Université du Littoral Côte d'Opale

UCEIV UR 4492, Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant

Ecole Doctorale EDSTS 585 Sciences, technologie, santé

Thèse

en vue de l'obtention du grade de

Docteur

Discipline : **Chimie théorique, physique, analytique.**

Etude du potentiel oxydant des $PM_{2,5}$ et du stress oxydant induit sur les cellules épithéliales bronchiques BEAS-2B

Lamia Moufarrej

Soutenue le 22 février 2021

Composition du jury :

Pr. Armelle Baeza-Squiban	Université Paris Diderot	Rapporteur
Pr. Ignacio Fernández-Olmo	Universidad de Cantabria (Espagne)	Rapporteur
Pr. Christelle Monteil	Université de Rouen-Normandie	Examinateur
Pr. Pascal Flament	Université du Littoral Côte d'Opale	Examinateur
Pr. Frédéric Ledoux	Université du Littoral Côte d'Opale	Co-directeur
Pr. Dominique Courcot	Université du Littoral Côte d'Opale	Co-directeur

Membre invité:

Dr. Anthony Verdin	Université du Littoral Côte d'Opale	Membre invité

Remerciements

L'année 2020 n'était pas une année comme les autres. Le Covid-19 nous a forcés à s'isoler, à s'habituer à travailler en distance, à annuler les vols et vacances et ne pas voir nos familles et nos proches. Personnellement, il m'a fallu multiplier mes efforts pour tout surmonter, et bien finir ma thèse. Tout cela n'aura pas été possible sans l'aide et le support de plusieurs personnes, à qui j'aimerai exprimer ma gratitude dans cet espace de liberté.

Auparavant, je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse Pr. Armelle Baeza-Squiban, et Pr. Ignacio Fernández-Olmo, pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse en tant que rapporteurs, et Pr. Pascal Flament ainsi que Pr. Christelle MONTEIL pour avoir accepté d'être les examinateurs de ma thèse et pour leurs conseils lors du comité de suivi de thèse. Je remercie Université du Littoral Côte d'Opale (ULCO) et le Pole Métropolitain de la Côte d'Opale (PMCO) pour avoir financé ma thèse.

Je tiens à remercier mes co-directeurs de thèse, Professeur Dominique COURCOT, et Professeur Frédéric Ledoux. Dominique, vous êtes le directeur de l'équipe, et vous étiez le directeur du laboratoire, mes malgré les nombreuses occupations que vous aviez, vous étiez toujours là, à l'écoute, toujours gentil et souriant. Je n'oublierai jamais votre accueil chaleureux au sein de l'équipe lorsque je suis arrivé pour mon stage de Master 2, merci pour tout cela. Fred, tu m'as encadré depuis mon stage de Master 2. J'ai énormément appris de toi, de ta façon de travailler au laboratoire, d'organiser, et de ta méthodologie de penser, et de présenter les résultats. Merci d'avoir été toujours disponible pour les questions, et encore pour m'écouter et me donner des conseils.

Je souhaiterai remercier Dr. Anthony Verdin, pour son encadrement à ma thèse. Anthony, merci pour ton aide pour les manips de TOX (deux cents échantillons !). Tu étais toujours là pour me former et m'aider. Sans toi, ma troisième année aurai était impossible.

Je souhaite remercier Dr. Sylvain Billet, Dr. Perrine Martin, Dr. Yann Landkocz, Marianne, et tous les doctorants, collègues et anciens collègues de la MREI 1 et 2. Merci pour tous les moments partagés et passés en votre compagnie, dans le laboratoire et à l'extérieur.

Un merci tout particulier à Khaoula ! Tu es une de mes plus belles rencontres en France. Tu as était toujours là pour moi, tu m'as aidé énormément, surtout pendant notre troisième année de thèse. Merci pour nos discussions, et pout ton aide tout le temps et sans condition. Je t'aime beaucoup. Merci à mes amis Libanais à Dunkerque, surtout Ghidaa, Layal et Hadi, pour les agréables moments, diners, anniversaires, soirées de jeux et bowling, et votre aide. Votre amitié compte beaucoup pour moi.

Stéphanie, Lamia et Marc !! Mes collègues, mes colocataires, mes amis, ma famille…Cette dernière année était plus facile grâce à vous, à votre support. Merci d'avoir étaient toujours là pour moi. Les filles, vous êtes des sœurs pour moi, et vous le serez toujours…

Je remercie mes meilleures amies aux Liban : Carine, Fatima, Paula, Gaëlle, et Mélissa. Malgré la distance, on n'a jamais perdu contact. Vous êtes toujours dans mon cœur. Merci car vous avez étaient là pour moi, à l'écoute. Vous êtes des amies pour la vie et rien ne nous séparera.

Il y a parfois des coïncidences, des personnes qu'on n'attendait pas revoir, et qui viennent bousculer notre vie. Bechara, mon ami de classe, mon meilleur ami, mon copain… Tu m'as soutenue, motivé, encouragé. Tu es simplement extraordinaire, et j'ai de la chance de t'avoir à mes cotées.

Enfin, les mots ne me suffisent pas pour remercier mon frère Jad et mes parents Maroun et Hélène. Sans vos sacrifices et vos encouragements, je n'aurais jamais pu arriver là. Vous êtes ma motivation, la source de ma force, et vous donnez sens à ma vie. Vos prières m'ont accompagné tout au long du chemin, et m'on permit de tout surmonter, et continuer. Je vous aime énormément. Je dédie cette thèse de doctorat à vous.

Valorisations scientifiques

Article Scientifique

Lamia MOUFARREJ, Dominique COURCOT and Frédéric LEDOUX (2020). Assessment of the $PM_{2.5}$ oxidative potential in a coastal industrial city in Northern France: Relationships with chemical composition, local emissions and long range sources. Sci. Total Environ. 748, 141448. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141448

Communications affichées

Lamia MOUFARREJ, Dominique COURCOT and Frédéric LEDOUX (2019). "Assessment of the $PM_{2.5}$ oxidative potential in northern France- relationships with chemical composition and source contribution" 7th EFCA International Symposium on Ultrafine Particles - May 15 and 16, 2019 Brussels, Belgium.

Lamia MOUFARREJ, Dominique COURCOT and Frédéric LEDOUX (2020). "Oxidative potential as a predictive indicator of $PM_{2.5}$ toxicity – relationships with PM composition and source contributions" European Aerosol Conference (EAC2020) – August 31 – September 4, 2020 Germany (online).

Table des matières

Remerciements....3
Valorisations scientifiques....5
Table des matières....7
Liste des abréviations....21
Introduction générale....23
Chapitre I: Bibliographie....31
1. Les particules atmosphériques PM....31
1.1. Définition, classification, et formation des PM....31
1.2. Classification des particules....33
1.3. Composition des PM....36
1.4. Origine des particules....38
1.5. Règlementations et recommandations....45
2. Impact des PM sur la santé....48
2.1. Pollution atmosphérique et santé publique....48
2.2. Déposition des PM le long de l'appareil respiratoire....50
2.3. Pathologies....53
2.4. Mécanismes de toxicité....58
2.5. Le Potentiel Oxydant....70
3. Caractéristiques des PM impliqués dans un effet toxique....75
3.1. Effet de la taille des PM....75
3.2. Effet des composés organiques....76
3.3. Effet des métaux....80
3.4. Effet de la fraction biologique....83
3.5. Effet des ions hydrosolubles....84
3.6. Effet cocktail....84

Objectifs et stratégie expérimentale de l'étude 86
Chapitre II : Matériel et méthodes 93
Introduction 93
1. Echantillons sélectionnés pour l'étude 94
1.1. Echantillons de $PM_{2,5}$ considérés pour l'étude du potentiel oxydant 94
1.2. Echantillons de particules $PM_{2,5-0,3}$ considérés pour l'évaluation des effets sur les cellules pulmonaires BEAS-2B et le lien avec le potentiel oxydant 95
1.3. Echantillons synthétiques 97
2. Préparation des différentes fractions 98
2.1. Fraction hydrosoluble 98
2.2. Fraction organique 99
2.3. Particules débarrassées des fractions hydrosoluble et organique 99
2.4. Fraction bioaccessible 99
3. Codification des échantillons de particules/fractions considérés 101
4. Mesure du potentiel oxydant 104
4.1. Test au Dithiotreitol (DTT) 104
4.2. Test à l'Acide Ascorbique (AA) 109
5. Evaluation de la toxicité des échantillons par les tests cellulaires 112
5.1. Culture et exposition des cellules 112
5.2. Evaluation de la cytotoxicité - mesure de l'activité de la déshydrogénase mitochondriale 113
5.3. Evaluation du stress oxydant 115
5.4. Evaluation de la réponse inflammatoire - quantification de l'interleukine-6 (IL-6) 122
6. Analyses statistiques 124
Chapitre 3 : Etude du potentiel oxydant des $PM_{2,5}$: lien avec la composition chimique et les contributions de sources 127
Introduction 127

1. Composition chimique des $PM_{2,5}$ 128
2. Profils et contribution des sources d'émission des $PM_{2,5}$ 130
3. Mesure du potentiel oxydant 133
3.1. Valeurs de potentiel oxydant des $PM_{2,5}$ à Dunkerque et comparaison avec celles d'autres études dans le monde. 134
3.2. Variation temporelle du potentiel oxydant et relation avec la concentration en $PM_{2,5}$ 137
4. Relation entre le potentiel oxydant et la composition chimique des $PM_{2,5}$ et les contributions de sources 140
4.1. Analyse de corrélation 141
4.2. Analyse en composantes principales (ACP) 144
5. Relation entre le potentiel oxydant et les sources de $PM_{2,5}$ 148
5.1. Relation entre le potentiel oxydant et les sources locales de $PM_{2,5}$ 148
5.2. Relation entre le potentiel oxydant et les sources de $PM_{2,5}$ à longue distance 152
6. Conclusion 157
Chapitre 4 : Etude de l'influence de l'origine et de la composition des particules sur le stress oxydant et relation avec le potentiel oxydant 163
Introduction 163
1. Caractéristiques chimiques des échantillons de $PM_{2,5}$ 164
1.1. Composition en espèces ioniques hydrosolubles, éléments majeurs et éléments traces 164
1.1. Composition en hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) 167
2. Evaluation de l'impact du stress oxydant sur les cellules BEAS-2B 170
2.1. Evaluation de la cytotoxicité des échantillons de particules 171
2.2. Evaluation de la réponse inflammatoire 172
2.3. Evaluation du stress oxydant 175
2.4. Evaluation du potentiel oxydant 192
2.5. Analyse de corrélation 197

2.6. Analyse en composantes principales 200
3. Discussion 205
3.1. Caractéristiques physicochimiques des $PM_{2,5-0,3}$ 206
3.2. Détermination de la toxicité des $PM_{2,5-0,3}$: réponse inflammatoire et stress oxydant 208
3.3. Relation entre stress oxydant et composition chimique 211
3.4. Potentiel oxydant des $PM_{2,5-0,3}$ 214
3.5. Relation entre potentiel oxydant et stress oxydant 217
4. Conclusion 220
Conclusion générale et perspectives 225
Références 231
Annexe 1 267
Annexe 2 268
Résumé 270
Abstract 270

Liste des Tableaux

Tableau I-1: Valeurs cibles, limites et objectifs de qualité (en µg.m^{-3}) concernant les concentrations en particules en suspension PM_{10} et $PM_{2,5}$ imposées par l'Union Européenne (trois première colonnes) et objectifs de qualité de l'OMS 47

