison de la concentration en excluant le chlorothalonil)**

## Cellules épithéliales bronchiques humaines

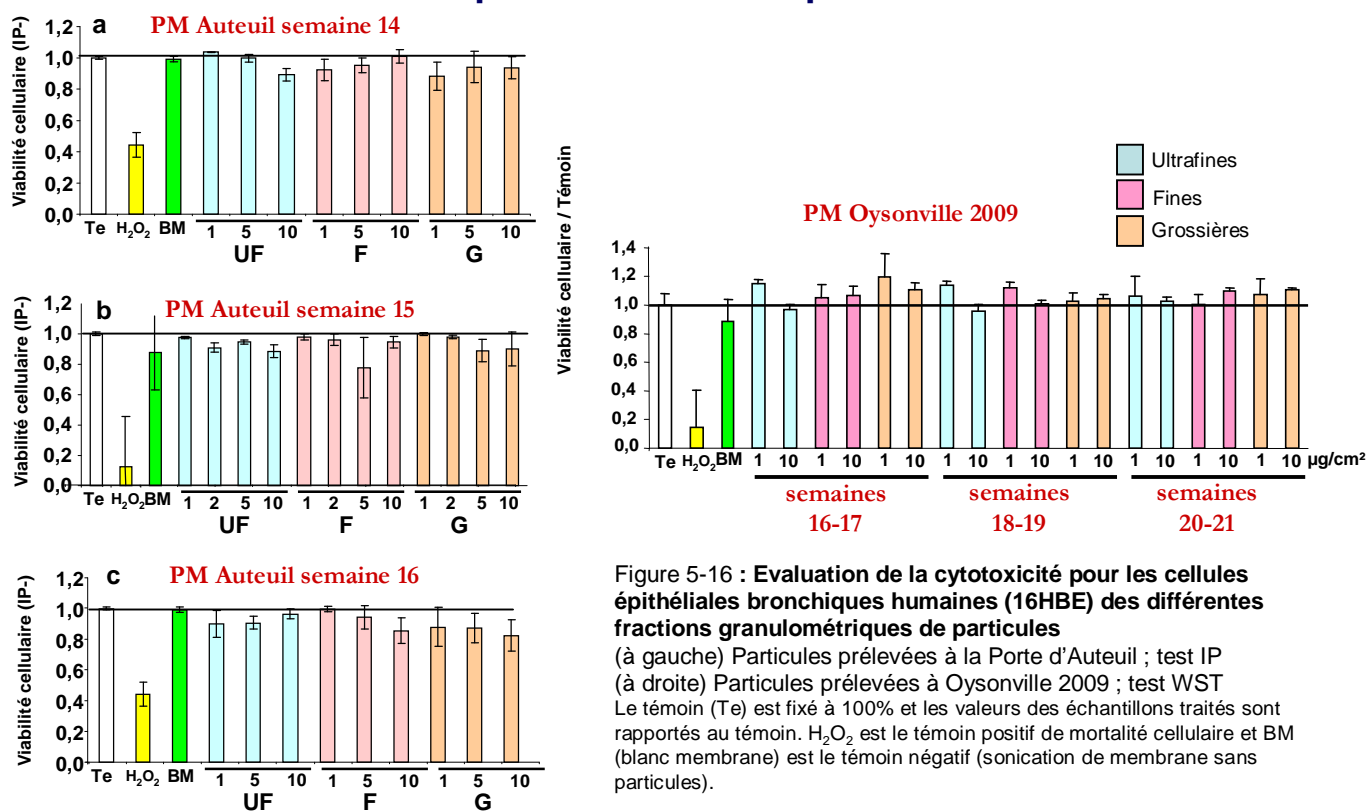


Figure 5-16 : Evaluation de la cytotoxicité pour les cellules épithéliales bronchiques humaines (16HBE) des différentes fractions granulométriques de particules (à gauche) Particules prélevées à la Porte d'Auteuil ; test IP (à droite) Particules prélevées à Oysonville 2009 ; test WST Le témoin (Te) est fixé à 100% et les valeurs des échantillons traités sont rapportés au témoin. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est le témoin positif de mortalité cellulaire et BM (blanc membrane) est le témoin négatif (sonication de membrane sans particules).

## Cellules endothéliales vasculaires pulmonaires humaines

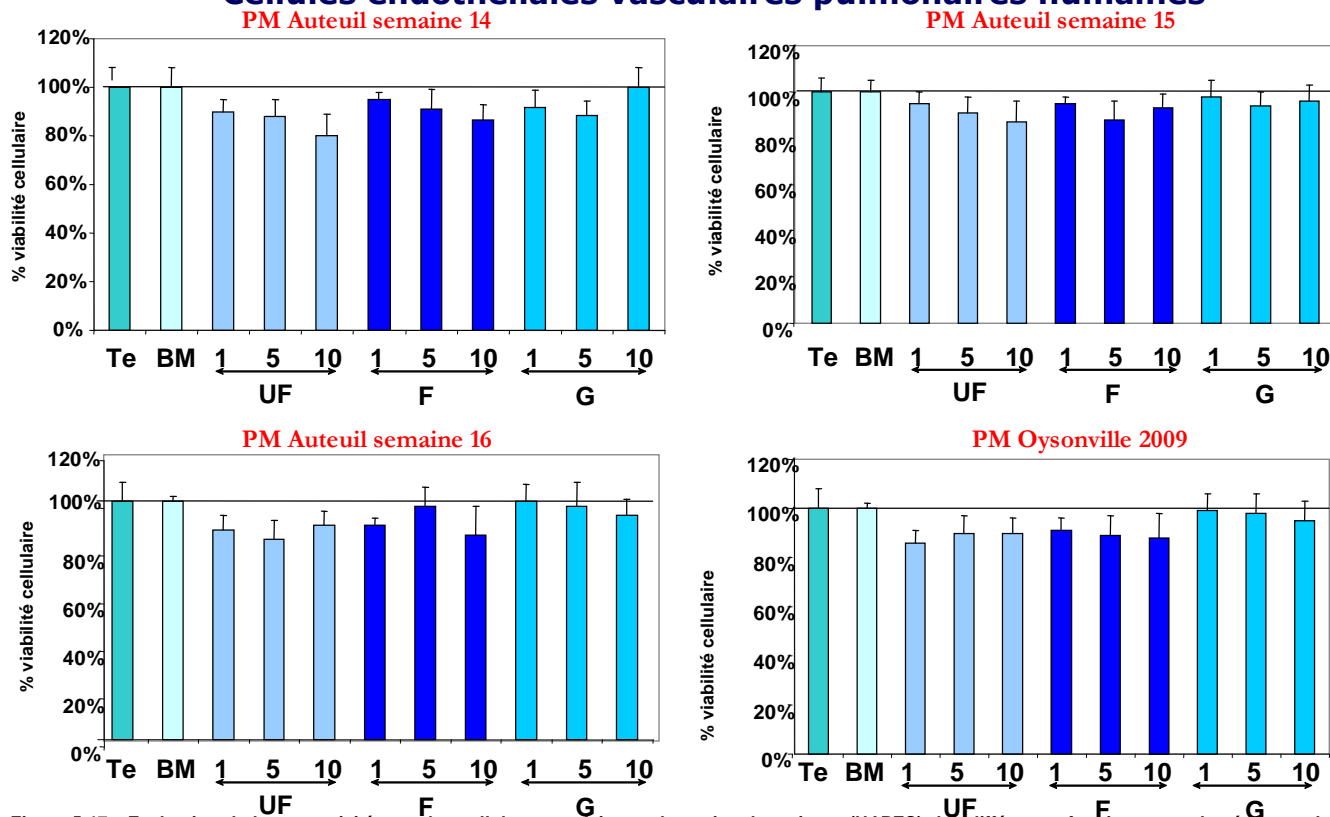


Figure 5-17 : Evaluation de la cytotoxicité pour les cellules vasculaires pulmonaires humaines (HAPEC) des différentes fractions granulométriques de particules prélevées à la Porte d'Auteuil et des particules prélevées à Oysonville en 2009 (les résultats des différentes semaines ont été groupés); test WST-1. Le témoin (Te) est fixé à 100% et les valeurs des échantillons traités sont rapportées au témoin. BM (blanc membrane) est le témoin négatif (sonication de membrane sans particules).

## **5-6 : Etudes toxicologiques**

### *5-6-1 : Cytotoxicité des particules*

L'évaluation de la cytotoxicité des différentes fractions granulométriques a été réalisée par le dénombrement en cytométrie de flux des cellules mortes ayant intégré le fluorochrome, l'iodure de propidium (test IP), ou par la mesure de l'activité métabolique mitochondriale (test WST-1). Il s'agit de déterminer les concentrations non cytotoxiques afin de pouvoir évaluer par la suite les réactions d'adaptation/défense des cellules face au stress particulaire.

Les particules ont été testées dans une gamme de concentration comprise entre 1 et 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , sans aller au-delà afin de rester dans des gammes de concentrations réalistes (Li et coll., 2003b). Par ailleurs, des études précédentes réalisées avec les cellules épithéliales bronchiques ont montré que les particules diesel, des  $\text{PM}_{2,5}$  et des particules ultrafines, fines et grossières n'induisent pas de cytotoxicité à ces concentrations mais par contre induisent un stress oxydant et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Boland et coll, 2001, Baulig et coll., 2004, Ramgolam et coll, 2009).

Les résultats sont présentés Figures 5-16 et 5-17. Les particules collectées à la Porte d'Auteuil (semaines 14, 15 et 16) n'induisent pas de cytotoxicité pour les CEpB humaines ni pour les cellules endothéliales vasculaires pulmonaires humaines (CEnP) jusqu'à une concentration de 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Il en est de même pour les particules collectées à Oysonville en 2008 (non illustré) et en 2009 (Figures 5-16 et 5-17).

Des concentrations jusqu'à 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  vont donc pouvoir être utilisées pour étudier les autres réponses cellulaires.

**En résumé : Quels que soient les sites considérés (trafic ou rural) et les fractions granulométriques considérées (ultrafines, fines ou grossières), il n'a pas été observé d'effets cytotoxiques pour les cellules épithéliales bronchiques (CEpB) et endothéliales pulmonaires (CEnP) humaines jusqu'à une concentration de 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ .**

### *5-6-2 : Effet des particules sur l'expression de gènes du métabolisme des xénobiotiques*

Lors de la pénétration de xénobiotiques dans l'organisme, ceux-ci vont pouvoir être éliminés grâce à l'intervention d'un large équipement enzymatique constituant ce que l'on appelle les EMX : enzymes du métabolisme des xénobiotiques (figure 5-18a). Les xénobiotiques entrant dans la cellule sont soit expulsés via des pompes telles que PgP (glycoprotéine P) ou pris en charge par une batterie d'enzymes qui jouent un rôle dans deux phases de ce mécanisme. Les enzymes de phase I, dites de fonctionnalisation, peuvent catalyser la réaction de monoxygénation, réaction la plus fréquente. Ensuite, les enzymes de phase II vont conjuguer le xénobiotique avec un groupement comme le glutathion afin de neutraliser le groupement réactif et/ou de rendre le xénobiotique plus hydrophyle pour l'éliminer de l'organisme. Enfin, le xénobiotique ainsi métabolisé va pouvoir être transporté à l'extérieur de la cellule par des protéines de phase III. Pour cette étude nous sommes intéressés à plusieurs enzymes : le CYP1A1 (cytochrome P450 1A1, spécifiquement induit par les HAP), enzyme de phase I ; et la GSTP1 (glutathion-S-transférase P1) et NQO-1 (NADPH quinone oxydoréductase 1), deux enzymes de phase II. L'intérêt d'étudier ces enzymes réside dans leur inductibilité par l'exposition à des xénobiotiques.

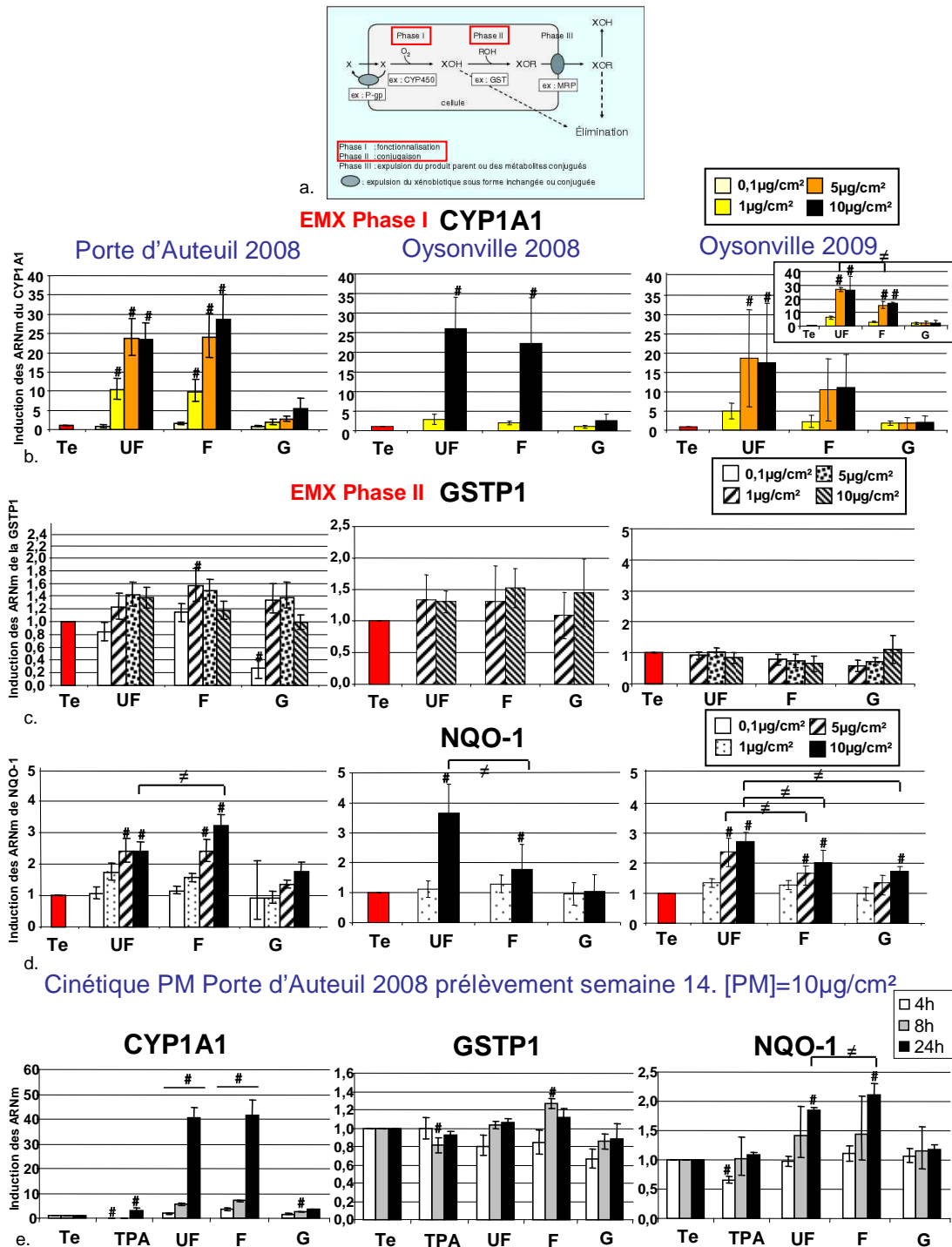


Figure 5-18 : Effet des différentes fractions granulométriques de particules sur l'expression de gènes du métabolisme des xénobiotiques par les cellules épithéliales bronchiques humaines. Les cellules 16HBE ont été traitées pendant 24h avec des concentrations de particules allant de 0,1 à 10 µg/cm<sup>2</sup>. L'expression des ARNm a ensuite été étudiée par qPCR. Les résultats (pour b,c,d) des différentes semaines ont été moyennés pour chaque fraction granulométrique (moyenne de 2 réplicats x 3 semaines = moyenne de 6 valeurs). Pour n=2. Les comparaisons par rapport au témoin ont été réalisées grâce à une analyse de variance (ANOVA) suivie par un test t de Dunnett. Les comparaisons entre fractions ont été réalisées grâce au test t de Student. # signifie que les valeurs sont significativement différentes du témoin non traité, signifie que les valeurs sont significativement différentes entre elles.