Tableau II-1 :Composition de la solution Gamble (Colombo, Monhemius and Plant, 2008). 100
Tableau II-2: Codes des échantillons synthétiques de particules.....102
Tableau II-3: Codes des échantillons de particules.....103

Tableau III-1: Composition chimique moyenne (ng/m^3) et concentration moyenne des $PM_{2,5}$ (µg/m^3) collectées à Dunkerque entre novembre 2010 et avril 2011. 129
Tableau III-2:Caractéristiques des sources identifiées à Dunkerque (Kfoury *et al.*, 2016) et contribution moyenne à la composition des échantillons de $PM_{2,5}$ sélectionnés. 131
Tableau III-3 : Valeurs de potentiel oxydant OP-DDT et OP-AA obtenues pour des échantillons de $PM_{2,5}$ prélevés à Dunkerque et comparaison avec les valeurs citées dans la littérature (Condition d'extraction: G: solution de Gamble, H_2O: eau ultrapure, M: Méthanol, E: Ethanol, PBS: tampon phosphate (pH = 7,4), Agt : Agitation, US: traitement aux ultrasons, SF: Sans filtration). 136
Tableau III-4: Coefficient de corrélation de Spearman (r) entre le potentiel oxydant calculé à partir des vitesses de consommation de AA et DTT (respectivement OP-AAv et OP-DTTv) et les constituants des $PM_{2,5}$, les concentrations de $PM_{2,5}$ et les contributions de source. Seuls les coefficients de corrélation pour lesquels p <0,05 sont indiqués (*p <0,001; gras: r> 0,6; italique: r <0,4). 142
Tableau III-5: Sources et composés ayant un effet prédominant ou non sur les valeurs de potentiel oxydant, obtenues par les tests à l'acide ascorbique et au dithiothtreitol, sur 57 echantillons de $PM_{2,5}$ prélevés à Dunkerque, extraits avec la solution de Gamble. Récapitulatif issu des conclusions relatives aux corrélations, aux représentations polaires et aux CWT. 159

Tableau IV-1: Teneurs en éléments et ions inorganiques hydrosolubles des particules $PM_{0,3\text{-}2,5}$ collectées à Dunkerque (U-M-PM, U-P-PM, U-E-PM, U-A-PM, U-H-PM), Grande-Synthe (I-PM) et Roubaix (T-PM) (µg/g), et pour l'echantillon certifié SRM 1648a (SRM-PM). ..166

Tableau IV-2: Teneurs moyennes en HAP totaux (TPAH), HAP liés à la combustion (CPAH) et ratio CPAH/TPAH des particules $PM_{2,5-0,3}$ collectées à Dunkerque (U-M-PM, U-P-PM, U-E-PM, U-A-PM, U-H-PM), Grande-Synthe (I-PM) et Roubaix (T-PM) (µg/g), et pour l'echantillon certifié SRM 1648a (SRM-PM).....170
Tableau IV-3: Pourcentage d'atténuation de l'activité mitochondriale dans les cellules BEAS-2B exposées aux différentes fractions des échantillons $PM_{2,5-0,3}$ collectées à Dunkerque (U-M, U-P, U-E, U-A, U-H), Grande-Synthe (I) et Roubaix (T), et de l'echantillon SRM 1648a, aux doses 24 et 96 µg/cm^2, représenté par les moyennes et écarts-types sur 4 réplicats biologiques ; Mann–Whitney U-test par rapport témoin; *= $p < 0,05$. 171
Tableau IV-4: Concentration d'IL-6 rapportée aux protéines totales et au témoin, dans les cellules BEAS-2B exposées aux différentes fractions des échantillons $PM_{2,5-0,3}$ collectées à Dunkerque (U-M, U-P, U-E, U-A, U-H), Grande-Synthe (I) et Roubaix (T), et de l'echantillon SRM 1648a, à la dose 24 µg/cm^2, représentée par les moyennes et écarts-types sur 3 réplicats biologiques ; Mann–Whitney U-test vs. témoins; *= $p < 0,05$.....173
Tableau IV-5: Concentration d'IL-6 rapportée aux protéines totales et au témoin, dans les cellules BEAS-2B exposées aux différentes fractions des échantillons synthétiques de particules à la dose 24 µg/cm^2, représentée par les moyennes et écarts-types sur 3 réplicats biologiques ; Mann–Whitney U-test vs. témoins; *= $p < 0,05$. 174
Tableau IV-6: Coefficient de corrélation (Spearman) entre les paramètres cellulaires (n=96). Seules les corrélations avec $p < 0,05$ sont reportées (*$p < 0,01$; ** $p < 0,001$).....198
Tableau IV-7: Coefficient de corrélation (Spearman) entre les teneurs en HAP (n=48), et en métaux (n=24). Seules les corrélations avec $p<0,05$ sont reportées (*$p<0,01$; ** $p<0,001$) ; THAP : Somme des concentrations des 16 HAP prioritaires USEPA ; T_Mtx1 : somme des concentrations en Co, Cr, Cu, Mo, Ni, Ti, V ; T_Mtx2 : idem T_Mtx1 + Mn ; T_Mtx3 : idem T_Mtx1 + Mn, Fe ; T_Mtx4 : idem T_Mtx1 + Mn, Fe, Ba, Pb, Sn, Sr, Zn) 199
Tableau IV-8:Valeurs test obtenues pour les catégories "Fraction" et "Influence" et pour les variables quantitatives de chacune des classes. La valeur test permet de mettre en évidence les caractéristiques différant sensiblement dans la classe par rapport à l'ensemble des échantillons. Seules les valeurs test les plus remarquables ont été rapportées avec leur seuil de significativité (*$p<0,05$; **$p<0,01$; ***$p<0,001$).....204
Tableau IV-9: Effets comparatifs des différentes fractions des $PM_{2,5-0,3}$ et des particules synthétiques sur la réponse inflammatoire (IL-6), sur la quantité d'ERO intracellulaire et de lésions oxydatives à la membrane, aux protéines et à l'ADN de cellules BEAS-2B exposées

(= pas de différence significative entre 2 fractions ; > valeur significativement plus élevée) 209

Liste des Figures

Figure I-1: Formation, évolution et élimination des PM dans l'atmosphère (Charpin *et al.*, 2016) 33
Figure I-2:Exemple de formation des aérosols inorganiques secondaires 35
Figure I-3: Valeurs limites annuelles sur la concentration ambiante des PM_{10} dans différents pays (Kutlar Joss et al, 2017) 47
Figure I-4: Déposition des PM dans l'appareil respiratoire selon leur taille (Barraza, 2017). 50
Figure I-5: Prédiction des zones de dépôt des particules dans l'appareil respiratoire en fonction de la taille des particules (Source IRSST 2006). 52
Figure I-6: Principaux effets des particules fines sur la santé (INVS, 2018). 53
Figure I-7: Formation des ERO par réduction de l'oxygène (Migdal and Serres, 2011) 64
Figure I-8: Dommage à l'ADN causé par le benzo[a]pyrène (Barnes et al., 2018). 78
Figure I-9: Mécanisme de toxicité induit par les quinones (Bolton and Dunlap, 2017)..... 79
Figure I-10:Mécanismes non cycliques du stress oxydant induit par les métaux. Les processus d'activation sont représentés par des flèches bleues, les effets inhibiteurs sont indiqués par des flèches rouges (d'après Samet et al., 2019). 81
Figure I-11: Démarche expérimentale et objectifs de la thèse. 89

Figure II-1: Carte présentant les sites de prélèvement des échantillons de PM à Dunkerque, Grande-Synthe et Roubaix ; modifiée de www.geoportail.fr 96
Figure II-2: Extraction des $PM_{2,5}$ sur filtre par la solution Gamble. 101
Figure II-3: Oxydation du Dithithreitol (DTT) par les espèces rédox actives des PM. 104
Figure II-4: Etude de la stabilité de DTT dans différents solvants. 106
Figure II-5: Etude de la stabilité de la solution mère de DTT conservée à la température de 4°C et-18 °C. 107
Figure II-6: Exemple de courbe représentant la variation de la concentration en DTT (mM) en fonction du temps pour un échantillon de particules. 109
Figure II-7: Oxydation de l'acide ascorbique par les espèces rédox actives des PM pour la mesure du potentiel oxydant. 110
Figure II-8: Comparaison de la stabilité de l'acide ascorbique solubilisé dans l'eau Ultra-pure et le PBS. 111

Figure II-9: Exemple de courbe représentant la variation de la concentration en AA (mM) en fonction du temps pour un échantillon de particules. 112
Figure II-10: Oxydation de la DHE par les ERO (Balbin Villaverde, Netherton and Baker, 2019). 116
Figure II-11: Dosage de la 8-OHdG. 118
Figure II-12: Réaction entre les groupements carbonyle des protéines carbonylées et le DNPH (Castegna *et al.*, 2003). 121
Figure II-13: Principe du test IL-6 ELISA sandwich.....123

Figure III-1:Evolution temporelle des valeurs OP-DTTv et OP-AAv (nmol/min/m^3) et des concentrations de $PM_{2,5}$ (µg/m^3) des échantillons de $PM_{2,5}$ prélevés à Dunkerque en période hivernale.....138
Figure III-2: Evolution temporelle des valeurs OP-DTTv et OP-AAv (nmol/min/m^3) et des concentrations de $PM_{2,5}$ (µg/m^3) des échantillons de $PM_{2,5}$ prélevés à Dunkerque en période printanière. 139
Figure III-3: Résultats de l'Analyse en Composantes Principales (ACP) des 57 échantillons de $PM_{2,5}$ prélevés à Dunkerque. Les coefficients de corrélation entre les cinq premiers axes de l'ACP, et les composantes des $PM_{2,5}$ sont considérés comme variables actives et les contributions de sources et les valeurs de potentiel oxydant (OP-AAv et OP-DTTv) comme variables supplémentaires. 145
Figure III-4: Analyse en composantes principales des 57 échantillons de $PM_{2,5}$ prélevés dans la région de Dunkerque. Projections des variables dans le plan axe1 - axe2 (en noir: variables actives; en bleu: variables supplémentaires).....146
Figure III-5: Contributions relatives des sources de $PM_{2,5}$ en fonction de la concentration en $PM_{2,5}$ sur les 57 échantillons selectionnés sur la période novembre 2010 - avril 2011. 147
Figure III-6: Roses et représentations polaires de OP-DTT et OP-AA normalisées par rapport au volume d'air (OP-DTTv et OP-AAv) et à la masse (OP-DTTm et OP-AAm) des échantillons de $PM_{2,5}$ à Dunkerque.....149
Figure III-7: Représentations polaires de la concentration des $PM_{2,5}$ et des contributions des 11 sources de $PM_{2,5}$ estimées par le modèle CW-NMF à Dunkerque (en µg·m^{-3}). 152
Figure III-8 : Trajectoires pondérées en fonction des données de concentration (CWT) de OP-AAv et OP-DTTv (nmol·min^{-1}·m^{-3}), $PM_{2,5}$ et des contributions des sources estimées par l'analyse CW-NMF (en µg·m^{-3}) (Les sources marines et crustales montrant peu de relation avec OP ainsi que les sources locales industrielles ont été exclues de ce calcul).....154