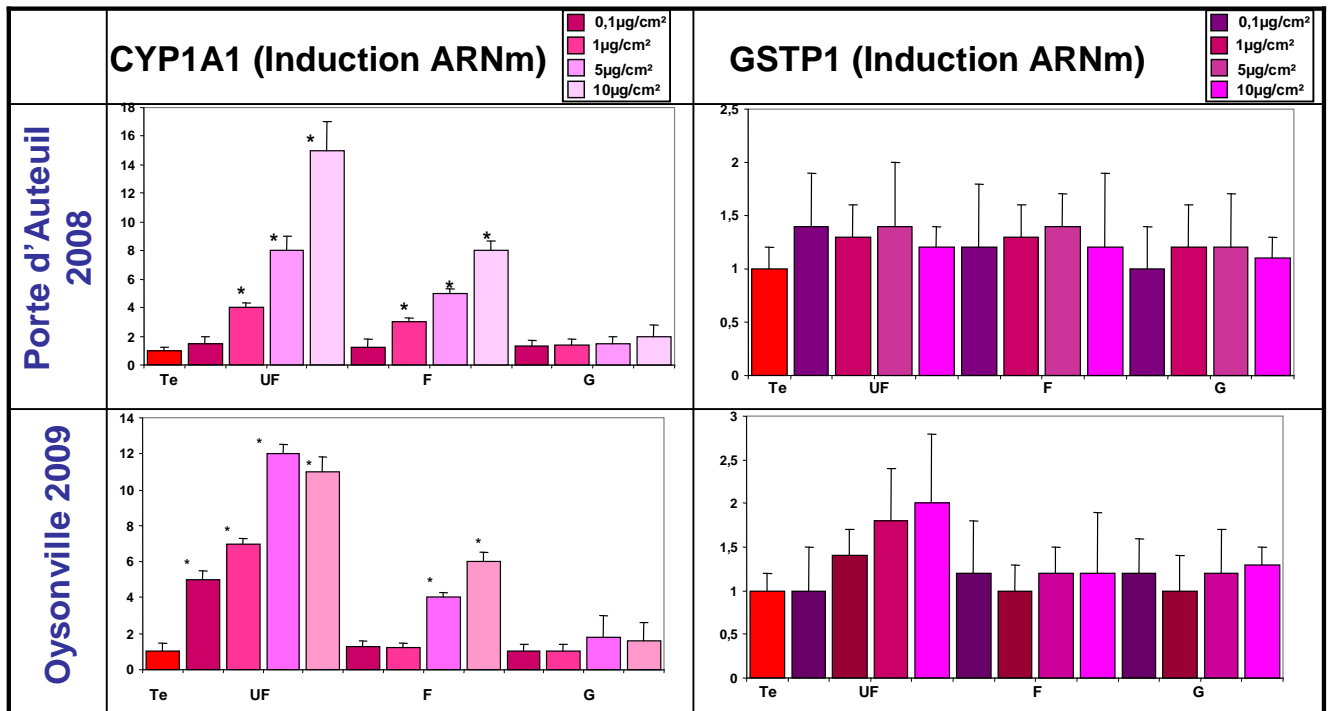
- a. Schéma de la métabolisation d'un xénobiotique dans une cellule.
- b. Expression des ARNm du cytochrome P450 1A1 (CYP1A1), enzyme du métabolisme des xénobiotiques de phase I (EMX Phase I).
- c. Expression des ARNm de la glutathion-S-transférase P1 (GSTP1), EMX de phase II.
- d. Expression des ARNm de la NADPH quinone oxydoréductase 1 (NQO-1), EMX de phase II.
- e : étude cinétique de l'expression du CYP 1A1, GSTP1 et NQO-1 à 4, 8 et 24h réalisée avec les particules de la semaine 14 de la porte d'Auteuil (site urbain) à 10µg/cm<sup>2</sup>.



**Cytochrome P450 1A1 :**

L'exposition des CEpB à des concentrations croissantes de particules issues du milieu urbain a entraîné des inductions très fortes du CYP1A1 avec les PUF[0,25-0,03] (facteur d'induction 25) et les PF[1,65-0,25] (facteur d'induction 30), celles-ci étant dépendantes de la concentration en particules (figure 5-18b). L'induction est significative dès 1 µg/cm<sup>2</sup> pour les PUF[0,25-0,03] et les PF[1,65-0,25] et pratiquement maximale à 5µg/cm<sup>2</sup>. Il n'a pas été observé de différences significatives entre les fractions PUF et PF. Une étude cinétique de l'expression de ce gène dans les CEpB a été réalisée uniquement avec les particules d'Auteuil de la semaine 14 qui étaient en quantité suffisante (figure 5-18e). Elle montre une induction significative dès 4 h d'exposition aux PUF[0,25-0,03] et aux PF[1,65-0,25] qui augmente jusqu'à 24h. Les PG[10-1,65] n'ont pratiquement aucun effet.

L'exposition des CEnP à des concentrations croissantes de particules issues du milieu urbain a entraîné des inductions fortes du CYP1A1 avec les PUF[0,25-0,03] (facteur d'induction 15) et plus modérées avec les PF[1,65-0,25] (facteur d'induction 8), celles-ci étant dépendantes de la concentration en particules ((figure 5-19). L'induction est significative dès 1 µg/cm<sup>2</sup> pour les PUF[0,25-0,03] et les PUF[0,25-0,03] L'induction du CYP1A1 est significativement plus élevée pour les PUF[0,25-0,03] par rapport aux PUF[0,25-0,03] et les PG[10-1,65] n'ont aucun effet.

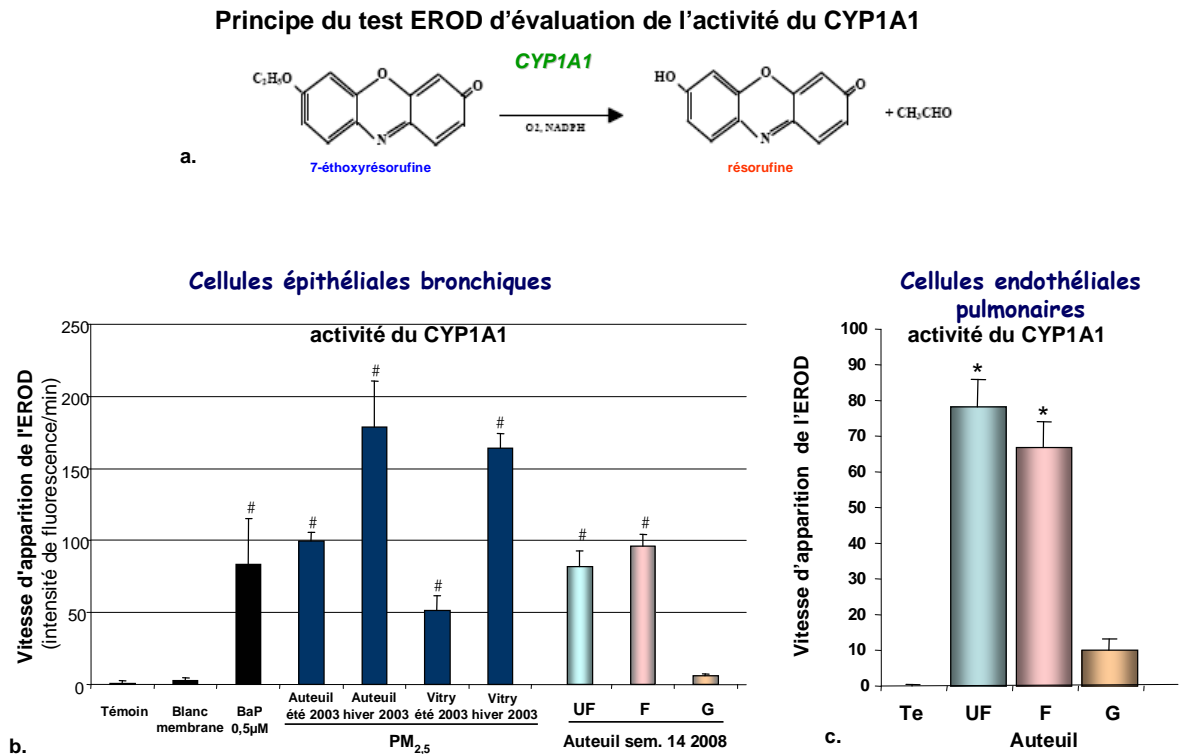


**Figure 5-19: Effets des particules de la porte d'Auteuil et de Oysonville (2009) sur l'expression des gènes du métabolisme des xénobiotiques des cellules endothéliales vasculaires pulmonaires humaines (CEnP).** Les cellules ont été traitées pendant 24h avec des concentrations de particules allant de 0,1 à 10 µg/cm<sup>2</sup>.

Les résultats des différentes semaines ont été regroupés afin d'avoir une moyenne d'expression par fraction granulométrique (pas de différence significative entre les semaines, résultats non montrés). Les résultats représentent la moyenne de 2 réplicats x 3 semaines (n = 6)

\* Significativement différents des témoins (Analyse de variance ANOVA suivie d'un test t de Dunett, p<0.05)

Afin de voir si l'induction des ARNm du CYP1A1 abouti à une augmentation de l'activité enzymatique de cette enzyme, des expositions de cellules primaires nasales ainsi que de cellules endothéliales vasculaires pulmonaires humaines ont été réalisées avec les particules à 10 µg/cm<sup>2</sup>, et l'activité du CYP1A1 a été déterminée par le test EROD ((figure 5-20 b et c).



**Figure 5-20 : Effet des particules de la Porte d'Auteuil sur l'activité du CYP1A1.** Les cellules épithéliales primaires nasales humaines (b.) ou les cellules endothéliales vasculaires pulmonaires humaines (c.) ont été traitées pendant 24h avec 10 µg/cm<sup>2</sup> de particules et 0,5 µM de BaP (témoin positif) et ensuite incubées avec l'éthoxyrésorufine qui, lorsqu'il est transformé par le cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) devient un produit fluorescent (illustré en a.).

Les résultats (b.) représentent la moyenne de 3 échantillons. Les comparaisons ont été réalisées grâce à une analyse de variance (ANOVA) suivie par un test t de Dunnett. # signifie que les valeurs sont significativement différentes du témoin non traité.

Les résultats (c.) des différentes semaines ont été regroupés afin d'avoir une moyenne d'activité par fraction granulométrique (pas de différence significative entre les semaines, résultats non montrés)

Les résultats représentent la moyenne de 2 réplicats x 3 semaines (n = 6) \* Significativement différents des témoins (Analyse de variance ANOVA suivie d'un test t de Dunnett, p<0.05)

Cette expérience a été réalisée avec différentes particules dont celles prélevées à la Porte d'Auteuil en 2008, et du BaP (benzo[a]pyrène) qui est un HAP, il constitue par conséquent un contrôle positif. Après 24h de traitement, l'activité du CYP1A1 augmente beaucoup avec le BaP, les PM<sub>2,5</sub> prélevées à la Porte d'Auteuil et à Vitry en 2003 (le taux d'induction étant concordant avec la quantité de HAP qu'elles contiennent) et aussi avec les PUF[0,25-0,03] et les PF[1,65-0,25] prélevées à la Porte d'Auteuil en 2008, ces fractions étant chargées en HAP (figure 5-20b). Par contre les PG[10-1,65] n'ont aucun effet.

Comme pour les cellules épithéliales bronchiques, on observe dans les cellules endothéliales vasculaires pulmonaires humaines, une augmentation importante de l'activité du CYP1A1 après une exposition de 24h aux PUF[0,25-0,03] et les PF[1,65-0,25] prélevées à la Porte d'Auteuil en 2008 (figure 5-20c).

Pour les deux types cellulaires l'activité EROD est globalement corrélée à la mesure de l'expression de l'ARNm du CYP1A1.

Les particules PF[1-0,17] et PUF[0,17-0,03] prélevées à Oysonville en 2009 induisent également l'expression du CYP1A1 dans les CEpB mais avec des effets significatifs à partir de 5 µg/cm<sup>2</sup> seulement (figure 5-18b). Il est observé une très grande variabilité entre les séries de prélèvement qui ont été réalisées. Cette variabilité est liée au prélèvement des semaines (20 et 21). Lorsque ce prélèvement n'est plus considéré, on obtient des facteurs d'induction avec les PF[1-0,17] et PUF[0,17-0,03] plus élevés et cohérents entre les 2 prélèvements restants. L'induction est alors significativement moins élevée pour les PF[1-0,17] par rapport aux PUF[0,17-0,03], différence qui n'avait pas été observée pour les particules urbaines.

L'exposition des CEnP à des concentrations croissantes de particules prélevées à Oysonville a entraîné des inductions significatives du CYP1A1 avec les PUF[0,17-0,03] (dès 0,1µg/cm<sup>2</sup>) et plus modérées avec les PF[1-0,17] (dès 5µg/cm<sup>2</sup>), celles-ci étant dépendantes de la concentration en particules (figure 5-19). Comme pour les particules urbaines, l'induction du CYP1A1 est significativement plus élevée pour les PUF par rapport aux PF.

*Dans les deux types cellulaires, les fractions fines et ultrafines des sites urbains et ruraux induisent très fortement l'expression du CYP1A1 mais le niveau d'induction est toujours plus élevé dans les CEpB que dans les CEnP. Par contre dans ces dernières on constate un effet significativement plus élevé des PUF par rapport aux PF quels que soient les sites.*

#### *NADPH quinone oxydoréductase 1 :*

La NQO1 est impliquée dans la réduction monoélectronique de quinones et est connue pour être induite par des composés électrophiles et des espèces oxydantes.

De nouveau avec les particules d'Auteuil, ce sont les PUF[0,25-0,03] et les PF[1,65-0,25] qui induisent significativement l'expression de NQO-1 à partir de 5 µg/cm<sup>2</sup> dans les CEpB. Les facteurs d'induction sont beaucoup moins importants que ceux observés avec le CYP1A1. En effet, les PUF et les PF ont induit les ARNm de NQO-1 jusqu'à un facteur d'induction légèrement supérieur à 3 (figure 5-18d). L'étude cinétique réalisée avec les particules urbaines de la semaine 14 montre que l'induction n'est significative avec les PUF et PF qu'à partir de 24h d'exposition (figure 5-18e).

Les particules d'Oysonville induisent également significativement l'expression de NQO-1 à partir de 5 µg/cm<sup>2</sup> dans les CEpB. Comme cela avait été noté pour le CYP1A1, on observe une tendance à un effet plus faible des PF[1-0,17] par rapport aux PUF[0,17-0,03] (figure 5-18d).

#### *Glutathion-S-Transférase P1 :*

Comparativement aux autres EMX, la GSTP1 est très faiblement induite par les particules quelle que soit leur origine dans les CEpB comme dans les CEnP.

Dans les CEpB, avec les particules urbaines, on observe une tendance à l'induction mais elle n'est significative et avec un facteur faible de 1,6 que pour les particules F. De façon surprenante cette induction s'observe à 1 µg/cm<sup>2</sup> et pas pour les concentrations supérieures. (figure 5-18c). L'étude cinétique menée à 4, 8 et 24 h (figure 5-18e) dans les CEpB semble indiquer que le maximum d'induction est observé à 8h pour les PF mais il reste faible (x1,26).

En ce qui concerne les CEnP, on observe une tendance à l'induction pour les PUF prélevées à Oysonville et de manière concentration dépendante. Cependant il est à noter d'importants écarts types (figure 5-19).

#### **En résumé :**

**Les particules urbaines comme les particules rurales induisent fortement l'expression du cytochrome P450 1A1 dans les 2 types cellulaires, plus modérément mais significativement la NADPH quinone oxydoréductase 1 et rarement la glutathion-S-transférase P1.**

**Alors que les fractions fines et ultrafines des particules urbaines ont un effet inducteur similaire dans les cellules épithéliales bronchiques humaines, les particules ultrafines rurales semblent induire davantage l'expression du cytochrome P450 1A1 et de la NADPH quinone oxydoréductase 1 que les particules fines.**

**Dans les cellules endothéliales pulmonaires les particules ultrafines urbaines comme rurales induisent davantage l'expression du CYP1A1 par rapport aux PF mais les niveaux d'induction sont plus faibles que dans les cellules épithéliales bronchiques.**

#### *5-6-3 : Effet des particules sur la production d'Espèces Activées de l'Oxygène (EAO) et l'expression d'enzymes antioxydantes*

Des EAO sont produites continuellement par la cellule et leur niveau est contrôlé grâce à la présence de systèmes anti-oxydants enzymatiques et non-enzymatiques. Certains xénobiotiques ou le produit de leur métabolisation constituent une source exogène d'EAO qui découle de leur capacité intrinsèque à produire des EAO. La réactivité des EAO est responsable de dommages à la cellule, c'est pour cela qu'elle est dotée de mécanismes de défense visant à éliminer ce danger: ce sont les enzymes antioxydantes. L'implication d'un stress oxydant dans les effets des particules a été évalué d'une part en évaluant la production intracellulaire d'EAO et en mesurant l'expression de 2 enzymes anti-oxydantes (l'hème oxygénase (HO-1) et la superoxyde dismutase à manganèse (SOD-2)).

### Production intracellulaire d'EAO :

Dans les CEpB la sonde HE (hydroxyethidine) a été utilisée pour détecter l'augmentation de la production intracellulaire d'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$  qui est une EAO). Après 4h de traitement avec les particules de la Porte d'Auteuil, on observe (figure 5-21a) une augmentation de la quantité d'anion superoxyde qui varie selon les fractions de particules et les semaines de prélèvement : seules les PUF[0,25-0,03] de la semaine 16, les PF[1,65-0,25] et les PG[10-1,65] de la semaine 14 présentent une augmentation du pourcentage de cellules ayant plus d'anion superoxyde. Il n'a pas été possible de réaliser ce test avec les particules provenant de Oysonville 2009 en raison d'une quantité insuffisante de particules disponibles.

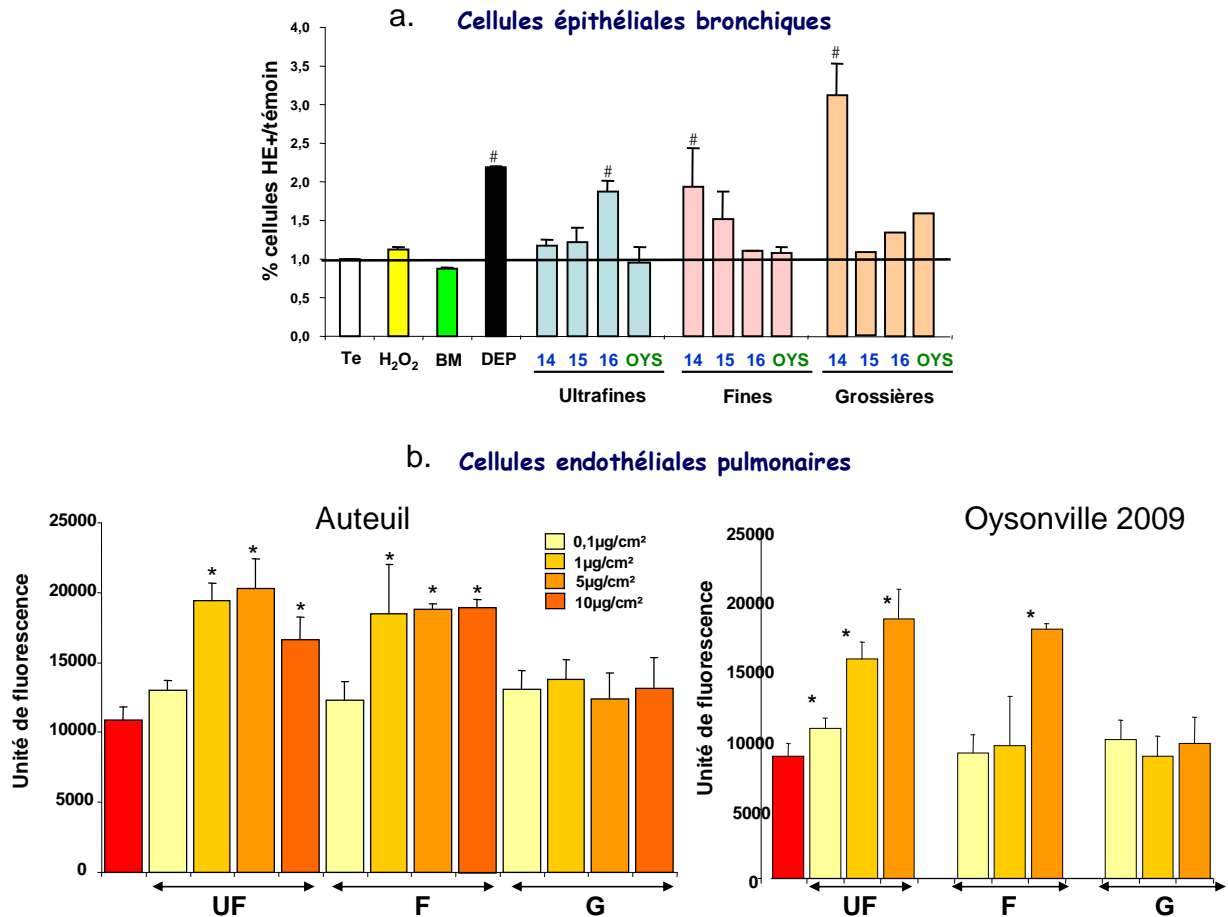


Figure 5-21 : Effet des particules sur la production intracellulaire d'espèces activées de l'oxygène.

(a.) Les **cellules épithéliales bronchiques humaines** ont été traitées pendant 4h avec 10 µg/cm<sup>2</sup> de particules et ensuite incubées avec la sonde hydroxyethidine (HE) qui fluoresce quand elle est oxydée par l'anion superoxyde. La mesure de ce paramètre a été effectuée par cytométrie en flux. Les résultats représentent la moyenne de 2 échantillons. Les comparaisons ont été réalisées grâce à une analyse de variance (ANOVA) suivie par un test t de Dunnett. # signifie que les valeurs sont significativement différentes du témoin non traité.

(b.) les **cellules endothéliales vasculaires pulmonaires humaines** subconfluentes ont été traitées pendant 4h de 0,1 à 10 µg/cm<sup>2</sup> des différentes fractions granulométriques de particules prélevées Porte d'Auteuil ou à Oysonville en 2009 et après avoir été préincubées avec la sonde H<sub>2</sub>DCF-DA, qui fluoresce quand elle est oxydée par les EAO. La mesure de ce paramètre a été effectuée par spectrofluorimétrie. Les résultats des différentes semaines ont été regroupés afin d'avoir une moyenne de production d'EAO par fraction granulométrique (pas de différence significative entre les semaines, résultats non montrés) Les résultats représentent la moyenne de 3 réplicats x 3 semaines (n = 9) \* Significativement différents des témoins (Analyse de variance ANOVA suivie d'un test t de Dunnett, p<0.05)

Dans les cellules CEnP, la sonde H<sub>2</sub>DCF-DA a été utilisée pour mettre en évidence la production intracellulaire d'espèces activées de l'oxygène (EAO). Après 4h de traitement avec les particules prélevées porte d'Auteuil, on observe, avec les PUF[0,25-0,03] et les PF[1,65-0,25] une augmentation significative de la production d'EAO dès 1µg/cm<sup>2</sup> (Figure 5-21b) alors qu'il n'est jamais observé d'effet significatif avec les PG[10-1,65] même à la plus forte concentration testée.

Pour les particules prélevées à Oysonville, l'augmentation de la production des EAO est significative avec les PUF[0,17-0,03] dès 0,1µg/cm<sup>2</sup> et à 5µg/cm<sup>2</sup> en ce qui concerne les PF[1-0,17] (Figure 5-21b). En raison de la quantité insuffisante de particules, la concentration de 10µg/cm<sup>2</sup> n'a pas été effectuée.

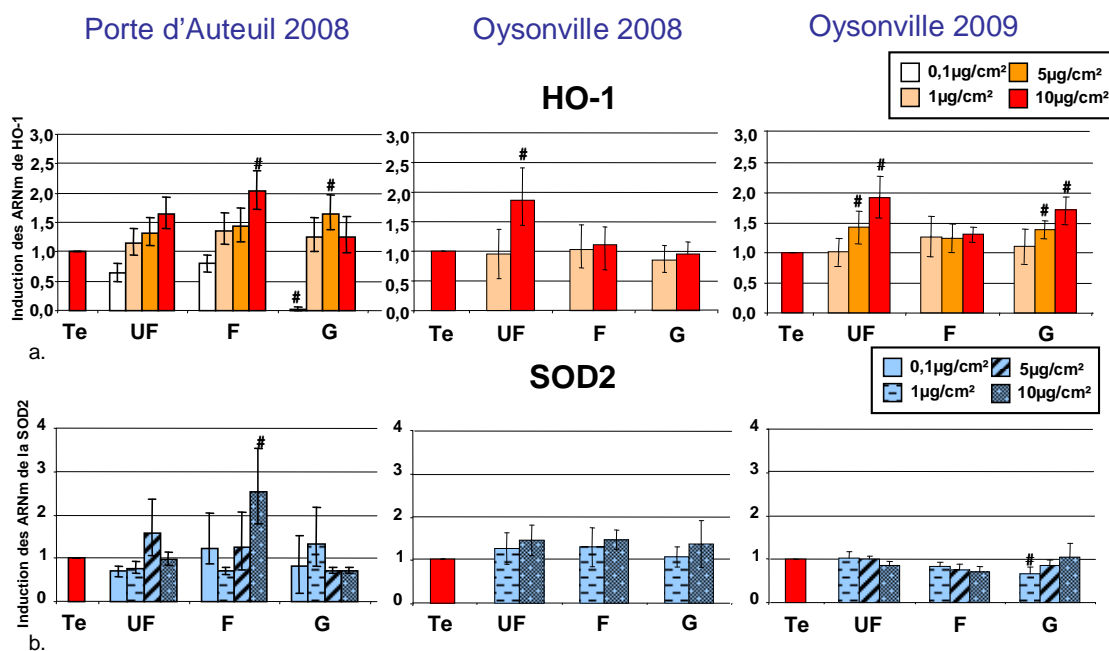
### Hème oxygénase 1 :

L'HO-1 (hème oxygénase 1) est une enzyme qui catabolisme l'hème, et qui est connue pour être activée par divers stress.

Dans les CEpB exposées aux particules d'Auteuil (Figure 5-22a), on observe que les fractions ont une tendance à l'augmentation de l'expression de HO-1 dépendante de la concentration mais un effet significatif n'est observé que pour les PF[1,65-0,25] à 10 µg/cm<sup>2</sup> avec un doublement de l'expression par rapport aux cellules témoin ainsi qu'une induction avec les PG[10-1,65] à 5 µg/cm<sup>2</sup>.

Avec les particules rurales, une induction significative est observée dans les CEpB dès 5 µg/cm<sup>2</sup> puis augmente à la concentration supérieure (10 µg/cm<sup>2</sup>) pour les PUF[0,17-0,03] et PG[10-1] (figure 5-22a).

L'étude cinétique réalisée avec un lot de particules prélevées à Porte d'Auteuil montre que l'expression de HO-1 est transitoire dans les CEpB (Figure 5-22c). En effet, avec les 3 classes de taille on observe un maximum d'induction à 8h puis une stabilisation (PF) ou une baisse de cette induction (PUF et PG) à 24h, celle-ci étant proche du niveau constitutif. Il aurait sans doute été plus judicieux d'étudier l'expression des différents gènes d'intérêt à deux temps : 8h pour suivre ceux liés au stress oxydant et 24 h pour les autres. Cependant les quantités limitées de particules nous ont amené à faire des choix a priori sur les protocoles expérimentaux. Cette étude cinétique révèle à 8h une induction significative avec les 3 classes de taille (particules semaine 14) avec un effet significativement supérieur des PUF[0,25-0,03] (Figure 22c). Ces différences ne s'observent plus lorsque l'on considère les résultats obtenus à 24h avec les particules des 3 semaines de prélèvement (figure 5-22a)



### Cinétique PM Porte d'Auteuil 2008 prélèvement semaine 14. [PM]=10µg/cm<sup>2</sup>

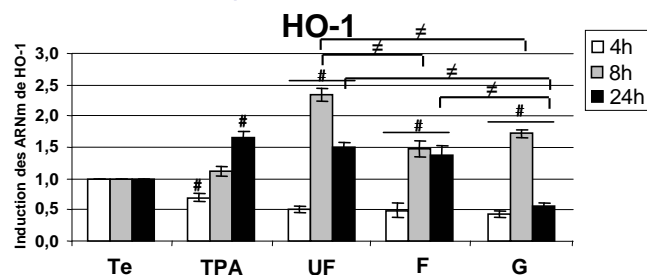
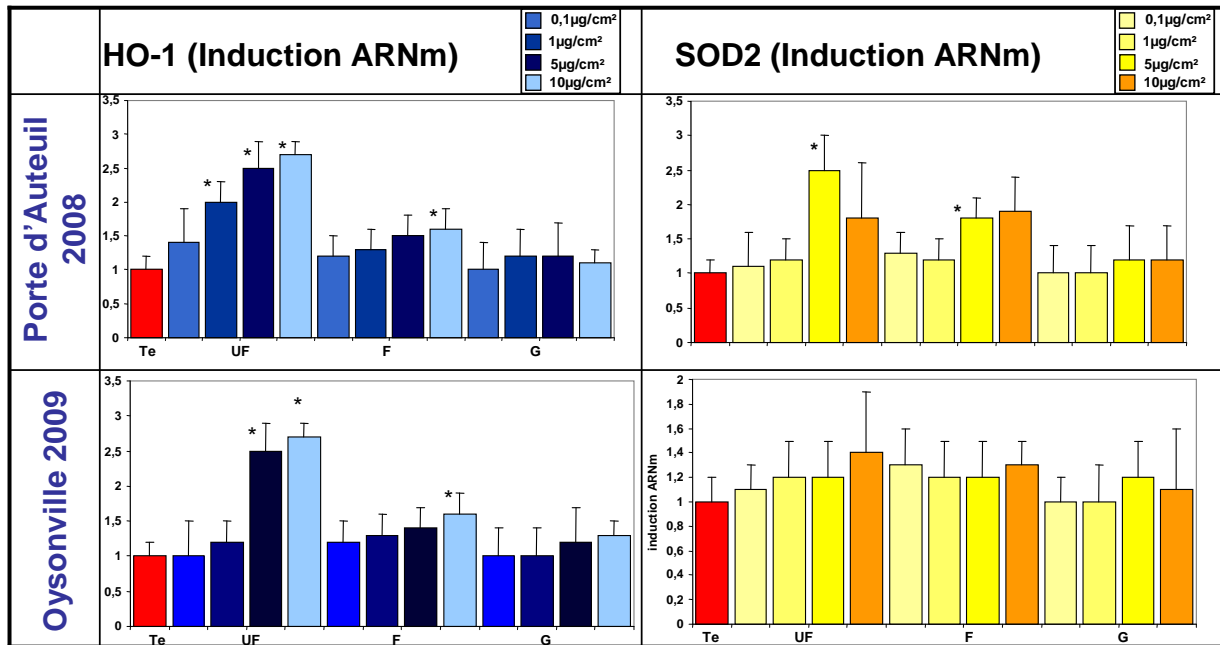


Figure 5-22 : Effet des différentes fractions granulométriques des particules sur l'expression d'enzymes anti-oxydantes par les cellules épithéliales bronchiques humaines.