Figure IV-1: Teneurs en HAP (µg/g) pour les particules $PM_{2,5-0,3}$ collectées à Dunkerque (U-M-PM, U-P-PM, U-E-PM, U-A-PM, U-H-PM), Grande-Synthe (I-PM) et Roubaix (T-PM) (µg/g), pour l'echantillon certifié SRM 1648a (SRM-PM) et le noir de carbone (NC-PM). 169
Figure IV-2: Concentration d'IL-6 rapportée aux protéines totales et au témoin, dans des cellules BEAS-2B exposées aux différentes fractions des échantillons de PM (gris ; dPM, EO, Hyd, PM) et de particules synthétiques (bleu ; Hyd-s, PM-s) à la dose 24 µg/cm^2. Les résultats sont représentés par la médiane et les écarts interquartiles (n=21 pour les particules $PM_{2,5-0,3}$ et n=33 pour les échantillons synthétiques) ; test de Mann-Whitney : *p <0,05 ; **p <0,01 ; ***p <0,001. 175
Figure IV-3: Quantité d'ERO rapportée aux protéines totales et au témoin, dans les cellules BEAS-2B exposées aux différentes fractions des échantillons $PM_{2,5-0,3}$ collectées à Dunkerque (U-M, U-P, U-E, U-A, U-H), Grande-Synthe (I) et Roubaix (T), et de l'echantillon SRM, à la dose 24 µg/cm^2, représentée par les moyennes et écarts-types sur trois réplicats biologiques. Mann–Whitney U-test vs. témoins; *= p < 0,05 . Vert =PM ; rouge=EO ; bleu clair=dPM, bleu foncé=Hyd. 177
Figure IV-4: Quantité d'ERO rapportée aux protéines totales et au témoin, dans les cellules BEAS-2B exposées aux différentes fractions des échantillons synthétiques de particules à la dose 24 µg/cm^2, représentée par les moyennes et écarts-types sur trois réplicats biologiques. Mann–Whitney U-test vs. témoins; *= p < 0,05 . Vert =PM ; rouge=EO ; bleu clair=dPM, bleu foncé=Hyd. 179
Figure IV-5: Concentration d'ERO rapportée aux protéines totales et au témoin, dans des cellules BEAS-2B exposées aux différentes fractions des échantillons de PM (gris ; dPM, EO, Hyd, PM) et de particules synthétiques (bleu ; Hyd-s, PM-s) à la dose 24 µg/cm^2. Les résultats sont représentés par la médiane et les écarts interquartiles (n=21 pour les particules $PM_{2,5-0,3}$ et n=33 pour les échantillons synthétiques) ; test de Mann-Whitney : *p <0,05 ; **p <0,01 ; ***p <0,001. 180
Figure IV-6: Concentration en 8-isoprostane rapportée aux protéines totales et au témoin, dans les cellules BEAS-2B exposées aux différentes fractions des échantillons $PM_{2,5-0,3}$ collectées à Dunkerque (U-M, U-P, U-E, U-A, U-H), Grande-Synthe (I) et Roubaix (T), et de l'echantillon SRM, à la dose 24 µg/cm^2, représentée par les moyennes et écarts-types sur trois réplicats biologiques. Mann–Whitney U-test vs. témoins; *= p < 0,05 . Vert =PM ; rouge=EO ; bleu clair=dPM, bleu foncé=Hyd. 182

Figure IV-7: Concentration en 8-isoprostane rapportée aux protéines totales et au témoin, dans les cellules BEAS-2B exposées aux différentes fractions des échantillons synthétiques de particules à la dose 24 µg/cm^2, représentée par les moyennes et écarts-types sur trois réplicats biologiques. Mann–Whitney U-test vs. témoins; *= $p < 0,05$. Vert =PM ; rouge=EO ; bleu clair=dPM, bleu foncé=Hyd. 183
Figure IV-8: Concentration en 8-isoprostane rapportée aux protéines totales et au témoin, dans des cellules BEAS-2B exposées aux différentes fractions des échantillons de PM (gris ; dPM, EO, Hyd, PM) et de particules synthétiques (bleu ; Hyd-s, PM-s) à la dose 24 µg/cm^2. Les résultats sont représentés par la médiane et les écarts interquartiles (n=21 pour les particules $PM_{2,5-0,3}$ et n=33 pour les échantillons synthétiques) ; test de Mann-Whitney : *p <0,05 ; **p <0,01 ; ***p <0,001 184
Figure IV-9: Concentration en protéines carbonylées rapportée aux protéines totales et au témoin, dans les cellules BEAS-2B exposées aux différentes fractions des échantillons $PM_{2,5-0,3}$ collectées à Dunkerque (U-M, U-P, U-E, U-A, U-H), Grande-Synthe (I) et Roubaix (T), et de l'echantillon SRM, à la dose 24 µg/cm^2, représentée par les moyennes et écarts-types sur trois réplicats biologiques. Mann–Whitney U-test vs. témoins; *= $p < 0,05$. Vert =PM ; rouge=EO ; bleu clair=dPM, bleu foncé=Hyd. 185
Figure IV-10:Concentration en protéines carbonylées rapportée aux protéines totales et au témoin, dans les cellules BEAS-2B exposées aux différentes fractions des échantillons synthétiques de particules à la dose 24 µg/cm^2, représentée par les moyennes et écarts-types sur trois réplicats biologiques. Mann–Whitney U-test vs. témoins; *= $p < 0,05$. Vert =PM ; rouge=EO ; bleu clair=dPM, bleu foncé=Hyd. 187
Figure IV-11: Concentration en protéines carbonylées rapportée aux protéines totales et au témoin, dans des cellules BEAS-2B exposées aux différentes fractions des échantillons de PM (gris ; dPM, EO, Hyd, PM) et de particules synthétiques (bleu ; Hyd-s, PM-s) à la dose 24 µg/cm^2. Les résultats sont représentés par la médiane et les écarts interquartiles (n=21 pour les particules $PM_{2,5-0,3}$ et n=33 pour les échantillons synthétiques) ; test de Mann-Whitney : *p <0,05 ; **p <0,01 ; ***p <0,001. 188
Figure IV-12: Concentration en 8-OHdG rapportée aux protéines totales et au témoin, dans les cellules BEAS-2B exposées aux différentes fractions des échantillons $PM_{2,5-0,3}$ collectées à Dunkerque (U-M, U-P, U-E, U-A, U-H), Grande-Synthe (I) et Roubaix (T), et de l'echantillon SRM, à la dose 24 µg/cm^2, représentée par les moyennes et écarts-types sur trois réplicats biologiques. Mann–Whitney U-test vs. témoins; *= $p < 0,05$. Vert =PM ; rouge=EO ; bleu clair=dPM, bleu foncé=Hyd. 189

Figure IV-13: Concentration en 8-OHdG rapportée aux protéines totales et au témoin, dans les cellules BEAS-2B exposées aux différentes fractions des échantillons synthétiques de particules à la dose 24 µg/cm^2, représentée par les moyennes et écarts-types sur trois réplicats biologiques. Mann–Whitney U-test vs. témoins; *= $p < 0,05$. Vert =PM ; rouge=EO ; bleu clair=dPM, bleu foncé=Hyd. 191
Figure IV-14: Concentration en 8-OHdG rapportée aux protéines totales et au témoin, dans des cellules BEAS-2B exposées aux différentes fractions des échantillons de PM (gris ; dPM, EO, Hyd, PM) et de particules synthétiques (bleu ; Hyd-s, PM-s) à la dose 24 µg/cm^2. Les résultats sont représentés par la médiane et les écarts interquartiles (n=21 pour les particules $PM_{2,5-0,3}$ et n=33 pour les échantillons synthétiques) ; test de Mann-Whitney : *p <0,05 ; **p <0,01 ; ***p <0,001. 192
Figure IV-15: OP-DTTm (pmol/min/µg d'équivalent PM) des fractions hydrosolubles et organiques des échantillons de $PM_{2,5-0,3}$ collectées à Dunkerque (U-M, U-P, U-E, U-A, U-H), Grande-Synthe (I) et Roubaix (T), et de l'echantillon SRM, représenté par les moyennes et écarts-types sur trois réplicats. Rouge=EO, bleu foncé=Hyd. 193
Figure IV-16: OP-DTTm (pmol/min/µg d'équivalent PM) des fractions hydrosolubles et organiques des échantillons synthétiques de particules, représenté par les moyennes et écarts-types sur trois réplicats. Rouge=EO, bleu foncé=Hyd. 194
Figure IV-17: OP-AAm (pmol/min/µg d'équivalent PM) des fractions hydrosolubles et organiques des échantillons de $PM_{2,5-0,3}$ collectées à Dunkerque (U-M, U-P, U-E, U-A, U-H), Grande-Synthe (I) et Roubaix (T), et de l'echantillon SRM, représenté par les moyennes et écarts-types sur trois réplicats. Rouge=EO, bleu foncé=Hyd. 196
Figure IV-18: OP-AAm (pmol/min/µg d'équivalent PM) des fractions hydrosolubles et organiques des échantillons synthétiques de particules, représenté par les moyennes et écarts-types sur trois réplicats. Rouge=EO, bleu foncé=Hyd. 197
Figure IV-19: (a) ACP réalisée considérant les 4 paramètres ERO, 8-OHdG, 8-isoprostane, Protéines carbonylées sur n=84 échantillons – (b) Représentation des barycentres des différentes fractions ou influences dans le plan (1,2). 201
Figure IV-20: ACP réalisée considérant les 4 paramètres ERO, 8-OHdG, 8-isoprostane, Protéines carbonylées sur n=84 échantillons - Représentation des échantillons dans le plan (1,2) après classification. 203

Liste des abréviations

A		**I**	
AA	Acide ascorbique	**IL**	Interleukine
Ace	Acénapthène	**InPy**	Indeno[1,2,3-c,d]pyrène
ACP	Analyse en composantes principales	**ISW**	Complexe sidérurgique intégré
Acy	Acénaphtylène	**KEAP1**	Kealch-like-ECH associated protein
ADN	Acide DésoxyriboNucléique	**L**	
AIS	Aérosols inorganiques secondaires	**LAURE**	Loi sur l'Air et l'Utilisation Rationnelle de l'Energie
Ant	Anthracène	**LDH**	Lactate déshydrogénase
AOS	Aerosols organiques secondaires	**LDL**	lipoprotéines de basse densité
B		**LC/MS**	Chromatographie en phase liquide–spectrométrie de masse
B[a]A	Benz[a]Anthracène	**M**	
B[a]P	Benzo[a]Pyrène	**MAC**	Canal de l'apoptose mitochondriale MAC
B[b]F	Benzo[b]Fluoranthène	**MDA**	Malondialdéhyde
BCA	Acide bicinchoninique	**MDH**	Déshydrogénase mitochondriale
B[ghi]P	Benzo[g,h,i]Pérylène	**MPTP**	pores de transition de perméabilité membranaire
B[k]F	Benzo[k]Fluoranthène	**N**	
BEAS-2B	Cellule épithélial bronchique humaine	**Nap**	Naphtalène
BPCO	Bronchopneumopathie chronique obstructive	**NADPH**	Nicotinamide adénine dinucléotide
BSA	Albumin de sérum bovin	**NFkB**	Facteur nucléaire kappa B
C		**NOx**	Oxyde d'azote
CAT	Catalase	**NRF2**	NFE2L2 Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
CIRC	Centre International de Recherche sur le Cancer	**O**	
CO	Monoxyde de carbone	**OP**	Potentiel Oxydant
COV	Composés organiques volatils	**O_3**	Ozone
COVNM	Composés organiques volatils non méthaniques	**OC**	Carbone organique
CWT	Concentration Weighted Trajectory	**8-OHdG**	8-hydroxy-2-désoxy guanosine
CYP	Cytochrome P450	**OMS**	Organisation Mondiale de la Santé
A		**P**	
DTT	Dithiotreitol	**PBS**	Phosphate Buffer Saline
DNTB	5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)	**Phe**	Phénanthrène
DCM	Dichlorométhane	**PM**	Particulate Matter
DHE	Dihydroéthidium	**Prx**	Enzyme de peroxydase de raifort
DMPO	5,5-diméthyl-1-pyrroline-N-oxyde	**Prx**	Peroxirédoxine
DMSO	Diméthylsulfoxyde	**PUF**	particules ultrafines