Les cellules 16HBE ont été traitées pendant 24h avec 0,1 à 10 µg/cm<sup>2</sup> de particules. L'analyse de l'expression des ARNm a été faite par qPCR. Les résultats (pour a et b) des différentes semaines ont été moyennés pour chaque fraction granulométrique (moyenne de 2 réplicats x 3 semaines = moyenne de 6 valeurs). Pour la cinétique (c) n=2. Les comparaisons entre fractions ont été réalisées grâce au test t de Student. # signifie que les valeurs sont significativement différentes du témoin non traité, ≠ signifie que les valeurs sont significativement différentes entre elles. Les gènes étudiés sont (a) : l'hème oxygénase 1 (HO-1), (b) : superoxyde dismutase à manganèse (SOD2).

c : étude cinétique de l'expression de HO-1 et SOD2 à 4, 8 et 24h réalisée avec les particules de la semaine 14 de la porte d'Auteuil à 10µg/cm<sup>2</sup>.

Dans les CEnP exposées aux particules d'Auteuil (Figure 5-23), on observe une augmentation significative, dès 1 µg/cm<sup>2</sup> de PUF[0,25-0,03], de l'expression de HO-1 dépendante de la concentration. Pour les PF[1,65-0,25], on observe une tendance à l'augmentation de l'expression de HO-1 significative à 10 µg/cm<sup>2</sup>. Des résultats similaires sont observés avec les particules rurales (Figure 5-23). Les inductions de HO-1 sont légèrement supérieures dans les CEnP par rapport aux CEpB. Néanmoins une étude cinétique d'expression de ce gène dans les CEnP n'ayant pas été réalisée, la différence de niveau d'induction pourrait être liée à une cinétique d'induction différente entre les 2 types cellulaires.



**Figure 5-23 : Effets des particules de la porte d'Auteuil et de Oysonville (2009) sur l'expression d'enzymes antioxydantes dans des cellules endothéliales vasculaires pulmonaires humaines (CEnP).** Les cellules ont été traitées pendant 24h avec des concentrations de particules allant de 0,1 à 10 µg/cm<sup>2</sup>. Les résultats des différentes semaines ont été regroupés afin d'avoir une moyenne d'expression par fraction granulométrique (pas de différence significative entre les semaines, résultats non montrés) Les résultats représentent la moyenne de 2 réplicats x 3 semaines (n = 6) \* Significativement différents des témoins (Analyse de variance ANOVA suivie d'un test t de Dunnett, p<0.05)

#### Superoxyde dismutase 2 (Mn SOD)

La SOD2 (superoxyde dismutase) qui est une metalloprotéine qui catalyse la dismutation du superoxyde en oxygène et peroxyde d'hydrogène ( $O_2^- \rightarrow O_2 + H_2O$ ). Elle est présente au niveau mitochondrial et est induite lors d'un stress oxydant.

Les CEpB traitées pendant 24h avec les particules de la Porte d'Auteuil (Figure 5-22b), montrent une variabilité importante des réponses. Un effet significatif n'est observé que pour les PF[1,65-0,25] à 10µg/cm<sup>2</sup>. Il n'a été observé aucun effet avec les particules rurales quelle que soit la fraction ou la concentration considérée (Figure 5-22b) dans les CEpB.

Les CEnP traitées pendant 24h avec les particules de la Porte d'Auteuil (Figure 5-23) montrent également une variabilité importante des réponses. Un effet significatif n'est observé que pour les PUF et les PF à 5µg/cm<sup>2</sup> qui ne s'observe plus à la concentration supérieure. Il n'a également été observé aucun effet avec les particules rurales quelle que soit la fraction ou la concentration considérée (Figure 5-23).

#### En résumé :

**L'induction des enzymes anti-oxydantes par les particules a été plus marquée dans les cellules endothéliales que dans les cellules bronchiques après une exposition de 24h.**

**Ainsi dans les cellules endothéliales les particules ultrafines urbaines comme rurales induisent significativement HO-1 et la SOD-2 (uniquement pour les particules urbaines). Les particules ultrafines ont un effet supérieur aux particules fines et les grossières n'ont pas d'effet. Ces résultats sont corrélés aux mesures de production intracellulaire d'EAO qui confirment l'absence d'effet pro-oxydant des particules grossières.**

**Dans les cellules épithéliales bronchiques on retrouve un effet significatif des particules ultrafines sur l'expression de HO-1 mais seulement pour les particules d'origine rurale.**



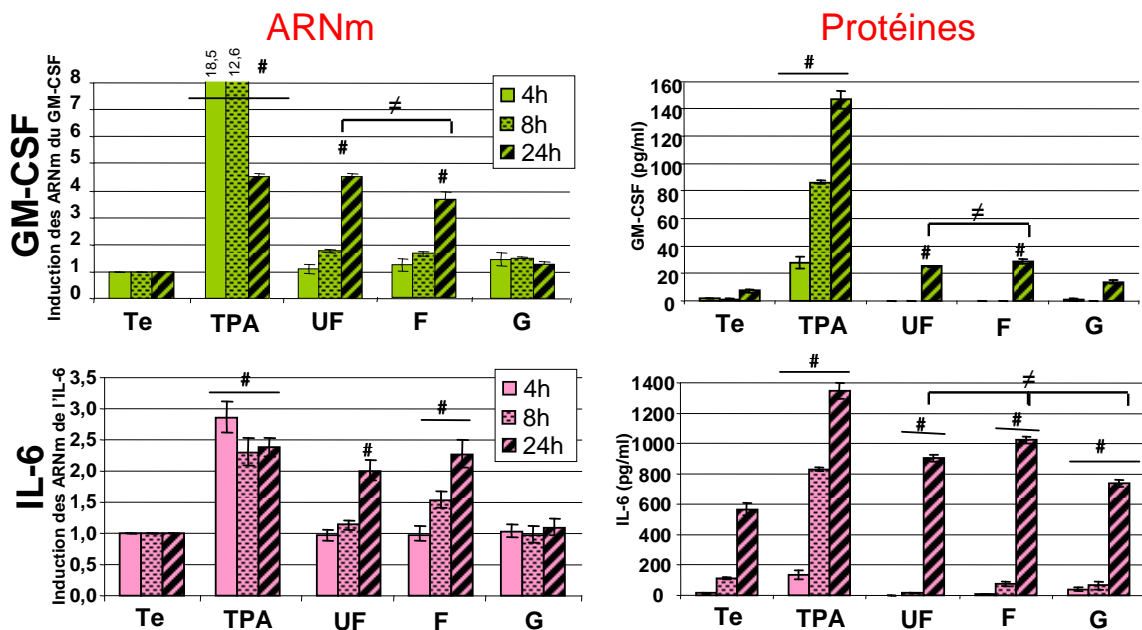
#### 5-6-4 : Effet pro-inflammatoire des particules

La capacité des particules à induire une réponse pro-inflammatoire a été caractérisée en mesurant différents médiateurs pro-inflammatoires dont certains sont communs aux deux types cellulaires et d'autres plus spécifiques à chacun d'entre eux. Ainsi pour les CEpB ont été dosés le GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor), l'IL-6 (interleukine 6), le TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor alpha), l'IL-8 (interleukine 8) et l'amphiréguline alors que pour les CEnP ont été dosés l'IL-8 et le TNF $\alpha$ . L'effet des différentes fractions granulométriques urbaines et rurales sur ces médiateurs a été évalué d'une part en mesurant l'induction des ARNm par qPCR et d'autre part en dosant les sécrétions protéiques par test ELISA.

##### GM-CSF :

Le GM-CSF, cytokine sécrétée par une variété de cellules, a un rôle de facteur de croissance sur la lignée des monocytes et granulocytes, permettant leur différenciation et leur prolifération. Il augmente également la survie et l'attraction des éosinophiles. De plus, le GM-CSF a la propriété d'activer les cellules de Langerhans qui sont des cellules présentatrices d'antigène et qui se trouvent entre les cellules de l'épithélium respiratoire. Cette cytokine constitue un biomarqueur sensible de la réponse pro-inflammatoire induite par les particules (Diesel ou atmosphériques) (Boland et coll., 1999, Ramgolam et coll., 2008).

L'étude cinétique de l'expression de ce gène dans les CEpB montre un maximum d'induction à 24h avec les PUF[0,25-0,03] (x4,5) et les PF[1,65-0,25] (x3,6) (Figure 5-24). Cette cinétique est très différente de celle observée avec le TPA, un ester de phorbol connu pour être un inducteur puissant de l'expression du GM-CSF qui est apparente dès 4 h de traitement (x18,5). La cinétique retardée observée avec les particules peut être liée à la nécessité d'internalisation des particules puis de la métabolisation des composés organiques des particules. L'augmentation d'expression du GM-CSF se concrétise par une augmentation de la sécrétion de la protéine. Elle n'est significative qu'à partir de 24h pour les cellules exposées aux particules (Figure 5-24).



**Figure 5-24 : Etude cinétique de l'expression de cytokines pro-inflammatoires induite par les particules de la Porte d'Auteuil (semaine 14) dans les cellules épithéliales bronchiques humaines.** Les cellules 16HBE ont été traitées pendant 4, 8 et 24h avec 0,1 à 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de particules. L'analyse de l'expression des ARNm a été faite par qPCR ; le dosage des protéines dans les milieux a été fait par ELISA. Les résultats de deux réplicats ont été moyennés pour les ARNm et de quatre réplicats pour les protéines. Les comparaisons ont été réalisées grâce à une analyse de variance (ANOVA) suivie par un test t de Dunnett. # signifie que les valeurs sont significativement différentes du témoin non traité. # signifie différentes d'une fraction de particule à une autre pour une même concentration.

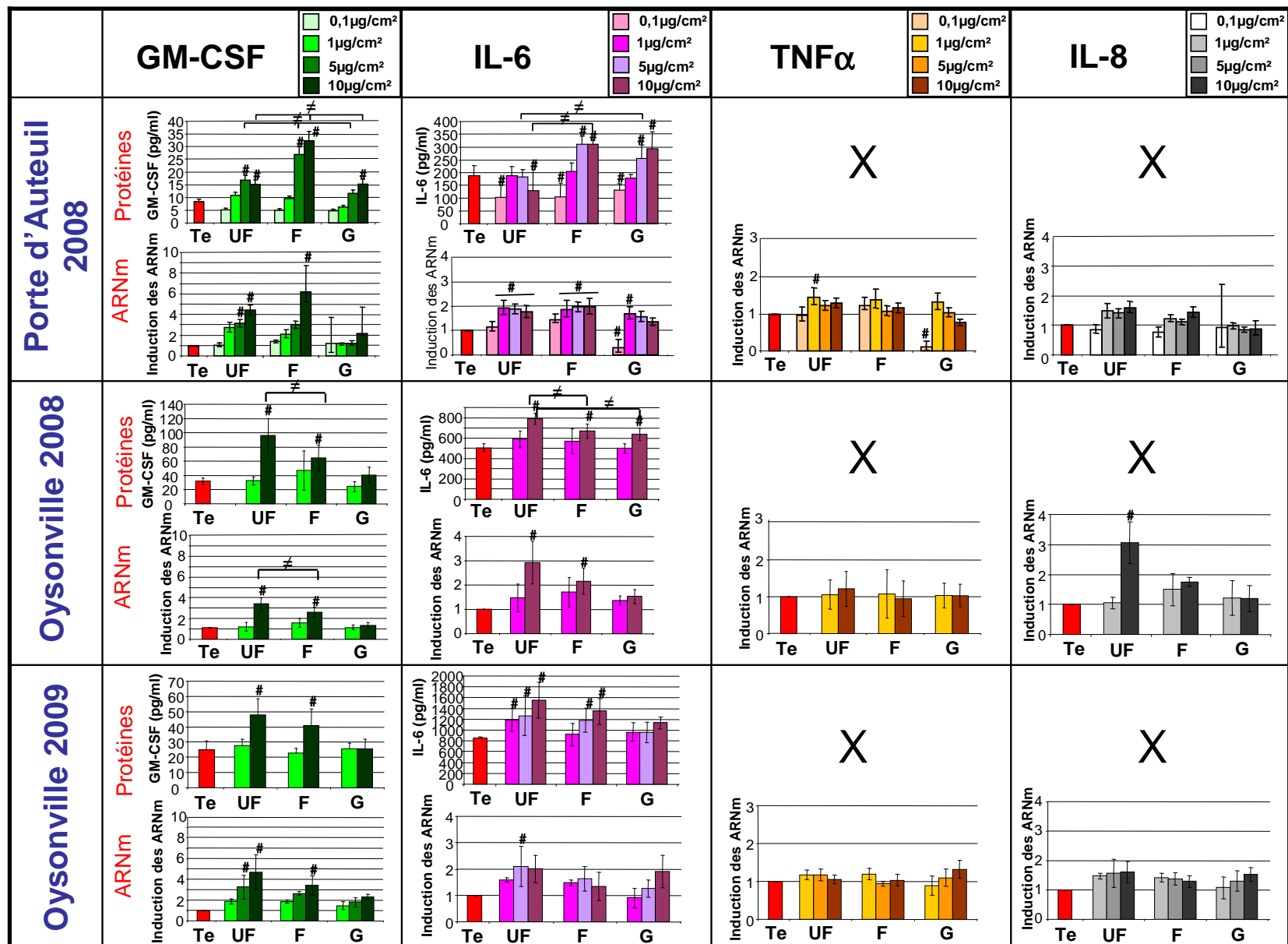


Figure 5-25: Effet des différentes fractions granulométriques particules urbaines et rurales sur l'expression de cytokines pro-inflammatoires. Les cellules 16HBE ont été traitées pendant 24h avec 0,1 à 10 µg/cm<sup>2</sup> de particules. L'analyse de l'expression des ARNm a été faite par qPCR ; le dosage des protéines dans les milieux a été fait par ELISA. Les résultats des différentes semaines ont été moyennés pour chaque fraction granulométrique : pour les ARNm moyenne de 2 réplicats x 3 semaines = moyenne de 6 valeurs ; pour les protéines moyenne de 3 échantillons x 2 dosages x 3 semaines = moyenne de 18 valeurs. Les comparaisons ont été réalisées grâce à une analyse de variance (ANOVA) suivie par un test t de Dunett. Les comparaisons entre fractions ont été réalisées grâce au test t de Student. # signifie que les valeurs sont significativement différentes du témoin non traité. ≠ signifie différentes d'une fraction de particule à une autre pour une même concentration.



L'exposition des CEpB aux particules urbaines provoque une forte induction du GM-CSF dès 5 µg/cm<sup>2</sup> en présence de PUF[0,25-0,03] ou de PF[1,65-0,25] de manière dépendante de la concentration de particules que ce soit au niveau des ARNm ou des protéines dans les milieux de culture (Figure 5-25). Il existe une assez bonne corrélation entre les taux d'induction de l'ARNm et ceux de la protéine (lorsqu'on trace Protéine=f(ARNm) avec les résultats de l'effet dose, on obtient les R<sup>2</sup> suivants : R<sup>2</sup>(UF)=0,76 ; R<sup>2</sup>(F)=0,78 ; R<sup>2</sup>(G)=0,70). La sécrétion de GM-CSF est plus fortement induite par les PF[1,65-0,25].

Avec les particules rurales que ce soit celles prélevées en 2008 ou 2009, on observe une tendance à un effet supérieur des PUF[0,17-0,03] par rapport au PF[1-0,17] et les PG[10-1] n'ont aucun effet significatif dans les CEpB que ce soit au niveau de l'expression de l'ARNm ou de la sécrétion de la protéine (Figure 5-25).

#### *IL-6 :*

L'IL-6 est une cytokine qui active plusieurs cellules du système immunitaire (lymphocytes B et T, cellules NK) et qui module l'activité des macrophages.

Comme pour le GM-CSF dans les CEpB, l'expression de l'IL-6 induite par le TPA est maximale après 4h d'exposition mais avec un effet inducteur moins important (x2,5) puis une faible diminution à 24h (Figure 5-24). Par contre avec les particules, l'induction des ARNm est plus tardive et modérée avec les PUF[0,25-0,03] et PF[1,65-0,25] (semaine 14) de la porte d'Auteuil utilisées pour réaliser cette cinétique.

Avec les particules urbaines, on observe une induction significative mais non dépendante de la concentration, de l'expression des ARNm (Figure 5-25) dans les CEpB. Au niveau de la protéine sécrétée, une augmentation de la sécrétion de cette cytokine est observée avec les PF[1,65-0,25] et les PG[10-1,65] aux concentrations les plus élevées (5 et 10µg/cm<sup>2</sup>).

Par contre avec les particules rurales, on observe une augmentation de la sécrétion d'IL-6 par les CEpB avec les 3 classes de taille (sauf PG Oysonville 2009) avec une tendance à un effet décroissant quand la taille augmente (Figure 5-25).

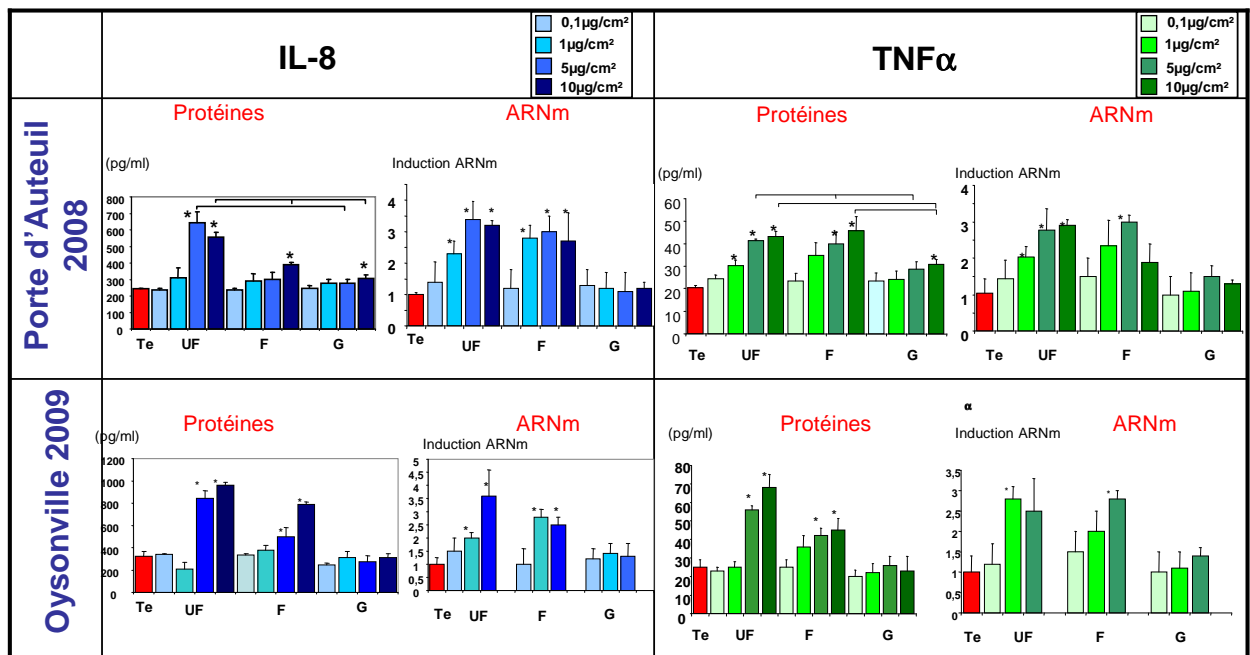
#### *TNFα :*

Le TNFα est une cytokine impliquée dans l'inflammation systémique qui est produite par une grande variété de cellules. Cette protéine est un chemoattractant des neutrophiles et stimule la phagocytose chez les macrophages. L'IL-6 et le TNFα qui sont connus pour avoir un rôle important dans l'initiation du processus inflammatoire ont été cités plusieurs fois dans la littérature pour être dérégulés suite à l'exposition aux nanoparticules (Wilson et coll., 2002, Sayes et coll., 2007).

L'étude de l'expression du TNFα dans les CEpB exposées aux différentes fractions granulométriques de particules issues des sites urbains et ruraux n'a pas fait ressortir d'induction significative quelles que soient les concentrations testées (Figure 5-25).

En ce qui concerne les cellules CEnP, avec les particules urbaines, on observe une induction significative de l'expression des ARNm en ce qui concerne les PUF[0,25-0,03] (dès 1µg/cm<sup>2</sup>) et les PF[1,65-0,25] (à 5µg/cm<sup>2</sup>) (Figure 5-26). Une augmentation significative est également observée avec les PUF[0,17-0,03] et les PF[1-0,17] prélevées à Oysonville (Figure 5-26) aux mêmes concentrations et une différence significative entre ces fractions.

L'augmentation d'expression du TNFα se concrétise par une augmentation de la sécrétion de la protéine. Cette augmentation est significative respectivement à partir 1µg/cm<sup>2</sup> et 5µg/cm<sup>2</sup> pour les cellules exposées aux PUF et aux PF prélevées à Auteuil et à Oysonville. (Figure 5-26).



**Figure 5-26 : Effets des particules de la porte d'Auteuil et de Oysonville 2009 sur l'expression de cytokines pro-inflammatoires dans des cellules endothéliales vasculaires pulmonaires humaines (CENP).** Les cellules ont été traitées pendant 24h avec des concentrations de particules allant de 0,1 à 10 µg/cm<sup>2</sup>. Les résultats des différentes semaines ont été regroupés afin d'avoir une moyenne d'expression par fraction granulométrique (pas de différence significative entre les semaines, résultats non montrés) Les résultats représentent la moyenne de 2 réplicats x 3 semaines (n = 6) ou 3 échantillons x 2 dosages x 3 semaines (n=18) \* Significativement différents des témoins (Analyse de variance ANOVA suivie d'un test t de Dunnett, p<0.05)

#### IL-8 :

Enfin, l'IL-8 est une cytokine, chef de file des chémokines qui est produite par les cellules épithéliales suite à la détection d'agents microbiologiques ou chimiques potentiellement pathogènes. Son rôle principal est d'assurer le recrutement des polynucléaires neutrophiles sur le site de l'infection par la création d'un gradient chimotactique qui guide les cellules phagocytaires comportant des récepteurs correspondants à leur surface. Les résultats sont présentés dans la figure 5-25 et la figure 5-26.

Comme pour le TNFα, l'étude de l'expression de l'IL-8 dans les CENP exposées pendant 24h aux différentes fractions granulométriques de particules issues des sites urbains et ruraux n'a globalement pas fait ressortir d'induction significative quelles que soient les concentrations testées (Figure 5-25) à l'exception des PUF prélevées à Oysonville en 2008 à 10 µg/cm<sup>2</sup>.

Dans les CENP, l'étude de l'expression de l'IL-8 dans les cellules exposées pendant 24h aux différentes fractions granulométriques de particules issues des sites urbains et ruraux a fait ressortir une induction significative pour les PUF et les PF dès 1 µg/cm<sup>2</sup>. (Figure 5-26)

Avec les particules urbaines et les particules rurales, on observe une augmentation de la sécrétion d'IL-8 par les CENP avec les PUF et les PF dès 5 µg/cm<sup>2</sup> (Figure 5-26) ;

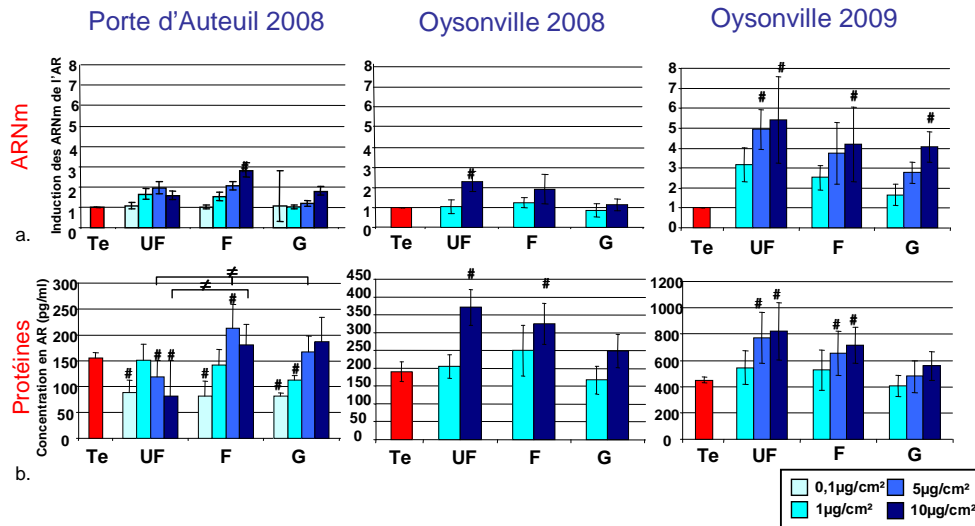
#### - Amphi-réguline

L'amphi-réguline est un facteur de croissance appartenant à la famille des ligands du récepteur à l'EGF. Il a été montré que son expression est induite dans les cellules épithéliales bronchiques par des PM2.5 et que la composante organique des particules joue un rôle important dans cette induction (Blanchet et coll., 2004, Rumelhard et coll., 2007a et b).

Comme précédemment observé avec le GM-CSF et l'IL-6, le TPA utilisé comme contrôle positif induit très rapidement l'expression de l'amphi-réguline dans les CENP qui retourne ensuite à son niveau d'expression constitutive à 24h. A l'inverse avec les particules à 10 µg/cm<sup>2</sup> l'expression est plus tardive et apparaît maximale à 24h avec une induction pour les PUF[0,25-0,03] et PF[1,65-0,25] et aucun effet des PG[10-1,65] (Figure 5-27c).

En ce qui concerne l'induction des ARNm de l'Amphiréguline en fonction de la concentration d'exposition des CEpB, on observe un net effet dose-dépendant avec des effets significatifs à la plus forte concentration (10µg/cm<sup>2</sup>) à Auteuil pour les PF[1,65-0,25] et pour toutes les classes de taille à Oysonville en 2009 (Figure 5-27a). On remarquera les facteurs d'induction particulièrement élevés à Oysonville en 2009 par rapport à ceux d'Auteuil. Néanmoins on remarquera également qu'à Oysonville ces inductions présentent une variabilité assez importante en grande partie imputable au prélèvement de la semaine (20-21) comme on l'a vu aussi pour le CYP 1A1 mais dans de moindres proportions. Ceci suggérerait alors que l'induction de l'amphiréguline soit liée à des composés métabolisables par le CYP1A1. Avec les particules de Oysonville 2008, les inductions sont moins remarquables et seulement significatives pour les PUF.

Les remarques faites sur l'expression des ARNm s'appliquent en général également aux protéines sécrétées. Néanmoins on notera pour les particules urbaines, en particulier pour les PUF[0,25-0,03], une teneur en amphiréguline dans les milieux de culture des cellules traitées inférieure à celle observée dans les témoins alors qu'au niveau des ARNm il n'y avait pas de différence (Figure 5-27b). Ceci peut être imputable soit à une adsorption de l'amphiréguline sur les particules perturbant le dosage ou à une action spécifique de ces particules d'Auteuil sur le processus de relargage de ce facteur dans le milieu de culture. L'amphiréguline est initialement présente à la membrane sous la forme d'un précurseur et doit être clivée par une métalloprotéase pour permettre sa libération dans le milieu de culture. Le phénomène d'adsorption nous a été suggéré par une étude précédente du laboratoire faite avec des nanoparticules de noir de carbone qui a montré que ces nanoparticules adsorbent certaines protéines dont des cytokines pro-inflammatoires tels le GM-CSF et le TNFα, ce qui les rend indisponibles lors du dosage protéique (Val et coll., 2009). Il est donc possible que ce processus se produise avec les particules plus fines dans notre étude



Cinétique PM Porte d'Auteuil 2008 prélèvement semaine 14. [PM]=10µg/cm<sup>2</sup>

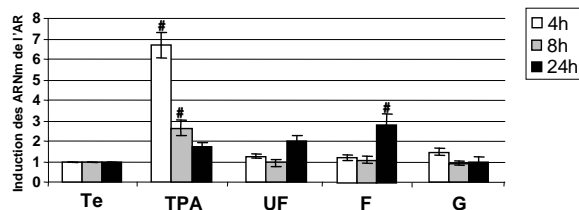


Figure 5-27 : Effet des différentes fractions granulométriques des particules sur l'expression du facteur de croissance, amphiréguline, par les cellules épithéliales bronchiques humaines.