DNPH	*2,4 dinitrophénylhydrazine*	**Pyr**	*Pyrène*
Dae	*Diamètre aérodynamique équivalent*	**R**	
D[ah]A	*Dibenz[a,h]anthracène*	**RPE**	*Résonnance paramagnétique électronique*
DRX	*Diffraction des Rayons X*	**S**	
E		**SIA**	*Aérosols inorganiques secondaires*
EEA	*Agence Européenne de l'Environnement*	**SiO_2**	*Dioxide de silicium*
EC	*Carbone élémentaire*	**SLF**	*Fluide pulmonaire synthétique*
EGFR	*Récepteur du facteur de croissance épidermique*	**SOA**	*Aérosols organiques secondaires*
ELISA	*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*	**SOD**	*Superoxyde dismutase*
ERO	*Espèces réactives de l'oxygène*	**T**	
ESP	*Aciérie électrique*	**TBA**	*Acide thiobarbiturique*
F		**TCA**	*Acide trichloroacétique*
Fla	*Fluoranthène*	**TC**	*Carbone total*
Flu	*Fluorène*	**TDAH**	*trouble du déficit de l'attention avec ou sans hyperactivité*
G		**TNB**	*acide 2-nitro-5-thiobenzoïque*
GC/MS	*Chromatographie en phase gazeuse – spectrométrie de masse*	**TNFα**	*Tumor Necrosis Factor alpha*
GAPDH	*Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase*	**Trx**	*Thiorédoxine*
GDAS	*Global Data Assimilation System*	**TSA**	*trouble du spectre autistique*
GPx	*Glutathion peroxydase*	**U**	
GR	*Glutathion réductase*	**UA**	*Acide urique*
GSH	*Glutathion réduit*	**USEPA**	*United States Environmental Protection Agency*
GSSG	*Glutathion oxydé*	**W**	
H		**WHO**	*World Health Organization*
HAP	*Hydrocarbures Polycycliques Aromatiques*	**WSOC**	*Composés organiques hydrosolubles*
HO-1	*Hème oxygénase*		
HULIS	*Substances de type humique atmosphérique*		

Introduction générale

Au cours de ces dernières décennies, la pollution atmosphérique est devenue une préoccupation mondiale. D'après l'organisation mondiale de la santé (OMS), 9 personnes sur 10 respirent actuellement un air pollué (WHO, 2018). Le mot pollution est apparu au quatorzième siècle, et vient du Latin «polluere» qui signifie salir. Ce terme n'a été employé dans le sens "contamination de l'environnement" qu'en 1860, et n'a été familier qu'en 1955 (*pollution | Origin and meaning of pollution by Online Etymology Dictionary*, 2017). Selon l'article L220-2 du code de l'environnement, modifié par loi n° 2010-788 du 12 juillet 2010 - art. 179, constitue une pollution atmosphérique l'introduction par l'Homme, directement ou indirectement ou la présence, dans l'atmosphère et les espaces clos, d'agents chimiques, biologiques ou physiques ayant des conséquences préjudiciables de nature à mettre en danger la santé humaine, à nuire aux ressources biologiques et aux écosystèmes, à influer sur les changements climatiques, à détériorer les biens matériels, à provoquer des nuisances olfactives excessives » (*Code de l'environnement - Article L220-2*, 2010).

Historiquement, plusieurs épisodes de pollution ont eu lieu dans le monde, notamment en 1952, lorsque le smog de Londres provenant des industries et des cheminées a abouti à la mort de 4000 personnes. Cet évènement a contribué à une prise de conscience de l'impact de la pollution atmosphérique sur la santé. Plus récemment, la pollution atmosphérique a engendré en 2016 la mort prématurée de 4,2 millions de personnes dans le monde, et a été la cause de 16 % des décès par cancer du poumon, de 25 % des décès par maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC), de 17 % des cardiopathies ischémiques et accidents vasculaires cérébraux et de 26 % des décès par infection respiratoire (WHO, 2017). En 2017, elle a abouti à la mort de 1,24 millions de personnes en Inde (Balakrishnan *et al.*, 2019), et en Europe (à l'exclusion de la Turquie), la mort prématurée de 400 000 personnes (EEA, 2019).

La pollution atmosphérique peut être causée par des sources naturelles ou anthropiques. Elle peut être liée à la présence de gaz. Le monoxyde de carbone (CO), provient de la combustion incomplète des combustibles fossiles et biocarburants, le dioxyde de carbone (CO_2) et le dioxyde de soufre (SO_2) proviennent majoritairement du secteur de production d'électricité, la combustion de combustibles fossiles (charbon et pétrole), et la fusion de minerais contenant du soufre. Les oxydes d'azotes (NOx) et les composés

organiques volatils (COV) sont émis principalement par le transport routier, les installations industrielles et les solvants chimiques. Les métaux sont émis principalement par les industries, le méthane (CH_4) est produit en grande partie par le secteur de l'agriculture, les déchets et les combustibles fossiles. Les composés organiques volatils non méthaniques (COVNM) sont émis par les solvants, et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) proviennent de la combustion incomplète des carburants organiques. Certains polluants dits polluants secondaires, sont formés dans l'atmosphère par réactions entre les gaz précurseur, comme l'ozone (O_3) qui est produit suite à une réaction entre les NOx et COV sous l'effet de la lumière (WHO, 2017). La pollution de l'air est également causée par les aérosols, qui sont des particules solides ou liquides en suspension dans l'air. Ces particules atmosphériques (PM) peuvent être émises directement par des sources naturelles, comme les volcans, le pollen, les océans, les feux de forêts, mais principalement par des sources anthropiques, comme le trafic routier, les émissions industrielles et le chauffage domestique. De même, elles peuvent être générées à partir des gaz précurseurs que sont les NOx, SO_2 et NH_3. Vu leur petite taille, ces particules peuvent pénétrer profondément dans les voies respiratoires, et cibler d'autres organes en intégrant la circulation sanguine.

Dans le but de protéger la santé de l'Homme, des directives et recommandations vis-à-vis des niveaux de concentrations de différents polluants ont été publiées. Pour les $PM_{2,5}$, qui sont par définition des particules atmosphériques dont le diamètre aérodynamique (Dae) est inférieur ou égal à 2,5 µm, l'Union Européenne a fixé une valeur limite annuelle de 25 µg/m^3 depuis le 01/01/15, et un objectif de 20 µg/m^3 à atteindre en 2020. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a recommandé une valeur annuelle de 10 µg/m^3 depuis 2006. En Europe, cette valeur a été dépassée dans 69 % des stations, situés dans tous les pays ayant communiqué des données sur les $PM_{2,5}$, sauf l'Estonie, la Finlande et la Norvège (EEA, 2019). En France, la recommandation journalière de l'OMS (25 µg/m^3) a été dépassée cette même année sur l'ensemble de la région Ile-de-France et dans le Nord du pays.

De nombreuses études ont été réalisées, afin de comprendre l'impact de la pollution atmosphérique par les composés gazeux et par les PM sur la santé humaine. Chen et al., (2018) ont montré que l'augmentation de 10 µg/m^3 de la concentration moyenne de PM, de SO_2, et de CO était associée de manière significative à des augmentations des hospitalisations quotidiennes. Genc et al., (2012) ont conclu que les nanoparticules peuvent facilement cibler le système nerveux central (SNC), où ils peuvent activer les réponses immunitaires innées.

Lam et al., (2016) ont montré qu'il existe un risque accru de troubles du spectre autistique (TSA) avec une exposition croissante à la pollution atmosphérique, surtout pour le cas des $PM_{2,5}$ et des PM_{10}. Plusieurs études se sont intéressées à la relation entre pollution atmosphérique et la psychiatrie. Oudin et al., (2016) a montré que les adolescents vivant dans des zones de forte pollution étaient plus susceptibles de présenter un trouble psychiatrique. De même, Szyszkowicz et al., (2010) ont trouvé une corrélation entre le CO, NO_2, SO_2 et les PM_{10}, et les tentatives de suicide durant la période froide. L'exposition prolongée aux $PM_{2,5}$ a été associée à un risque accru d'apparition de symptômes dépressifs, tandis qu'une concentration accrue de dioxyde d'azote aggrave les conditions dépressives existantes (Buoli *et al.*, 2018). Concernant le cancer en France, 1500 cas de cancer de poumon ont été attribués aux $PM_{2,5}$ en 2015 (Kulhánová *et al.*, 2018). De ce fait, le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) a classé la pollution de l'air et les particules atmosphériques comme cancérogène certain pour l'Homme (groupe I) (Loomis *et al.*, 2013).

Cependant, la concentration des PM n'est pas le seul paramètre permettant de prédire leur toxicité, car les espèces qui contribuent le plus à la masse des PM ne contribuent pas forcément le plus à leur toxicité (Borm *et al.*, 2007). Une question majeure qui se pose est donc de savoir quels sont les composés qui contribuent le plus à la toxicité des particules : les hydrocarbures aromatiques polycycliques, les composés organiques hydrosolubles, les éléments métalliques,…De même, ces composés se retrouvent à l'intérieur de différentes fractions (hydrosoluble, organique, la fraction particulaire totale, la fraction particulaire débarrassée de la fraction organique et hydrosoluble) plus moins accessibles par les cellules cibles et le rôle de ces fractions à la réponse biologique représente également une question d'intérêt…De plus, il est important de savoir s'il existe des effets additifs, synergiques, ou antagonistes sur la toxicité des PM, entre les différentes espèces chimiques présentes dans les PM. Il est également intéressant de connaitre la relation entre les sources d'émission des PM et les effets toxiques déclenchés.

Lors du contact des différentes fractions des PM avec des cellules pulmonaires, la toxicité est manifestée par le déclenchement de différents mécanismes, tels que le stress oxydant, l'inflammation, la génotoxicité, la mort cellulaire... La plupart des mécanismes de toxicité des PM font intervenir en premier lieu un stress oxydant. Ce dernier est défini par un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les défenses anti-oxydantes. Les ERO possèdent un fort degré de réactivité, leur permettant d'oxyder l'ADN,

et réagir également avec les protéines et les lipides. De ce fait, le stress oxydant peut être étudié en mesurant la concentration de biomarqueurs comme la 8-OHdG, la 8-isoprostane et les protéines carbonylées, qui témoignent d'effets des PM sur l'ADN, les lipides et les protéines respectivement. Plusieurs études se sont intéressés à étudier le lien entre la composition chimique des PM et le déclenchement du stress oxydant. Certaines études ont montré un lien entre la surproduction des ERO par les PM, et les métaux (Jan *et al.*, 2020), avec les composés organiques (Badran *et al.*, 2020), et ou encore avec les composés organiques hydrosolubles des PM (Win *et al.*, 2018). Récemment, des méthodes a-cellulaires d'évaluation du potentiel oxydant (OP) ont été utilisées afin d'estimer la capacité des PM à générer les ERO, et semblent pouvoir être utilisées pour prédire le stress oxydant (Øvrevik, 2019). Plusieurs études récentes ont utilisés ces méthodes de OP afin d'étudier le lien avec les sources d'émissions et avec la composition chimique des PM (Jiang *et al.*, 2020; Simonetti, *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2020).