Les cellules 16HBE ont été traitées pendant 24h avec 0,1 à 10 µg/cm<sup>2</sup> de particules. L'analyse de l'expression des ARNm a été faite par qPCR ; le dosage des protéines dans les milieux a été fait par ELISA. Les résultats des différentes semaines ont été moyennés pour chaque fraction granulométrique : pour les ARNm moyenne de 2 réplicats x 3 semaines = moyenne de 6 valeurs ; pour les protéines moyenne de 3 échantillons x 2 dosages x 3 semaines = moyenne de 18 valeurs. Pour la cinétique (c) n=2. Les comparaisons entre fractions ont été réalisées grâce au test t de Student. # signifie que les valeurs sont significativement différentes du témoin non traité, ≠ signifie que les valeurs sont significativement différentes entre elles.

a : expression de l'ARNm

b : sécrétion de l'amphiréguline dans le milieu de culture.

c : étude cinétique de l'expression de l'amphiréguline à 4, 8 et 24h réalisée avec les particules de la semaine 14 de la porte d'Auteuil à 10µg/cm<sup>2</sup>.

En résumé :

Parmi les cytokines étudiées dans les cellules épithéliales bronchiques humaines, c'est le GM-CSF qui est le plus fortement induit par les particules. Selon leur origine, on observe à masse équivalente un effet supérieur de la fraction fine urbaine par rapport à la fraction ultrafine et une tendance à un effet inverse pour les particules rurales.

Les particules rurales fines et ultrafines induisent significativement l'expression et la sécrétion de l'amphiréguline alors qu'avec les particules urbaines l'effet est beaucoup plus modeste et ne concerne que les particules fines.

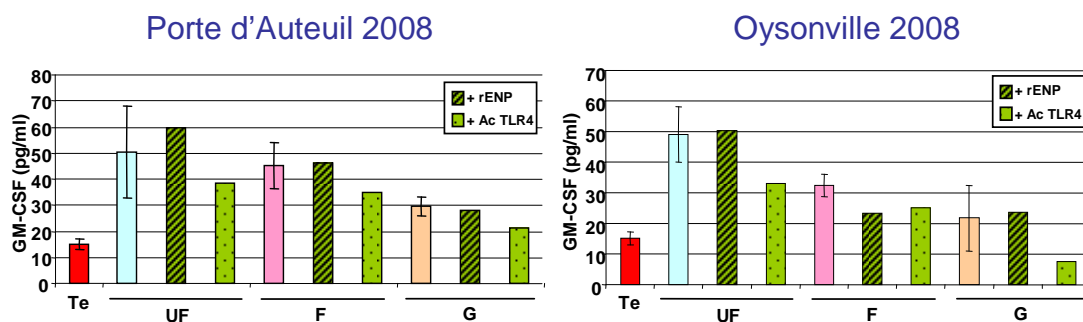
Alors que l'IL-8 et le TNF $\alpha$  ne sont pratiquement pas induits dans les cellules épithéliales bronchiques, l'expression et la sécrétion de ces cytokines sont nettement induites dans les cellules endothéliales vasculaires. Pour ces 2 médiateurs pro-inflammatoires, l'effet des particules ultrafines rurales semble supérieur à celui des particules fines. Avec les particules urbaines, il n'y a pas de différence nette entre ces deux classes de taille.

#### 5-6-5 : Rôle des endotoxines dans les effets pro-inflammatoires des particules

Les endotoxines sont des fragments de la paroi des bactéries Gram (-) qui ont un fort pouvoir inflammatoire. Afin d'évaluer leur contribution dans la réponse pro-inflammatoire induite par les particules nous avons utilisé deux approches : soit en traitant conjointement les cellules avec les particules et une protéine recombinante neutralisant les endotoxines (rENP) soit en utilisant un anticorps anti-TLR4 c'est-à-dire dirigé contre un récepteur membranaire TLR4 activé par une certaine catégorie d'endotoxines comme les lipopolysaccharides.

La sécrétion de GM-CSF induite dans les CEpB par les particules quelle que soit leur origine n'apparaît pas nettement modulée par l'adjonction de la protéine neutralisant les endotoxines hormis peut-être pour les PF[1-0,17] d'Oysonville (Figure 5-28). Avec l'anticorps anti-TLR4 on observe dans tous les cas une diminution de la sécrétion de GM-CSF induite par les particules avec un effet semble t'il plus marqué pour les PUF. Toutefois il faut rester prudent sur l'interprétation de ces expériences car elles n'ont été réalisées que sur un nombre très restreint de cultures par manque de particules disponibles. C'est d'ailleurs la raison pour laquelle nous n'avons pas pu faire un témoin négatif avec une immunoglobuline.

Cette même approche a été utilisée pour évaluer l'implication des endotoxines dans la sécrétion d'IL-6 et de l'amphiréguline. Il n'a été observé aucune diminution de leur sécrétion induite par les particules que ce soit en présence de rENP ou de l'anticorps anti-TLR4.



**Figure 5-28 : Rôle des endotoxines dans la sécrétion de GM-CSF induite par les particules de la Porte d'Auteuil et celles d'Oysonville 2008.** Les cellules 16HBE ont été traitées pendant 24h avec 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de particules en présence ou non d'une protéine recombinante neutralisant les endotoxines (rENP) ou d'un anticorps anti-TLR4. Le GM-CSF a été dosé dans les milieux de culture par ELISA. Pour Oysonville, les particules des semaines 20, 21 et 22 ont été rassemblées pour en avoir assez et la mesure a été faite sur 2 puits de culture pour les particules seules et sur un seul puits en présence de rENP. Pour Auteuil, sont présentés les résultats de la moyenne provenant des trois prélèvements de 2008 pour les UF (semaines 14,15,16) et de deux prélèvements pour les F et G (semaines 14 et 16).

### 5-6-6 : Discussion des résultats toxicologiques

L'étude des biomarqueurs d'exposition et d'effets de l'exposition a été réalisée jusqu'à **une concentration de 10µg/cm<sup>2</sup> qui s'est révélée non cytotoxique**. Nous n'avons pas jugé judicieux de dépasser cette concentration pour rester dans des limites de représentativité par rapport à des extrapolations que l'on peut faire entre les concentrations testées *in vitro* et des concentrations susceptibles d'être atteintes dans des environnements urbains et pour des personnes ayant des problèmes respiratoires (Li et coll., 2003 b). Les réponses des différents biomarqueurs à l'exposition aux particules traduiront ainsi les réponses d'adaptation/défense de la cellule au stress particulaire.

L'exposition des cellules bronchiques et des cellules endothéliales aux particules s'accompagne d'une **augmentation de l'expression de biomarqueurs d'exposition aux xénobiotiques** que sont les enzymes du métabolisme des xénobiotiques : **le CYP1A1 et NQO-1 par les PUF et PF**. Par contre la GSTP1 n'est que très rarement apparue comme étant significativement induite dans les 2 types cellulaires considérés.

Les **niveaux d'induction du CYP1A1 et de NQO-1 sont globalement les mêmes à concentrations équivalentes (5 ou 10 µg/cm<sup>2</sup>) selon que l'on considère les particules urbaines ou rurales** dans les 2 types cellulaires. Ceci est cependant à relativiser dans la mesure où pour obtenir la même masse de particules à Oysonville il a fallu prélever beaucoup plus longtemps car les concentrations en µg/m<sup>3</sup> sont beaucoup plus faibles (11,15 µg/m<sup>3</sup> de PM10 en moyenne à Oysonville contre 26,23 µg/m<sup>3</sup> à Auteuil). Donc même si à masse égale les particules urbaines et rurales ont le même effet inducteur sur les enzymes du métabolisme des xénobiotiques, cette masse ne sera pas atteinte sur la même durée pour des personnes vivant à Paris à proximité du trafic automobile et celles vivant à Oysonville.

**Le CYP 1A1 a été très nettement induit par les PF[1-0,17] et PUF[0,17-0,03] d'Oysonville alors que peu de HAP** ont été retrouvés et leurs concentrations sont très faibles. Or les HAP sont avec la dioxine, les inducteurs les mieux connus et les plus puissants du CYP1A1. Ceci suggère que d'autres HAP que ceux dosés puissent induire le CYP ou que parmi les pesticides utilisés sur les périodes concernées certains puissent être des inducteurs du CYP1A1. Par ailleurs il a été observé une forte variabilité entre les 3 échantillons en ce qui concerne l'induction du CYP1A1 qui est très faible avec le prélèvement des semaines 20-21. Ceux qui sont absents du prélèvement des semaines 20-21 par rapport aux semaines précédentes sont l'acétochlor et le cyprodinil. Il a déjà été montré que l'acétochlor induisait l'activité EROD dans une lignée hépatocytaire (Dierickx et coll., 1999).

Parmi les deux biomarqueurs de la défense anti-oxydante sélectionnés (HO-1 et SOD2), seul l'HO-1 a répondu à l'exposition aux particules dans les deux types cellulaires. **La SOD2 n'apparaît donc pas comme un biomarqueur adapté au suivi de l'induction d'un stress oxydant** dans les cellules épithéliales bronchiques ainsi que dans les cellules endothéliales où même si une induction a pu être mise en évidence dans certains cas, elle n'est pas dépendante de la concentration. Par contre **avec HO-1 il a été observé des inductions significatives dans les cellules endothéliales avec un effet supérieur des particules ultrafines urbaines ou rurales par rapport aux particules fines de ces mêmes sites**. Cette induction de HO-1 est à mettre en relation avec l'augmentation de la production intracellulaire d'EAO induite par ces 2 classes de taille. Par contre dans les **cellules épithéliales bronchiques**, on observe des **profils d'induction hétérogènes** selon l'origine des particules et la classe de taille. L'étude cinétique réalisée dans ces cellules épithéliales uniquement avec un prélèvement d'Auteuil a révélé que le maximum d'induction de HO-1 était 8h quelle que soit la classe de taille. Ceci explique peut-être que les mesures que nous avons faites à 24h pour les différents sites et différentes fractions ne dégagent pas de réponses très claires. Néanmoins il a été observé pour les PUF d'Oysonville une constance d'effet sur HO-1 entre les 2 années. L'induction précoce de HO-1 par rapport aux autres gènes étudiés renforce les hypothèses actuelles sur le rôle du stress oxydant dans les effets pro-inflammatoires des particules.

Parmi les **cytokines** étudiées dans les cellules épithéliales bronchiques humaines, **c'est le GM-CSF qui est le plus fortement induit** par les particules les plus fines avec une induction qui est fonction du temps d'exposition et de la concentration et des niveaux d'induction proches (en ARNm et protéines) quels que soient les sites considérés. Avec **l'IL-6 on retrouve globalement les mêmes profils d'induction** que ceux observés pour le GM-CSF mais avec des facteurs d'induction plus faibles alors que **le TNFα et l'IL-8 ne sont pratiquement pas induits**. Une nouvelle fois, le GM-CSF apparaît comme une cytokine biomarqueur de la réponse pro-inflammatoire relativement sensible et discriminant dans les cellules épithéliales bronchiques humaines (Boland et coll. 2001, Ramgolam et coll., 2009). La contribution des endotoxines dans les effets pro-inflammatoires est difficile à apprécier dans la mesure où les expériences n'ont pu être réalisées que sur un nombre limité de cultures et sans pouvoir réaliser tous les contrôles nécessaires. Rappelons que dans une précédente étude nous avons mis en évidence

en utilisant la protéine neutralisant les endotoxines, que la sécrétion de GM-CSF induite par des PUF parisiennes de fond n'était pas dépendante des endotoxines mais que par contre ces endotoxines contribuaient partiellement à la sécrétion de GM-CSF induite par les autres classes de taille (Ramgolam et coll., 2009). Néanmoins il est apparu que la sécrétion de GM-CSF induite par les PUF et PF est atténuée en présence de l'anticorps anti-TLR4 alors que celle de l'IL-6 et de l'amphiréguline ne l'est pas. Ceci suggère que l'induction du GM-CSF puisse être en partie liée à des molécules biologiques activant le récepteur TLR4.

**L'amphiréguline** apparaît comme **le seul biomarqueur** présentant dans les cellules épithéliales bronchiques humaines **un niveau d'expression différent entre les particules urbaines et rurales**, ces dernières ayant un effet inducteur plus marqué. Les travaux antérieurs du RMCX ont montré que la composante organique des PM<sub>2.5</sub> joue un rôle important dans l'induction de l'expression et de la sécrétion de l'amphiréguline (Rumelhard et coll., 2007a) et que par ailleurs ce facteur de croissance a une action autocrine sur les cellules épithéliales et pourrait ainsi contribuer à la persistance de la réponse pro-inflammatoire. Il est prévu dans les travaux de thèse de S. Val qui incluent le présent projet d'étudier le promoteur du gène de l'amphiréguline par des approches gènes rapporteur afin d'identifier les éléments de réponse les plus importants et donc les facteurs de transcription impliqués dans l'induction de ce gène afin de remonter aux voies de signalisation impliquées.

Parmi les **cytokines** étudiées dans les cellules endothéliales vasculaires pulmonaires humaines, on retrouve globalement les mêmes profils d'induction entre les IL-8 et le TNF $\alpha$  avec une induction qui est fonction de la concentration et des niveaux d'induction proches (en ARNm) quels que soient les sites considérés. Nous pouvons cependant noter qu'avec les particules prélevées à Oysonville, la sécrétion protéique de ces deux cytokines semble plus élevée par rapport aux particules prélevées à Auteuil. L'IL-8 et le TNF  $\alpha$  apparaissent donc comme des cytokines biomarqueurs de la réponse pro-inflammatoire relativement sensibles et discriminants dans les cellules endothéliales vasculaires endothéliales humaines ce qui a déjà été décrit dans la littérature (Peters et coll. 2007, Gojova et coll., 2007).

Les deux types cellulaires cibles potentielles des particules dans le poumon répondent donc à l'exposition aux particules par :

- une induction des enzymes du métabolisme des xénobiotiques et en particulier du CYP1A1 avec un effet inducteur plus marqué pour les cellules épithéliales bronchiques.
- un stress oxydant plus clairement mis en évidence dans les cellules endothéliales.
- une réponse pro-inflammatoire caractérisée par la sécrétion de cytokines différentes selon le type cellulaire mais lié à leur spécificité respective.

Les différences de niveaux d'induction entre les 2 types cellulaires peuvent s'expliquer par des équipements enzymatiques de métabolisation et anti-oxydants légèrement différents notamment dans la mesure où l'on compare ici une lignée cellulaire (cellules épithéliales) et des cultures primaires (cellules endothéliales).

## 6- Conclusions

Ce projet avait pour but d'évaluer la toxicité relative des principales fractions granulométriques de particules issues de différentes atmosphères (urbaines et rurales) en relation avec la nature physico-chimique de ces particules.

Les résultats acquis synthétisés dans le tableau ci-contre et mis en perspective avec ceux obtenus dans un projet précédent sur les particules urbaines de fond (Primequal-PUFFIN1) prélevées en hiver montrent que le profil granulométrique est très différent en zone rurale par rapport à une zone de proximité de trafic et qu'il s'apparente à celui observé sur un site urbain de fond. Le profil granulométrique des particules urbaines présente trois modes bien distincts : le mode ultrafin centré sur 0,1  $\mu\text{m}$ , le mode fin ou accumulation centré sur 0,4  $\mu\text{m}$  et enfin le mode grossier centré sur 2,5  $\mu\text{m}$  alors que les particules rurales se distinguent par un mode ultrafin très peu marqué. Les PUF[0,25-0,03] en proximité du trafic représentent près de 30% de la masse totale des PM10 alors qu'en site rural PUF[0,17-0,03] ce pourcentage n'est plus que d'environ 7% pour une masse totale/m<sup>3</sup> de PM10 également inférieure.

	Particules urbaines (trafic)			Particules rurales			Particules urbaines (fond)		
	PUF	PF	PG	PUF	PF	PG	PUF	PF	PG
Masse ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	8,8	6,7	7,8	0,8	7,4	4	2,1	11,5	6,7
ions	2,6	2,4	1,2	0,2	6,6	2,6	0,6	5,7	3,1
Carbone (BC+ POM)	3,8	2,2	1,1	0,3	2,8	1,6	1,5	5,8	1,6
HAP ng/m <sup>3</sup>	1,01	3,27	??????	0,245	0,284	0,165			
Pesticides ng/m <sup>3</sup>				0,157	2,205	0,36			

Les particules ultrafines présentent une typologie différente selon leur lieu de prélèvement : Ce sont dans les deux cas des agrégats de suies carbonées mais qui se développent de manière fractale en bordure de périphérique; alors qu'ils se présentent plus ramassés sur le site rural.

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont principalement détectés sur les PUF[0,25-0,03] et PF[1,65-0,25] des particules urbaines. Ils sont moins diversifiés et en quantité très faible sur les particules rurales.

A l'inverse, il n'a pas été détecté de pesticides sur les particules urbaines alors que certaines molécules herbicides et fongicides ont été quantifiées sur les particules rurales principalement sur les PF[1-0,17] (72% de la charge totale). Leur concentration sur les particules ne représente que 14% de celle qui est mesurée en phases gazeuse et particulaire confondues. Cependant le comportement des pesticides vis à vis des particules est variable selon les molécules considérées. Ainsi pour certaines d'entre elles, elles sont présentes de 41 à 60% sur la phase particulaire. C'est, à notre connaissance, la première étude à s'être intéressée à la répartition granulométrique des pesticides. Les concentrations que nous avons observées sont dans les mêmes gammes que celles rapportées dans la littérature (Yusà et coll., 2009). Nous avons aussi observé comme cela a déjà été rapporté dans la littérature (Sofuoglu et coll., 2004) une distribution préférentielle des pesticides dans la phase gazeuse par rapport à la phase particulaire.

Pour des raisons différentes, le site urbain et le site rural présentent un aérosol très particulier. En effet le site rural se distingue par sa richesse exceptionnelle en nitrate et par ses particules organiques au comportement de solubilité très différent d'une fraction à l'autre. Le site urbain de proximité du trafic se distingue par l'importance de sa fraction ultrafine qui est majoritairement insoluble et les espèces carbonées y sont majoritaires. Cet aérosol urbain a peu de matière organique secondaire et les nitrate et sulfate y sont relativement peu abondants. La différence de concentration totale entre le site rural et le site urbain est moins importante qu'attendue montrant l'importance de l'aérosol secondaire (organique et inorganique) sur le site récepteur rural qui voit aussi sans doute des apports supplémentaires dûs aux activités locales.

Dans les 2 situations étudiées (urbaines de proximité du trafic et rurales), la réactivité biologique des différentes fractions granulométriques est associée aux fractions fines et ultrafines corroborant les recherches précédentes réalisées sur un aérosol urbain de fond (rapport Primequal-Predit, Ramgolam et coll., 2009).

En effet dans les deux types cellulaires (cellules épithéliales bronchiques humaines et cellules endothéliales vasculaires pulmonaires), seules les particules fines PM [ $\leq 1,65$ - $\leq 0,25$ ] et ultrafines PM [ $\leq 0,25$ ] quelles soient urbaines ou rurales induisent à des concentrations non cytotoxiques:

- des enzymes du métabolisme des xénobiotiques et en particulier du CYP1A1 avec un effet inducteur plus marqué pour les cellules épithéliales bronchiques.
- un stress oxydant plus clairement mis en évidence dans les cellules endothéliales.
- une réponse pro-inflammatoire caractérisée par la sécrétion de cytokines différentes selon le type cellulaire mais lié à leur spécificité respective.

Donc quelque soient les sites, la réponse biologique est clairement attribuable aux particules de taille inférieure à 1,65 $\mu\text{m}$ .

L'ensemble des résultats obtenus est synthétisé dans les figures représentations ci-dessous (figure 6-1)

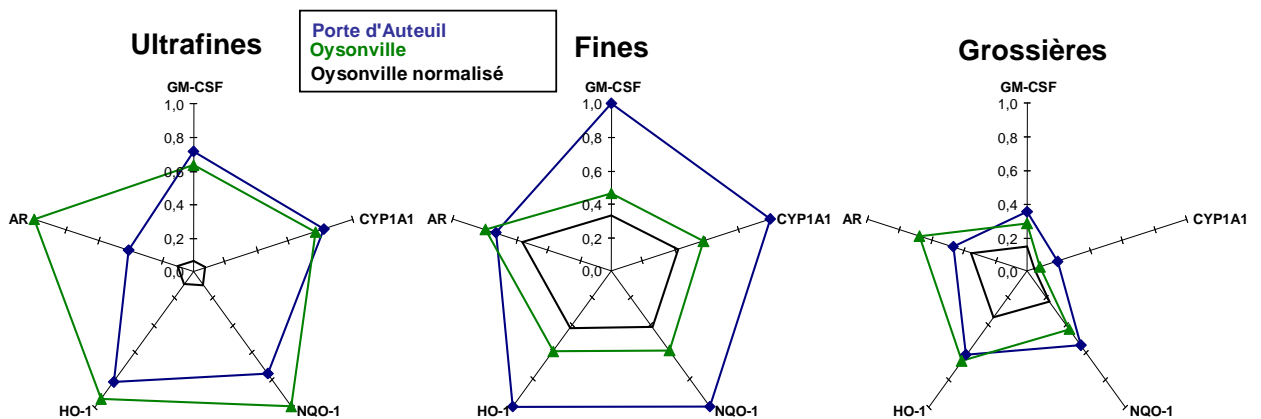
- à partir des données obtenues à la concentration de 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,
- ne sont considéré que les biomarqueurs qui ont été induits (au niveau des ARNm)
- il a été procédé à une normalisation de chaque biomarqueur par rapport à la fraction ou le site où il était le plus induit
- les écart-types ne sont pas figurés

Il en ressort que dans les cellules épithéliales bronchiques humaines exposées jusqu'à 24h :

- en zone urbaine de trafic, ce sont généralement pour les PF[1,65-0,25] que l'on obtient l'effet inducteur le plus important pour la plupart des biomarqueurs à l'exception de l'amphiréguline. Les PG[10-1,65] ont rarement un effet significatif.

- en zone rurale impactée par les pesticides, ce sont fréquemment les PUF[0,17-0,03] qui ont les effets les plus importants mais la différence n'est significative entre les PUF[0,17-0,03] et les PF[1-0,17] que pour NQO-1 et HO-1.

- les PUF[0,17-0,03] rurales apparaissent à masse équivalente aussi réactives voire pour certains biomarqueurs (amphiréguline, HO-1 et NQO-1) plus réactives que les PUF[0,25-0,03] urbaines. Cependant ce résultat est à relativiser car les quantités d'ultrafines sont très faibles en milieu rural et si on normalise les résultats obtenus en site rural par un facteur tenant compte du ratio de particules entre les deux sites (ligne noire dans la figure 6-1), l'effet des PUF rurales est très faible. Nous pouvons donc dire que même si les inductions des biomarqueurs par les particules ultrafines sont similaires d'un site de prélèvement à l'autre, un individu devra être exposé plus longtemps en milieu rural pour être exposé à une quantité équivalente de particules par rapport au site urbain.



**Figure 6-1 : Bilan des effets des particules urbaines de proximité du trafic (ligne bleue) et des particules rurales (ligne verte) sur les cellules épithéliales bronchiques humaines traitées à 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ .** Ces graphiques ont été réalisés en fixant à 1 pour chaque biomarqueur la plus forte induction des ARNm (quelque soit la fraction ou le site) puis en normalisant par rapport à cette valeur pour les autres conditions. La ligne noire correspond aux résultats obtenus en site rural affecté d'un facteur correctif [quantité de particules en site rural ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )/ quantité de particules en site rural ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )] afin de tenir compte de la proportion relative de chaque fraction entre les 2 sites.

En conclusion cette étude a permis de mieux documenter les caractéristiques physico-chimiques d'un aérosol rural par rapport à un aérosol urbain de proximité par classes granulométriques en se focalisant notamment sur la composante pesticides. Il a permis de comparer la réponse de deux types cellulaires



de l'appareil respiratoire cibles des particules grâce à l'étude d'une série de biomarqueurs spécifiques des différents événements moléculaires et cellulaires induits par l'exposition des cellules aux particules. Il est apparu comme cela avait déjà été observé pour un aérosol urbain de fond que seules les fractions fines et ultrafines de ces deux aérosols induisent dans les deux types cellulaires des biomarqueurs révélateurs de la mise en place des systèmes de métabolisation et de défense anti-oxydante ainsi que d'une réponse pro-inflammatoire. Par contre la fraction grossière a très peu d'effets sur les biomarqueurs étudiés.

## **8- Bibliographie**

Baeza A., Marano F. Pollution atmosphérique et maladies respiratoires: un rôle central pour le stress oxydant. *Med Sci*, 2007 :497-501

Baulig A, Poirault JJ, Ausset P, Schins R, Shi T, Baralle D, Dorlhene P, Meyer M, Lefevre R, Baeza-Squiban A, Marano F. Physicochemical characteristics and biological activities of seasonal atmospheric particulate matter sampling in two locations of Paris. *Environ Sci Technol*. 2004, 38:5985-92.

Baulig A, Blanchet S, Rumelhard M, Lacroix G, Marano F, Baeza-Squiban A. Fine urban atmospheric particulate matter modulates inflammatory gene and protein expression in human bronchial epithelial cells. *Front Biosci*. 2007,12:771-82.

Blanchet S, Ramgolam K, Baulig A, Marano F, Baeza-Squiban A. Fine particulate matter induces amphiregulin secretion by bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004 Apr;30(4):421-7.

Boland S, Baeza-Squiban A, Bonvallot V, Houcine O, Pain C, Meyer M, Marano F. Similar cellular effects induced by diesel exhaust particles from a representative diesel vehicle recovered from filters and Standard Reference Material 1650. *Toxicol In Vitro*. 2001, 15:379-85.

Becker S, Fenton MJ, Soukup JM. Involvement of microbial components and toll-like receptors 2 and 4 in cytokine responses to air pollution particles. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002, 27:611-8.

Behndig AF, Mudway IS, Brown JL, Stenfors N, Helleday R, Duggan ST, Wilson SJ, Boman C, Cassee FR, Frew AJ, Kelly FJ, Sandstrom T, Blomberg A. Airway antioxidant and inflammatory responses to diesel exhaust exposure in healthy humans. *Eur Respir J*. 2006, 27:359-65.

Cachier H., Brémond M.P. and Buat-Ménard P., Determination of atmospheric soot carbon with a simple thermal method. *Tellus*, 1989, 41B, 379-390.

Cachier H., F. Aulagnier, R.Sarda, F. Gautier,P. Masclet, JL Besombes, N. Marchand, S. Despiou, D. Croci, M. Mallet, P. Laj, A. Marinoni, PA Deveau, JC Roger, JP Putaud, R. VanDingenen, A. Dell'Acqua, J. Viidanola, S. Martins-Dos Santos, C. Liousse, F. Cousin, R. Rosset, E. Gardrat, C. Galy-Lacaux. Aerosol studies during the ESCOMPTE Experiment : an Overview. *Atmospheric Research*, 2005, 74, 547-563.

Courtois A, Andujar P, Ladeiro Y, Baudrimont I, Delannoy E, Leblais V, Begueret H, Galland MA, Brochard P, Marano F, Marthan R, Muller B. Impairment of NO-dependent relaxation in intralobar pulmonary arteries: comparison of urban particulate matter and manufactured nanoparticles. *Environ Health Perspect*. 2008, 116(10):1294-9.

Dick CA, Brown DM, Donaldson K, Stone V. The role of free radicals in the toxic and inflammatory effects of four different ultrafine particle types. *Inhal Toxicol*. 2003, 15:39-52.

Dierickx PJ. Glutathione-dependent cytotoxicity of the chloroacetanilide herbicides alachlor, metolachlor, and propachlor in rat and human hepatoma-derived cultured cells. *Cell Biol Toxicol*. 1999;15(5):325-32.

Dockery DW. Epidemiologic evidence of cardiovascular effects of particulate air pollution, *Environ. Health Perspect*. 2001; 109 (suppl 4); 483 – 486

Donaldson K, Brown DM, Mitchell C, Dineva M, Beswick PH, Gilmour P, et al. Free radical activity of PM<sub>10</sub> : iron-mediated generation of hydroxyl radicals. *Environ. Health Perspect*. 1997; 105: 1285-1289.

Gewaltig MT, Kodja G. Vasodprotection by nitric oxide : mechanisms and therapeutic potential. *Cardiovasc Res*. 2002 ; 55 (2) 250 - 260

Ghio AJ, Silbajoris R, Carson JL, Samet JM. Biologic effects of oil fly ash. *Environ Health Perspect*. 2002, 110 Suppl 1:89-94.

Gojova A, Guo B, Kota RS, Rutledge JC, Kennedy IM, Barakat AI. Induction of inflammation in vascular endothelial cells by metal oxide nanoparticles: effect of particle composition. *Environ Health Perspect*. 2007 Mar;115(3):403-9.

Gold DR, Litonjua A, Schwartz J, Lovett E, Larson A, Nearing B, Allen G, Verrier M, Cherry R, Verrier R. Ambient pollution and heart rate variability. *Circulation* 2000 ; 101 (11) 1267 - 1273

Guinot, B., H. Cachier, J. Sciare, T. Yu, X. Wang, J.H. Yu, Beijing aerosols: atmospheric interactions and new trends, *Journal of Geophysical Research*, 2007a, 112, accepted.

Guinot, B., H. Cachier, K. Oikonomou, Geochemical perspectives from a new aerosol chemical mass closure. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 2007b, 7, 1657-1670

Ibald-Mulli A, Wichmann HE, Kreyling W, Peters A. Epidemiological evidence on health effects of ultrafine particles. *J Aerosol Med*. 2002, 15:189-201.

Karoly ED, Li Z., Dailey LA, Hyseni X, Huang YCT Up-regulation of Tissue Factor in Human Pulmonary Artery Endothelial Cells after Ultrafine Particle Exposure ; *Environ Health Perspect*. 2007; 115(4): 535-540.

Knol AB, de Hartog JJ, Boogaard H, Slottje P, van der Sluijs JP, Lebret E, Cassee FR, Wardekker JA, Ayres JG, Borm PJ, Brunekreef B, Donaldson K, Forastiere F, Holgate ST, Kreyling WG, Nemery B, Pekkanen J, Stone V, Wichmann HE, Hoek G. Expert elicitation on ultrafine particles: likelihood of health effects and causal pathways. *Part Fibre Toxicol*. 2009, 24:6:19.