Les objectifs de cette thèse sont d'apporter une contribution complémentaire à ce domaine d'étude en étudiant en particulier :

- le lien associant sources d'émissions, composition des PM et valeurs de potentiel oxydant,
- l'apparition d'un stress oxydant en lien avec l'origine des particules,
- le rôle de différentes fractions des PM dans l'apparition du stress oxydant
- si le potentiel oxydant représente un indicateur fiable pour la prévision d'un stress oxydant.

Pour cela, différents échantillons ont été sélectionnés : échantillons sous influence urbaine, industrielle, influence de trafic routier, et collectés à différentes saisons. A partir de chacun des échantillons, différentes fractions ont été préparées (fraction hydrosoluble, fraction organique, fraction bioaccessible, PM globales, PM débarrassées de leur fraction hydrosoluble et organique). De plus, des mélanges d'oxydes métalliques et du noir de carbone, simulant les émissions industrielles, avec un échantillon réel certifié SRM, ont été considérés pour cette étude. Deux méthodes acellulaires d'évaluation du potentiel oxydant ont été développées : le test utilisant le Dithiothréitol (DTT) et celui utilisant l'acide ascorbique (AA). Le stress oxydant déclenché par ces échantillons a été étudié sur des cellules pulmonaires BEAS-2B, en quantifiant les ERO et en mesurant les atteintes aux protéines, lipides et à l'ADN.

Ce mémoire est divisé en 4 chapitres :

Le premier chapitre comprend des informations sur la composition des PM, leurs sources d'émission, l'effet d'une exposition aux PM sur la santé humaine, les mécanismes de toxicité déclenchés suite à l'inhalation des PM, le rôle des caractéristiques chimiques des PM sur leur toxicité, en focalisant surtout sur le stress oxydant et les dommages liés. La dernière partie de ce chapitre exposera les objectifs de cette thèse.

Le deuxième chapitre expliquera les matériels et méthodes utilisés durant ce travail, et commencera par la présentation des échantillons considérés dans ce travail ainsi que les protocoles de préparation de leurs différentes fractions. Il présentera l'optimisation des tests d'OP acellulaires et leur application aux extraits hydrosolubles et organiques. Enfin, il détaillera les tests cellulaires utilisés pour l'étude de la cytotoxicité, l'inflammation, et le stress oxydant par différents biomarqueurs.

Le troisième chapitre présentera les résultats de potentiel oxydant de particules $PM_{2,5}$ prélevées en milieu urbano-industriel. Il portera sur les résultats de corrélation entre la composition chimique des PM et leur potentiel oxydant, et le lien entre les profils des sources d'émission et le OP. En particulier il s'attardera à faire le lien entre l'origine aussi bien en terme de sources que géographiques des particules à haute valeur de OP.

Le quatrième chapitre présentera les résultats des tests de potentiel oxydant et de stress oxydant effectués sur les différentes fractions des échantillons de PM, et sur des échantillons synthétiques préparés au laboratoire. Il soulignera l'effet des saisons, des sources, de la composition chimique des particules sur les réponses cellulaire et acellulaire. Ce chapitre soulignera également l'effet de certains oxydes métalliques considérés individuellement ou en mélange, des fractions organique et hydrosoluble, sur la réponse cellulaire après exposition aux différentes fractions.

Chapitre I : Bibliographie

Chapitre I: Bibliographie

1. Les particules atmosphériques PM

1.1. Définition, classification, et formation des PM

1.1.1. Définition des aérosols atmosphériques et des PM

L'aérosol (aero: air; sol: solution) atmosphérique désigne une particule solide ou liquide, en suspension dans l'air. Dans la littérature, le terme particule, ou PM de l'anglais (Particulate Matter), est employé, lorsque l'on étudie spécifiquement les particules sans considérer l'air dans lequel elles sont en suspension.

1.1.2. Taille des PM

Les particules peuvent être classées selon leur taille, en utilisant le Diamètre aérodynamique équivalent (Dae). En effet, les particules n'ont pas une forme bien définie, pour cela, on définit le Dae d'une particule atmosphérique comme étant égal au diamètre d'une particule sphérique de densité 1 g/cm^3 ayant la même vitesse de chute que la particule considérée.

Les particules peuvent être classées en 3 groupes, selon leur Dae :

- les particules «grossières», dont le diamètre est entre 2,5 et 10 µm ($PM_{10-2,5}$) ;
- les particules «fines» avec un diamètre inférieur ou égal à 2,5 µm ($PM_{2,5}$) ;
- les particules «ultrafines» avec un diamètre inférieur ou égal à 0,1 µm ($PM_{0,1}$).

(Wolff and Perry, 2010).

Les études d'impact des PM sur la santé humaine s'intéressent surtout aux particules fines et ultrafines car elles peuvent pénétrer profondément dans le système pulmonaire, allant jusqu'aux alvéoles pulmonaires.

1.1.3. Formation des PM

Les PM, surtout grossières, peuvent se former par des processus mécaniques, et donc être émises directement par des sources naturelles, par l'action du vent sur le sol, le pétillement de la mer, et les éruptions volcaniques.

Les PM peuvent également se former dans l'atmosphère via des interactions physiques, chimiques, et les transformations, avec des gaz ou des PM préexistants. Ces mécanismes modifient la taille, la structure, et la composition des particules.

Durant leur séjour dans l'atmosphère, les PM peuvent participer à différentes transformations, telles que la coagulation, l'absorption de gaz, et les réactions chimiques.

La nucléation aboutit généralement à la formation de particules ultrafines, notamment par conversion de composés gazeux en particules, lorsqu'il y a saturation de la phase gazeuse, à une température donnée (nucléation homogène).

La condensation des vapeurs sur une particule support (nucléation hétérogène), ou encore la coagulation de ces particules avec d'autres particules, aboutit à la formation des $PM_{2,5}$ et des PM grossières. Cette étape est appelée accumulation-coagulation.

Enfin, les particules sont éliminées de l'atmosphère par différents processus, tels que l'impaction et les retombées par voie sèche (sédimentation) et humide (effet des précipitations) (Figure I-1).

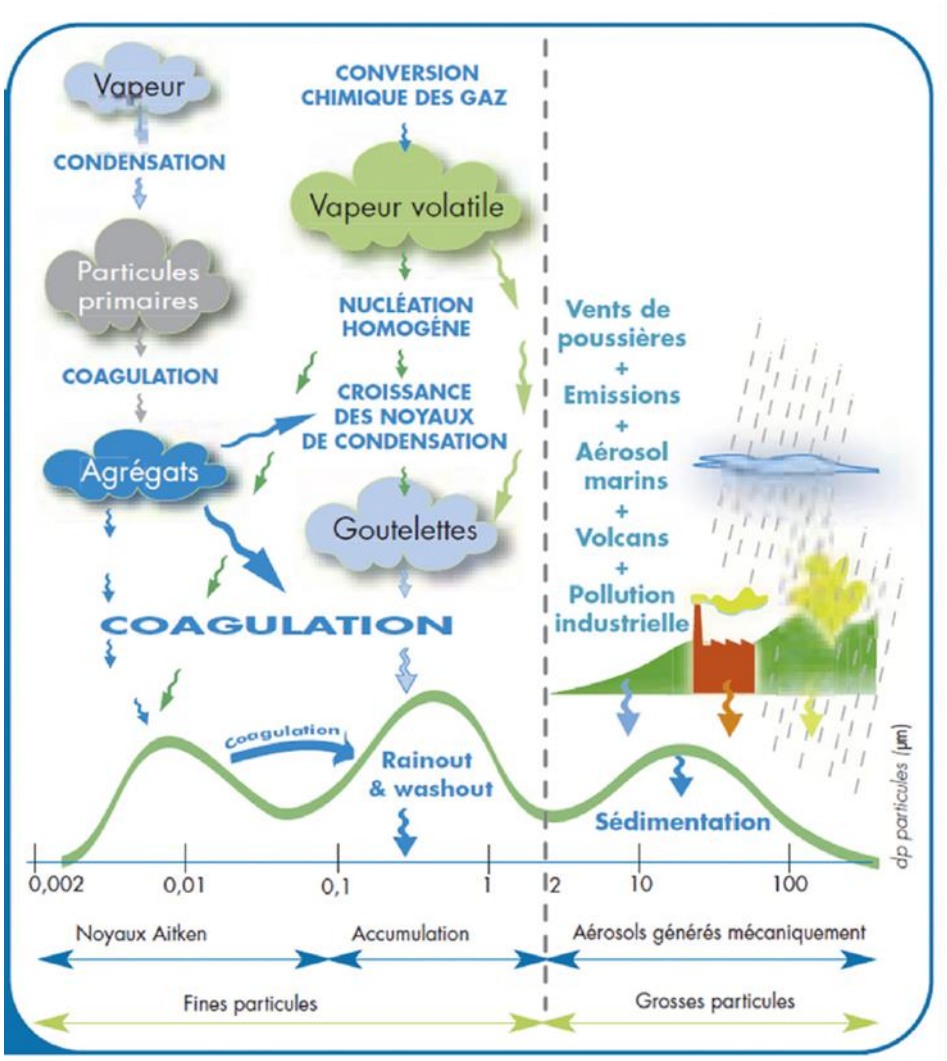


Figure I-1: Formation, évolution et élimination des PM dans l'atmosphère (Charpin *et al.*, 2016)

1.2. Classification des particules

1.2.1. Particules primaires

Les particules primaires sont émises directement de la source naturelle ou anthropique, sans subir de transformations. Leurs émissions dans l'air sont affectées par plusieurs paramètres, notamment par les caractéristiques physiques des particules (taille, densité), et les conditions météorologiques, comme la vitesse du vent et les précipitations (Tegen and Schepanski, 2018).

1.2.2. Particules secondaires

Les particules secondaires sont des particules qui ont subi des modifications depuis leur introduction dans l'atmosphère. Elles sont produites soit par une conversion gaz-particules, soit par condensation des composés gazeux sur la surface des particules primaires préexistantes.

Les aérosols inorganiques secondaires (AIS), composés d'ammonium (NH_4^+), de nitrate (NO_3^-) et de sulfate (SO_4^{2-}) représentent une classe importante des particules secondaires. Ils sont essentiellement produits par la conversion gaz-particules de l'ammoniac (NH_3), des oxydes d'azote (NOx), et du dioxyde de soufre (SO_2).

Par exemple, dans le cas du sulfate, le dioxyde de soufre (SO_2) est transformé en acide sulfurique, sous l'effet du rayonnement et des espèces oxydantes (O_2, O_3, peroxydes, radicaux) présentes dans l'atmosphère. Ce dernier réagit ensuite avec NH_3, et forme le sulfate d'ammonium $(NH_4)_2SO_4$, que l'on retrouve dans les PM.

Quasiment de la même manière que le SO_2, les NO_X peuvent être convertis en acide nitrique par oxydation dans l'atmosphère. L'acide nitrique ainsi formé réagit avec NH_3 et forme du nitrate d'ammonium NH_4NO_3 (Figure I-2). De plus, l'acide nitrique peut réagir avec des substances chimiques présentes dans les PM_{10}, comme le carbonate de calcium, et enrichir en nitrate à la fraction grossière des PM (Seinfeld and Pandis, 2006).

Entre 2013 et 2015, les aérosols secondaires ont été le contributeur majeur à la concentration des $PM_{2,5}$ (aérosols inorganiques secondaires (AIS): 35% ; aérosols organiques secondaires (AOS) 19%) (Liang *et al.*, 2016).

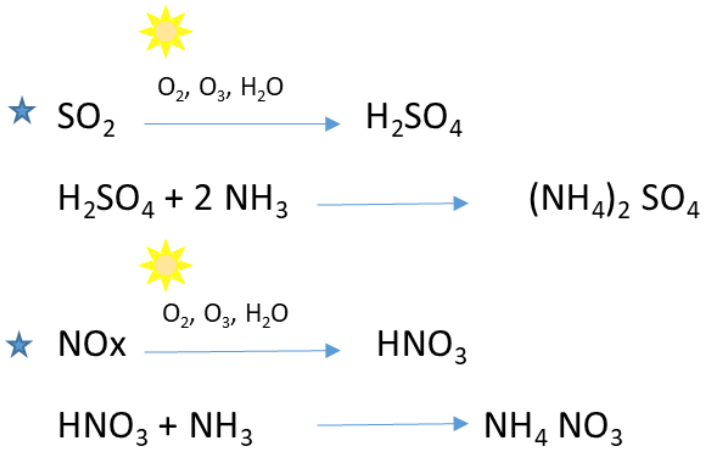


Figure I-2:Exemple de formation des aérosols inorganiques secondaires

Les aérosols organiques secondaires (AOS) sont des constituants organiques oxygénés des PM. Les COV biogéniques (isoprène, monoterpènes, sesquiterpènes, …) et anthropiques (hydrocarbures aromatiques polycycliques,…), sont des précurseurs pour les AOS. Les AOS sont formés par la transformation chimique d'oxydation des composés organiques présents dans l'atmosphère. Caractérisés par des pressions de vapeur saturante plus faible que celle de leurs précurseurs, les produits formés sont peu volatils et tendent à se répartir entre la phase gazeuse et la phase condensée.

Un exemple de formation des AOS implique l'α-pinène, un composé organique gazeux émis par les arbres, qui est connu pour réagir avec l'ozone et les radicaux OH° dans l'atmosphère, pour produire des vapeurs organiques oxygénées. L'ozone réagit avec la double liaison carbone-carbone dans l'α-pinène, et cela peut produire du norpinonaldéhyde, de l'acide pinonique, de l'acide norpinonique, de l'acide pinique (Christoffersen *et al.*, 1998; Kamens *et al.*, 1999), ainsi que des radicaux hydroxyle, des radicaux alkylperoxy, du formaldéhyde, du monoxyde de carbone et du dioxyde de carbone (Waring and Wells, 2015). Certains de ces composés sont semi-volatils, et se condensent ensuite sur des aérosols organiques primaires préexistants, pour former des AOS.

1.3. Composition des PM

1.3.1. Fraction ionique

La fraction ionique est l'une des fractions majoritaires des particules atmosphériques, surtout pour les particules fines. Une étude récente a trouvé que cette fraction constituait 56% des PM_{10} prélevées dans un site urbain (Švédová *et al.*, 2019). Les ions SO_4^{2-}, NO_3^-, NH_4^+, Cl^-, K^+, Na^+, Ca^{2+} et Mg^{2+}, représentent les ions hydrosolubles prédominants dans les particules. Comme mentionné précédemment, le sulfate provient surtout de l'oxydation du dioxyde de soufre dans l'atmosphère, le nitrate dérive de l'oxydation des oxydes d'azote, l'ammonium est formé par les réactions de neutralisation de l'ammoniac atmosphérique en sels d'ammonium, en présence d'acides sulfurique et nitrique. Les ions sulfate, nitrate et ammonium peuvent constituer à eux seuls entre 40% à 65% de la masse des $PM_{2,5}$ (Sillanpää *et al.*, 2006). Le K^+ est en partie associé à la combustion de biomasse et de charbon (Paulauskas *et al.*, 2020). Na^+, Cl^-, et Mg^{2+} sont retrouvés dans les sels de mer (Y. Zhang *et al.*, 2020). Mg^{2+}, Ca^{2+}, et K^+ peuvent aussi être associés aux sources crustales (Alharbi, Shareef and Husain, 2015).

1.3.2. Fraction carbonée

La fraction carbonée représente plus de 30% de la masse de $PM_{2,5}$ dans les sites urbains (Bautista *et al.*, 2014), et plus de 20% de la concentration des PM_{10} (Megido *et al.*, 2016), et leur contribution peut atteindre plus de 50% au niveau de sites urbains fortement influencés par le trafic routier (Haddad *et al.*, 2011). Il est important de distinguer le carbone organique (OC) et le carbone élémentaire (EC). Ces derniers jouent un rôle important dans divers processus atmosphériques: l'EC présente généralement un forçage climatique positif car il absorbe le rayonnement solaire, tandis que l'OC montre globalement un forçage climatique négatif.

EC est émis exclusivement lors de combustions incomplètes, et ces particules se répartissent davantage dans le mode de condensation (24,1%), et le mode accumulation

(57,2%), que dans le mode des particules grossières (18,7%) qui sont caractérisés par un diamètre aérodynamique moyen en masse aux alentours de 0,3, 0,7 et 4 µm, respectivement (Jia *et al.*, 2020).

L'OC comprend des espèces primaires et secondaires, d'origine anthropique et biogénique. Les espèces organiques primaires d'origine anthropique sont émises surtout par la combustion, et les espèces secondaires sont formées par de nombreuses réactions impliquant un certain nombre de COV gazeux tels que les alcanes, les oléfines, les aromatiques, l'isoprène et le terpène.

La fraction biologique des particules renferme une forte teneur d'OC. Une étude récente a trouvé que 4,5 à 9,5% du OC dans les $PM_{2,5}$ provient de la fraction biogénique primaire (Golly *et al.*, 2019). La détection des marqueurs biochimiques de cette fraction biogénique (ex : protéines, acides gras, sucres), et des acides nucléiques (ADN et ARN), est utilisée pour déterminer leurs origines (débris végétaux ou animaux, bactéries, champignons ou virus). Par analyse chimique, il a été montré que l'arabitol et le mannitol pouvaient être considérés comme des traceurs de spores fongiques (Bauer *et al.*, 2008).

Les composés organiques hydrosolubles (WSOC) font partie de l'OC. Des études réalisées au Brésil (Mayol- Bracero *et al.*, 2002), en Inde (Deshmukh, Kawamura and Deb, 2016), et en Chine (Wen *et al.*, 2018), ont trouvé qu'ils constituaient entre 45 et 85% du OC des $PM_{2,5}$. Cette fraction contient les acides mono et di-carboxyliques, les carbonyles, les polyols, les polyglycols, les acides céto-carboxyliques, les éthers, les nitrates organiques, les amines aliphatiques, les acides aminés, et divers composés multifonctionnels. Wu et al., (2019) a identifié 7300 WSOC dans des échantillons de $PM_{2,5}$.

Les substances de type humique atmosphérique (HULIS), en anglais humic-like substances, sont des composés polycycliques, contenant des groupes carbonyle, carboxyle et hydroxyle. Ils sont nommés ainsi en raison de leur ressemblance avec les acides humiques et fulviques terrestres et aquatiques (Graber and Rudich, 2006). Les HULIS sont considérées comme étant la fraction hydrophobe des WSOC, avec un poids moléculaire relativement plus élevé. Ils peuvent influencer les propriétés d'absorption des molécules d'eau des aérosols dans l'atmosphère. Une étude en Chine a trouvé que 81 % de la masse totale des HULIS appartiennent à la gamme granulométrique entre 0,63 et 0,87 µm (Lin *et al.*, 2010).

1.3.3. Fraction métallique, non-métallique

Les éléments traces (Ag, As, Ba, Bi, Cd, Co, Nb, Ni, Rb, Cs, Sr, Te, et Tl) sont le plus souvent présents dans les particules avec des concentrations inférieur à 1 ng/m^3. Pour les éléments Ti, Pb, Sn, V, Cr, Cu, Mn, ils sont présents avec des concentrations allant de 1 à 10 ng/m^3. Les éléments Zn, P, Al, Ca, Mg sont plus concentrés (entre 10 et 50 ng/m^3) et finalement les éléments majeurs Fe, K, Na, Cl ont des concentrations le plus souvent supérieures à 100 ng/m^3 (Kfoury, 2013).

Selon Salcedo et al., (2016), ces éléments peuvent êtres divisées en 4 catégories. La première comprend les composants du sel marin, le second groupe est lié aux sources crustales, les deux autres groupes sont liés aux origines industrielles et urbaines.

1.4. Origine des particules

1.4.1. Sources naturelles

A l'échelle mondiale, les sources naturelles émettent 90% de la masse des particules (Delmas, Mégie and Peuch, 2007). Cependant lorsque la question est abordée à une échelle locale, comme une zone à forte densité de population, la part des émissions anthropiques est plus importante que la part naturelle (Kuniyal and Guleria, 2019).

1.4.1.1. Source marine

La source marine est l'une des principales sources de PM dans l'atmosphère, du fait que les mers et océans occupent 70% de la surface de la Terre (Lewis and Schwartz, 2004). Manders et al., (2010) ont estimé que la concentration du sel marin dans les PM_{10} en Europe, variait entre 0,3 et 13 µg/m^3.

Lorsque les sels marins sont émis dans l'atmosphère, ils contiennent les mêmes espèces chimiques que celles présentes dans l'eau de mer et dans les mêmes proportions. Ainsi, ils renferment les espèces suivantes dans un ordre de masse décroissant : chlorure, sodium,

sulfates, magnésium, calcium et potassium. On parle alors de « sel marin frais », pour désigner qu'il n'a pas évolué chimiquement parlant. Le NaCl est le composant principal des aérosols marins dont le profil granulométrique présente un mode majoritaire caractérisé par un Dae supérieur à 1 µm (Blanchard and Woodcock, 1980), mais également une composante moindre aux plus petites tailles (inférieur à 1µm) (Mårtensson *et al.*, 2003; Feng *et al.*, 2017).

L'aérosol marin peut subir des transformations dans l'atmosphère, grâce à des processus physiques et chimiques, tels que des interactions avec les nuages, ou encore des réactions avec d'autres espèces chimiques. Par exemple, il est bien connu que l'acide nitrique et l'acide sulfurique dans l'atmosphère peuvent réagir avec les sels marins. Cette réaction entraine une formation d' ions nitrate et sulfate associés aux ions sodium, et à l'inverse une diminution des concentrations de Cl^- et de Br^- dans ces particules, en les transformant en HCl et HBr gazeux (Delmas, Mégie and Peuch, 2007). On parle alors de « sels marins âgés », ou « sels marins anthropisés ».

1.4.1.2. Source crustale

Les poussières crustales correspondent à des particules de sol généralement remises en suspension dans l'air sous l'effet du vent. Elles peuvent être émises dans toutes les régions du monde quand les sols sont secs, et ce phénomène est prépondérant dans les régions arides et semi-arides du monde. Les deux sources les plus importantes de poussières dans le monde sont le désert du Sahara en Afrique, et le désert de Gobi et Takla-Makan en Asie.