- Li N, Sioutas C, Cho A, Schmitz D, Misra C, Sempf J, Wang M, Oberley T, Froines J, Nel A. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ Health Perspect.* 2003a, 111:455-60.
- Li N, Hao M, Phalen RF, Hinds WC, Nel AE. Particulate air pollutants and asthma. A paradigm for the role of oxidative stress in PM-induced adverse health effects. *Clin Immunol.* 2003b Dec;109:250-65.
- Lioussé C., Michel C., Bessagnet B., Cachier H. and Rosset R., 0D-Modelling of Carbonaceous Aerosols over Greater Paris focusing on the organic particle formation. *Journal of Atmospheric Chemistry*, 2005, 51, 207-221.
- MacNee W, Donaldson K. Mechanisms of lung injury caused by PM10 and ultrafine particles with special reference to COPD. *Eur. Respir. J.* 2003, 21: 47-51
- Nemmar A, Hoet PH, Vanquickenborne B, Dinsdale D, Thomeer M, Hoylaerts MF, Vanbilloen H, Mortelmans L, Nemery B. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation.* 2002, 105(4):411-4.
- Ntziachristos L, Froines JR, Cho AK, Sioutas C. Relationship between redox activity and chemical speciation of size-fractionated particulate matter. *Part Fibre Toxicol.* 2007, 7;4:5.
- Oberdorster G, Ferin J, Lehnert BE. Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. *Environ Health Perspect.* 1994,102 :173-9.
- Osornio-Vargas AR, Bonner JC, Alfaro-Moreno E, Martinez L, Garcia-Cuellar C, Ponce-de-Leon Rosales S, Miranda J, Rosas I. Proinflammatory and cytotoxic effects of Mexico City air pollution particulate matter in vitro are dependent on particle size and composition. *Environ Health Perspect.* 2003, 111:1289-93.
- Ostro B, Broadwin R, Green S, Feng WY, Lipsett M. Fine particulate air pollution and mortality in nine California counties: results from CALFINE. *Environ Health Perspect.* 2006, 114:29-33.
- Peters K, Unger RE, Gatti AM, Sabbioni E, Tsaryk R, Kirkpatrick CJ. Metallic nanoparticles exhibit paradoxical effects on oxidative stress and pro-inflammatory response in endothelial cells in vitro. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2007
- Pope CA III, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K, Thurston GD. Lung cancer, cardiopulmonary mortality and long term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA* 2002 ; 287 (9) ; 1132 - 1141
- Pope CA III, Burnett RT, Thurston GD, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Godleski JJ. Cardiovascular mortality and long term exposure to particulate air pollution : Epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease. *Circulation* 2004 ; 109 (1) 71 - 77
- Ramgolam K, Chevaillier S, Marano F, Baeza-Squiban A, Martinon L. Proinflammatory effect of fine and ultrafine particulate matter using size-resolved urban aerosols from Paris. *Chemosphere.* 2008 72(9):1340-6
- Ramgolam K, Favez O, Cachier H, Gaudichet A, Marano F, Martinon L, Baeza-Squiban A. Size-partitioning of an urban aerosol to identify particle determinants involved in the proinflammatory response induced in airway epithelial cells. *Part Fibre Toxicol.* 2009 23;6:10
- Ramgolam K. Effet des particules atmosphériques fines (PM<sub>2,5</sub>, PM<sub>1</sub>) et ultrafines (PM<sub>0,1</sub>) provenant de la région parisienne sur l'épithélium respiratoire humain in vitro. *Thèse de doctorat de l'Université Paris Diderot, Paris 7*, 22 juin 2007.
- Reibman J, Hsu Y, Chen LC, Kumar A, Su WC, Choy W, Talbot A, Gordon T. Size fractions of ambient particulate matter induce granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human bronchial epithelial cells by mitogen-activated protein kinase pathways. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002, 27:455-62.
- Rumelhard M, Ramgolam K, Auger F, Dazy AC, Blanchet S, Marano F, Baeza-Squiban A. Effects of PM2.5 components in the release of amphiregulin by human airway epithelial cells. *Toxicol Lett.* 2007a Jan 30;168(2):155-64.
- Rumelhard M, Ramgolam K, Hamel R, Marano F, Baeza-Squiban A. Expression and role of EGFR ligands induced in airway cells by PM2.5 and its components. *Eur Respir J.* 2007b Dec;30(6):1064-73
- Saxon A., Diaz-Sanchez D. Air pollution and allergy : you are what you breathe. *Nature immunol.* 2005, 6: 223-226.
- Schins RP, Lightbody JH, Borm PJ, Shi T, Donaldson K, Stone V. Inflammatory effects of coarse and fine particulate matter in relation to chemical and biological constituents. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004, 195:1-11.
- Seinfeld J.H. and Pandis S.N., Atmospheric Chemistry and Physics, John Wiley & Sons, New-York, 1998.
- Sioutas C., Delfino RJ., Singh M. Exposure assessment for atmospheric ultrafine particles (UFPs) and implications in epidemiological research. *Environ Health Perspect.* 2005, 113:947-955.
- Squadrito GL, Cueto R, Dellinger B, Pryor WA. Quinoid redox cycling as a mechanism for sustained free radical generation by inhaled airborne particulate matter. *Free Radic Biol Med.* 2001, 31:1132-8.
- A. Sofuoglu, E. Cetin, S.S. Bozacioglu, G.D. Sener, M. Odabasi, *Atmos. Environ.* 38 (2004) 4483.
- Val S, Hussain S, Boland S, Hamel R, Baeza-Squiban A, Marano F. Carbon black and titanium dioxide nanoparticles induce pro-inflammatory responses in bronchial epithelial cells: need for multiparametric evaluation due to adsorption artifacts. *Inhal Toxicol.* 2009 Suppl 1:115-22.

Wilson MR, Lightbody JH, Donaldson K, Sales J, Stone V. Interactions between ultrafine particles and transition metals in vivo and in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2002; 184: 172-179.

Yusà V, Coscollà C, Mellouki W, Pastor A, de la Guardia M. Sampling and analysis of pesticides in ambient air. *J Chromatogr A.* 2009;1216(15):2972-83.

Zeka A., Sullivan JR., Vokonas PS., Sparrow D., Schwartz J. Inflammatory markers and particulate air pollution: characterizing the pathway to disease. *Int J Epidemiol* 2006, 35:1347-1354.

### **Rapports**

**Airparif** : Évaluation des concentrations en pesticides dans l'air francilien : campagne exploratoire, juin 2007

**Lig'Air**, Air Pays de la Loire, Atmo Auvergne, Airbreizh, Atmo Champagne Ardenne, Atmo Poitou Charentes, Oramip «Article : contamination de l'air par les pesticides : nouvelle composante de la pollution de l'air, bilan des mesures réalisées par les aasqa », mai 2006

**Lig'Air, CNRS d'Orléans (ICARE), Micropolluant Technologies SA**, « Pesticides dans l'Atmosphère : études des Cinétiques et mécanismes de dégradation en laboratoire et mesures dans l'aTmosphère : PACT » convention CV 03000113 – APR 2002. Rapport final, janvier 2007

**Lig'Air**, « Contamination de l'air par les produits phytosanitaires en région Centre, année 2006 », mai 2007

PIRRP : Plan interministériel de réduction des risques liés aux pesticides 2006 – 2009, <http://www.ecologie.gouv.fr/Plan-interministeriel-de-reduction.html>

Rapport final Primequal 2-predit n° 0462C0056 : PUF FIN : « Caractérisation physico-chimique et effets biologiques des fractions fines (PM2.5 et PM1) et ultra-fines (PM0.1) de l'aérosol urbain de fond. » Coordinateurs : A. Baeza et L. Martinon. Juillet 2007.

PRIMEQUAL 2-Predit - n°0462C0056 /PUFFIN, 2007, H. Cachier et al., Rapport de fin de projet  
PRIMEQUAL-ESCOMPTE/Aérosols, n°CV 04 000009, 2007, H. Cachier et al. Rapport de fin de projet

Rapport INVS « Exposition aérienne aux pesticides des populations à proximité de zones agricoles : Bilan et perspectives du programme régional intercirc » juin 2006. [www.invs.sante.fr](http://www.invs.sante.fr)

## **9- Valorisation scientifique**

### **Communication orales**

Effets d'aérosols urbains et ruraux sur des cellules épithéliales respiratoires : implication de la taille et de la composition chimique de l'aérosol.

**S. Val**, L. Martinon, H. Cachier, A. Yahyahoui, H. Marfaing, A. Baeza-Squiban  
Sélectionné pour présentation orale au Congrès Français sur les Aérosols (CFA) 2010.

Effects of ambient PM and nanoparticles on the respiratory tract

**Armelle BAEZA-SQUIBAN**, Sonja BOLAND, Francelyne MARANO

Invitation au congrès: ANALYTICA CONFERENCE, PM exposure: pathophysiology, biomarkers and therapy concepts, Munich March 23, 2010

### **Communications par affiche**

Journée colloque du Domaine d'Intérêt Majeur (DIM) Santé Environnement Toxicologie (SenT) de la région Ile-de-France le 26 Novembre 2009 à Versailles, France.

Effets d'aérosols urbains et ruraux sur des cellules épithéliales respiratoires : implication de la taille et de la composition chimique de l'aérosol.

**S. Val**, L. Martinon, H. Cachier, A. Yahyahoui, H. Marfaing, A. Baeza-Squiban

## ANNEXE I

### Conditions météorologiques à Oysonville durant les campagnes de prélèvement

Au cours des prélèvements de l'année 2008 (du 25 avril au 16 mai 2008), les conditions météorologiques ont été assez perturbées (vent modérés à forts et précipitations faibles mais régulières) lors du premier prélèvement. Puis le temps a été plus ensoleillé et plus chaud (température moyenne de 16 °C) occasionnant en fin de prélèvement (le 14 mai 2008) des averses orageuses (figure 1).

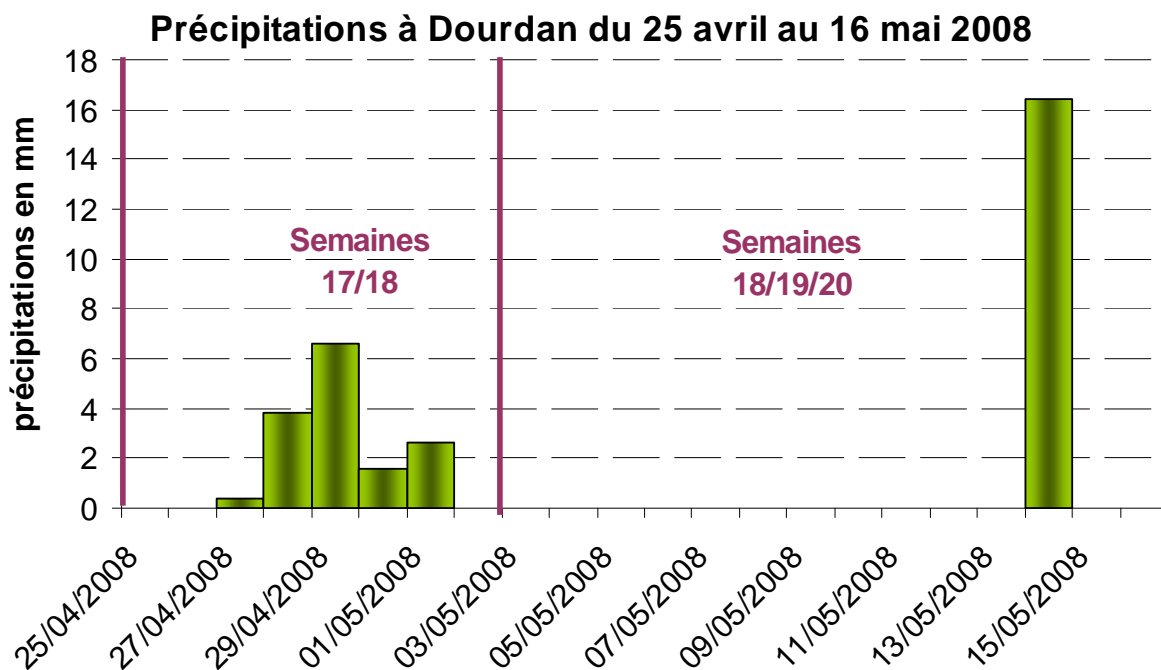


Figure 1 : précipitations à Dourdan du 25 avril au 16 mai 2008 (Source : Météo France)

Pour les dix semaines d'études réalisées en 2009, les températures ont fluctué du 30 mars au 8 juin 2009 entre -2,2 °C à 29 °C. Au cours des trois premières périodes, la température moyenne était de 11 °C. Les deux dernières ont bénéficié d'un temps plus chaud avec des moyennes à 15 °C (figure 2).

La campagne de mesure 2009 a débuté avec des conditions anticycloniques (température froides et stabilité de l'atmosphère, vents de secteur Nord Nord-Est, peu de précipitations). Ce type de temps est favorable à l'accumulation de pollution primaire telle que les particules en suspension. Puis l'arrivée de masses d'air de secteur ouest à sud-ouest a adouci l'atmosphère et occasionné de nombreuses précipitations. Au cours du dernier prélèvement, les conditions étaient estivales (températures chaudes, temps sec...).

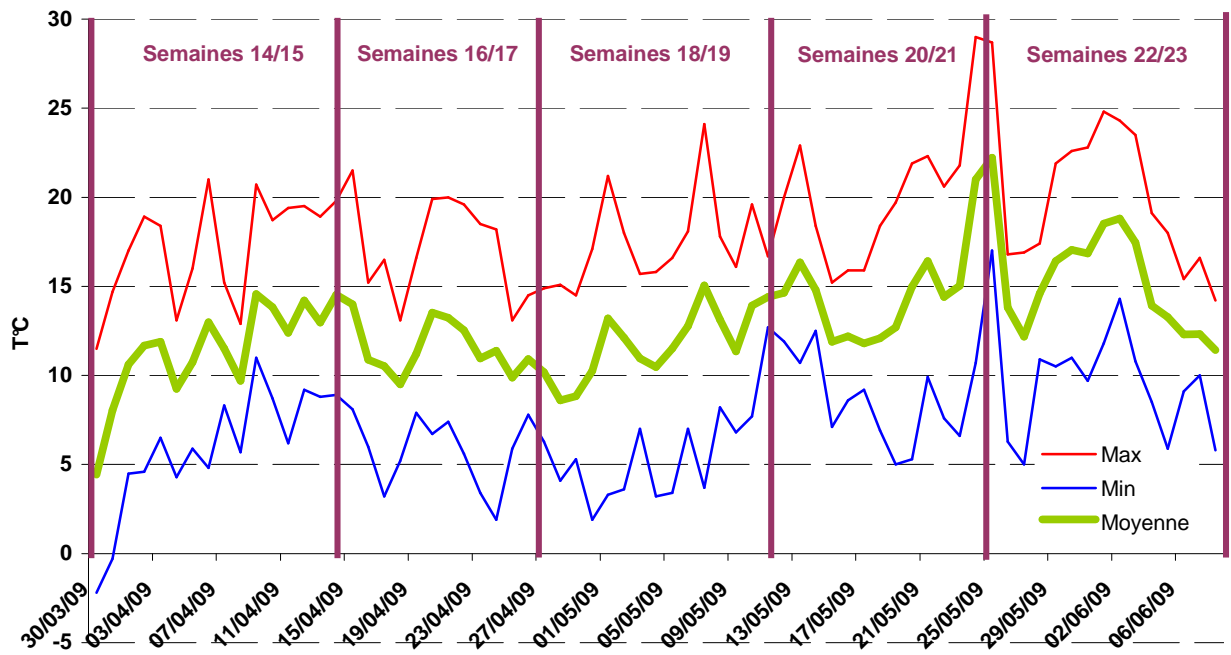


Figure 2 : températures à Dourdan du 30 mars au 8 juin 2009 (Source : Météo France)