Les particules crustales contiennent majoritairement les éléments suivants: Al, Si, Fe, Ti, Ca, Na, Mg et K (Usher, Michel and Grassian, 2003) dans des proportions différentes selon la composition des sols. En Europe, dans les sites urbains, sa contribution est plus élevée pour les PM_{10} (24 %) que pour les $PM_{2,5}$ (9 %) (Belis *et al.*, 2013). En Chine, le pourcentage moyen des particules crustales dans les $PM_{2,5}$ est de 22% au nord et 9% au sud (Zhang *et al.*, 2017).

Les composants solubles des particules crustales peuvent agir comme des noyaux géants efficaces vis-à-vis de la condensation d'eau et la formation des nuages (CCN), améliorant le développement du processus de pluie chaude dans les nuages continentaux (Levin *et al.*, 2005). En raison de leurs interactions avec la lumière et la vapeur d'eau, la poussières du désert affectent à la fois l'équilibre radiatif et le cycle de l'eau. Les particules grossières de

poussière peuvent être déposées par sédimentation, turbulence et précipitations sèches et humides (Flores *et al.*, 2017).

1.4.1.3. Source volcanique

Les éruptions volcaniques entrainent l'émission de particules couvrant un très large spectre granulométrique, allant de la gamme submicronique à plusieurs millimètres. Les particules les plus grosses et les plus lourdes suivent des trajectoires paraboliques, se traduisant par la retombées des particules à une échelle locale. En revanche, les particules les plus fines peuvent être transportées au-dessus de la couche limite par les vents géostrophiques et y séjourner sur de longues périodes, avec pour effet de pouvoir affecter le climat. Les particules de taille intermédiaire sont transférées par le vent, diffusées par la turbulence, et enfin déposées par gravité au sol (Costa, Macedonio and Folch, 2006).

Elles contiennent Si, Al, Ca et Fe comme éléments principaux et K, Mg, Mn, Na, P, Ti et S comme éléments mineurs (Alraddadi, 2020). L'analyse minéralogique des particules volcaniques révèle des phases principales, comme la leucite ($KAlSi_2O_6$), le plagioclase ($NaAlSi_3O_8$, $CaAl_2Si_2O_8$), le feldspath alcalin ($KAlSi_3O_8$, $(K,Na)AlSi_3O_8$, $KAlSi_3O_8$, $(Na,K)AlSi_3O_8$), le clinopyroxène ($(Ca,Mg,Fe,Ti,Al)2\ (Si,Al)_2\ O_6$), la silice ($SiO_2$), l'olivine ($(Mg^{2+}, Fe^{2+})_2\ SiO_4$), et le gypse ($CaSO_4\ 2H_2O$) (Cangemi *et al.*, 2017).

1.4.1.4. Source biogénique

Les aérosols biogéniques, également appelés bio-aérosols, sont un mélange de micro-organismes viables tels que le pollen, champignons, bactéries, virus, endotoxines, métabolites, toxines, et non viables comme les composés antigéniques, cellules mortes de la peau, peaux mortes, débris de plantes et d'insectes. Leur taille peut être inférieure à 0,1 µm et peut aller jusqu'à 100 µm. Ils ont tendance à se fixer dans une fraction particulaire grossière. Certaines études ont trouvé que les sources biologiques de particules représentent entre 5% et 10% de la composition des aérosols (Morakinyo *et al.*, 2016). Les particules biologiques primaires (les bactéries, les spores, les champignons, les virus, les algues et le pollen) sont présentes dans l'atmosphère, et sont importantes dans le cycle de vie de nombreux organismes et écosystèmes. Dans les forêts tropicales, les champignons peuvent présenter

35% de la concentration en PM_{10} (Elbert *et al.*, 2007). Les éléments C, N, O, P, K et Si sont des composants majeurs de la plupart des particules biogéniques (Li *et al.*, 2020).

1.4.2. Sources anthropiques

1.4.2.1. Agriculture

Les émissions des PM de cette source sont principalement dues à la mise en suspension des particules du sol, suite au passage d'engins agricoles lourds, et à l'épandage de la biomasse (résidus de cultures ou compost). Les activités principales responsables de l'émission des PM dans l'atmosphère sont le travail du sol, la récolte, la combustion des résidus de récolte, le semis, l'épandage d'engrais, et la pulvérisation de biomasse et de produits phytosanitaires, couramment désignés par le terme de pesticides. La quantité, et les caractéristiques physico-chimiques des PM émises, varient avec les conditions environnementales, le type du sol, de culture, de l'humidité du sol et les pratiques agricoles (Maffia *et al.*, 2020).

Cette source contribue à 6% des émissions des $PM_{2,5}$ primaires en Europe (Amann *et al.*, 2017). Les pesticides (organophosphorés, pyréthroïdes, carbamates, et strobirulines) ont été identifiés dans les $PM_{2,5}$, avec des concentrations moyennes allant de 20 pg/m^3 pour le carbofuran jusqu'à 315 pg/m^3 pour le permethrin (Nascimento, da Rocha and de Andrade, 2017). Le gaz trace dominant émis par les activités agricoles est l'ammoniac. L'agriculture contribue aussi à la formation des aérosols inorganiques secondaires (Lamarque *et al.*, 2011), riches en ammonium, et qui est formé à partir de l'ammoniac. Il faut mentionner qu'environ 80 à 90 % du NH_3 atmosphérique provient de l'agriculture, et en particulier de l'élevage.

1.4.2.2. Activités de transport

Les émissions de particules par le secteur du transport concernent tant le transport routier, que celui par voie aérienne ou maritime.

Au sujet du transport routier, les émissions des polluants gazeux à l'échappement ont nettement diminué au cours de ces trois dernières décennies depuis l'entrée en vigueur des normes Euro, à partir de 1990. A ce jour, le renforcement des exigences dans le cadre de la norme Euro 6 s'est traduit par des teneurs limites à l'émission en NOx, CO, CO_2, et en hydrocarbures, plus faibles (0,315; 0,455; 378; 0,00203 g/km) que celles admises pour les véhicules Euro 5 (2,82; 0,0154; 490; 0,0858 g/km), respectivement (Papadopoulos *et al.*, 2020). Le trafic routier émet des particules non seulement au niveau de l'échappement mais aussi en raison de l'usure des pièces mobiles (freins, pneus, embrayage…). Les éléments suivants sont considérés comme traceurs du trafic routier sans qu'ils soient exclusifs: Cu, K, Mn, Zn, Pb, Ba, Sb, Br, As, V, Sn et Cd (Gietl *et al.*, 2010), avec Cu , Sb, Ba, et Sn générés par les freins (Thorpe and Harrison, 2008). Entre 1990 et 2014, le trafic routier a contribué à 15 % des émissions des $PM_{2,5}$ au niveau mondial (Karagulian *et al.*, 2015). Les émissions à l'échappement, riches en particules carbonées et hydrocarbures aromatiques polycycliques, contribuent plus à la concentration de $PM_{2.5}$ que celles liées aux phénomènes d'usure des pièces du véhicule (EEA, 2019).

Le trafic maritime est caractérisé par l'émission de particules carbonées, mais aussi de SO_4^{2-}, NO_3^- et NH_4^+, Ni et V, qui sont émis par la combustion du fuel lourd lié à cette source (Kfoury *et al.*, 2016). Ni et V sont généralement considérés comme traceurs de cette source. En Chine, la contribution de la combustion du fuel était à 12,3 % de la concentration en $PM_{2,5}$ entre 2005 et 2009, mais a légèrement augmenté pour atteindre 15,0 % après 2010 (Zhu *et al.*, 2018). Dans les zones côtières européennes, les émissions liées au trafic maritime contribuent de 1 à 7 % au niveau des PM_{10}, de 14 % au niveau des $PM_{2,5}$, et de 11 % au niveau des PM_1 (Viana *et al.*, 2014).

Enfin, le trafic aérien est une source importante de PM, comme le montrent les études sur les émissions des moteurs des avions (Vander Wal, Bryg and Huang, 2014), et les mesures réalisées dans les aéroports et à proximité de ces derniers (Hudda *et al.*, 2014). Les émissions des particules des moteurs des avions contiennent de l'acide sulfurique, EC et OC, avec des émissions de PM allant de 10 à 550 mg/kg de carburant, en fonction du type de moteur, et des paramètres d'essai. Entre 40 et 80% de cette masse de PM est composée de matières volatiles (soufre et matières organiques) (Kinsey *et al.*, 2010). Hudda and Fruin, (2016) ont réussi à détecter des particules ultrafines (PUF) liées à l'aéroport à 18 km de l'aéroport international

de Los Angeles, LAX, tandis que Keuken et al., (2015) ont détecté des PUF liée à l'aéroport à plus de 40 km de l'aéroport d'Amsterdam Schiphol.

1.4.2.3. Chauffage domestique et combustion de biomasse

Plusieurs types de combustibles sont utilisés pour le chauffage domestique et engendrent lors de leur combustion l'émission de particules. La combustion de biomasse et de bois génère des gaz comme CO, CO_2, NO_x, CH_4, des composés organiques volatils et des PM (Seinfeld *et al.*, 2004). Parmi les composés organiques émis en phase particulaire, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont les composés préoccupants d'un point de vue sanitaire émis par ce type de sources. Selon Samburova et al., (2016) les facteurs d'émission des HAPs totaux dans l'état particulaire varient entre 1,9 ±0,4 et 3,0 ± 0,6 mg HAP.kg^{-1} de matière. Parmi la centaine de composés HAP et dérivés de HAPs analysés dans cette étude, la part des 16 HAPs prioritaires selon l'USEPA représente 22,1 ± 6,2% de la masse des HAPs dans l'état particulaire. D'autres composés organiques, comme le levoglucosan, le galactosan, et le mannosan sont formés lors de la décomposition de la cellulose, et sont utilisés comme des marqueurs de la combustion de la biomasse (Simoneit *et al.*, 1999). Durant l'hiver, une forte corrélation existe entre les taux de levoglucosan ($C_6H_{10}O_5$), celui de CO et les émissions liées à la combustion de biomasse (Golly *et al.*, 2019). Une étude récente sur les PM_{10} en Italie, dans un site urbano-industriel, a montré que les composés organiques hydrosolubles (WSOC), Cd, Cs, K, Rb et Tl étaient fortement corrélées avec la variabilité spatiale de la concentration de levoglucosan (Massimi, Simonetti, *et al.*, 2020). Le potassium est considéré aussi comme un marqueur possible de cette source (Pachon *et al.*, 2013). Grâce au suivi de tels traceurs en se basant sur 89 études réalisées, il a pu être estimé que la contribution relative de la combustion de biomasse atteignait en moyenne 15 % de la concentration de $PM_{2,5}$ en Europe (Belis *et al.*, 2013). La concentration moyenne annuelle des PM_{10} provenant du chauffage au bois était de 1,1 µg/m^3 à Londres (Fuller *et al.*, 2014).

La combustion du fuel lié au chauffage domestique a contribué à 20% des émissions des $PM_{2,5}$ entre 1990 et 2014 au niveau mondial (Karagulian *et al.*, 2015).

Le chauffage par le gaz naturel est une source non renouvelable, qui génère des quantités des SO_2 et NOx plus faibles que les autres combustibles fossiles.

Le charbon reste un combustible utilisé pour le chauffage résidentiel notamment en Europe, en Asie et aux Etats-Unis. Outre l'émission de NOx et de SO_2, la combustion de charbon est émettrice de particules, renfermant notamment de l'arsenic, du mercure, du cadmium, du plomb, zinc, vanadium et du sélénium (Chafe *et al.*, 2015).

Pour une amélioration des émissions due au chauffage, il a été proposé par Winijkul and Bond, (2016) d'utiliser le chauffage électrique au lieu du fuel domestique, du charbon, du bois. Ce passage aux carburants «plus propres» entraîne une réduction globale de 24 % des PM. Les émissions de CO_2 changent presque autant, le CO et les hydrocarbures non méthaniques sont réduits de 32 % et 20 % respectivement (Winijkul and Bond, 2016).

1.4.2.4. Industries

Les PM issues des émissions industrielles diffèrent selon le type d'activité.

L'activité sidérurgique représente l'un des plus grands émetteurs de particules d'origine industrielle, avec, par exemple, l'émission de 460 g de particules par tonne d'acier produite au niveau d'un site sidérurgique intégré (Hleis *et al.*, 2013). Les industries de production d'acier émettent des fortes concentrations de Ag, Al, As, Ca, Cd, Fe, Mn, Pb, and Rb. Ces éléments ont été proposés dans une étude précédente comme traceurs des émissions de ces industries (Hleis *et al.*, 2013). Une étude sur les concentrations des éléments trace dans les $PM_{2,5}$ et PM_{10}, a montré que les niveaux élevés d'As, Bi, Ga et Cu, sont liés à la métallurgie du cuivre. La métallurgie du zinc est caractérisée par des niveaux élevés de Zn et de Cd (Querol *et al.*, 2007). Dans une industrie sidérurgique en Chine, les ratios OC/EC des PM étaient plus élevés dans la fraction fine, indiquant que la plupart des composés organiques secondaires étaient majoritairement dans cette fraction granulométrique (Jia *et al.*, 2018). Une contribution importante des HAP est également observée les émissions des cokeries, des unités d'agglomération de minerais, et des hauts fourneaux (Sylvestre *et al.*, 2017).

La production de céramique émaillée est liée à des niveaux élevés de Zn, As, Se, Zr, Cs, Tl, Li, Co et Pb dans les émissions particulaires (Querol *et al.*, 2007). L'analyse morphologique des PM_{10} et TSP prélevées dans un complexe d'industries de céramiques au Brésil, a montré des particules typiques de la combustion, comme le carbone suie, EC et OC. Les principaux éléments identifiés sont Ba, Zn, Al, K et Ca (Silva *et al.*, 2019).

Les industries de production d'énergie utilisent différentes familles de combustibles (nucléaire, charbon, fuel, gaz) plus ou moins responsables d'un impact sur la qualité de l'air. La combustion du charbon entraine l'émission de mercure, de plomb, de cadmium, ou encore d'arsenic, présents comme impureté dans le combustible (C. Wang *et al.*, 2018).

Les industries pétrochimiques émettent à la fois des particules et des composés gazeux (COV et HAP) qui contribuent à la formation des aérosols organiques secondaires (AOS). Les COV émis comprennent principalement l'éthylène, l'éthane, le 2-méthylpentane, chloroforme, 2,3-diméthylbutane et propane. Une étude en Chine a montré que l'isoprène contribue le plus à la formation des AOS (Han *et al.*, 2018). L'oxydation de ce composé peut générer le glyoxal, le méthylglyoxal, le glycoladehyde et hydroxyacétone qui peuvent se trouver dans la phase particulaire (Carlton, Wiedinmyer and Kroll, 2009). Ce type d'industries émet également des concentrations élevées de Ni, V et, de Ba (Manno, Varrica and Dongarrà, 2006).

1.5. Règlementations et recommandations

Les premières réglementations sur la qualité de l'air sont apparues en 1956 au Royaume Uni, avec le « clean air act », à la suite du smog de Londres de 1952. Cet acte a eu pour but la réduction de la pollution atmosphérique, en engageant un mouvement pour l'utilisation de combustibles sans fumée, et en réduisant la pollution par le dioxyde de soufre provenant des combustions domestiques.

Aux Etats-Unis, il y a eu création de « Air Quality Act » en 1967, pour faire face aux problèmes de pollution atmosphérique au niveau régional. Son but était de réagir au niveau du gouvernement et industriel également. Cet acte autorisa les études élargies, notamment celles qui portent sur l'inventaire des émissions de polluants et celles faisant appel aux méthodes de surveillance de la qualité de l'air.

En Chine, la qualité de l'air ambiant est réglementée depuis 1982, lorsque des limites ont été fixées pour les particules totales en suspension, le SO_2, le NO_2, le plomb et le benzo (a) pyrène. En février 2012, la Chine a publié une nouvelle norme de qualité de l'air ambiant, qui fixe pour la première fois des limites pour les $PM_{2,5}$.

L'un des premiers accords entre Etats de l'Union Européenne remonte à 1979 avec la signature de la convention de Genève sur la pollution atmosphérique transfrontière à longue

distance, dans laquelle, les Etats adhérents se sont engagés à réduire progressivement les rejets de polluants atmosphériques. Elle a été suivie de la directive 96/62/CE du 27 septembre 1996, qui avait comme objectif de définir les principes d'une stratégie commune visant à définir et fixer des objectifs concernant la qualité de l'air ambiant dans les Etats membres. Elle visait aussi à y évaluer la qualité de l'air ambiant sur la base de méthodes et de critères communs. Elle prévoyait par ailleurs une information du public si des seuils d'alerte sont atteints.

En France, la réglementation de la qualité de l'air a été concrétisée en 1996 avec la Loi sur l'Air et l'Utilisation Rationnelle de l'Energie (LAURE). En termes de valeurs de concentration limite de composés polluants dans l'air ambiant, les Etats de l'Union dont la France, suivent les Directives européennes, et les transcrivent dans le droit national. Ainsi, les particules en suspension PM_{10} font l'objet d'une réglementation concernant les teneurs journalières et annuelles depuis 1999. La directive 1999/30/CE du 22 avril 1999 a fixé des concentrations limites. Cette directive a été plusieurs fois amendée et depuis 2008 (directive 2008/50/CE), la valeur limite moyenne annuelle est de 40 $\mu g.m^{-3}$, tandis que la valeur limite moyenne journalière est de 50 $\mu g.m^{-3}$ avec 35 jours de dépassements autorisés sur l'année.

Dans la même directive européenne, les $PM_{2,5}$ font également l'objet d'une réglementation, qui a été transposée en droit français en 2010 (décret n° 2010-1250 du 21 octobre 2010, qui transpose la directive 2008/50/CE du 21 mai 2008). Ainsi, l'objectif de qualité, correspondant au niveau à atteindre à long terme afin d'assurer une protection efficace de la santé humaine et de l'environnement dans son ensemble, est fixé à 10 $\mu g.m^{-3}$ en moyenne annuelle. Par ailleurs, la valeur cible est fixée à 20 $\mu g.m^{-3}$ à partir de 2015, tandis que la valeur limite a progressivement été abaissée de 30 $\mu g.m^{-3}$ en 2008 pour atteindre 25 $\mu g.m^{-3}$ en 2015 (Tableau I-1).

Concernant les recommandations de l'OMS sur la qualité de l'air, le Bureau régional pour l'Europe a publié le premier ensemble de «Air Quality Guidelines for Europe» sur 28 polluants atmosphériques en 1987. Ces lignes directrices ont été mises à jour en 2005. En 2015, l'OMS a lancé un processus pour mettre à jour les recommandations pour la qualité de l'air des polluants suivants: $PM_{2,5}$, PM_{10}, l'ozone, le dioxyde d'azote, le dioxyde de soufre, et le monoxyde de carbone. Malgré les preuves scientifiques des effets graves de la pollution de l'air sur la santé, les normes varient considérablement d'un pays à l'autre. La Figure I-3 présente les différences entre les pays, vis-à-vis des valeurs limites annuelles de la concentration ambiante des PM_{10}.

Tableau I-1: Valeurs cibles, limites et objectifs de qualité (en µg.m^{-3}) concernant les concentrations en particules en suspension PM_{10} et $PM_{2,5}$ imposées par l'Union Européenne (trois première colonnes) et objectifs de qualité de l'OMS

	Valeur limite	Valeur cible annuelle	Objectif de qualité annuel	OMS : Objectif de qualité
PM_{10}	Moyenne annuelle : 40 Moyenne journalière : 50 (35 jours max par an)		30	Moyenne annuelle : 20 Moyenne journalière : 50
$PM_{2,5}$	Moyenne annuelle : 25	20	10	Moyenne annuelle : 10 Moyenne journalière : 20

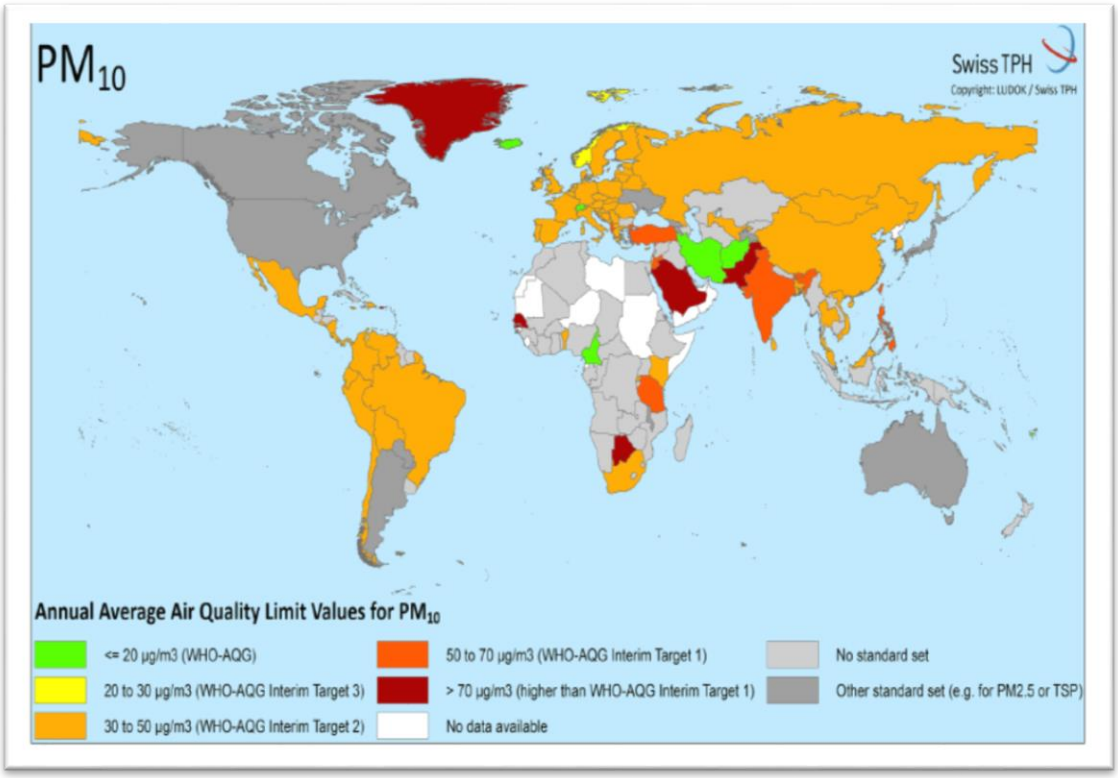


Figure I-3: Valeurs limites annuelles sur la concentration ambiante des PM_{10} dans différents pays (Kutlar Joss et al, 2017)

Cette figure montre que 6 pays (Afghanistan, Cameroun, Fidji, Islande, Iran et Suisse), adoptent la valeur limite annuelle de la concentration en PM_{10} (20 µg/m^3), recommandée par l'OMS. Les autres pays ont fixé des valeurs surtout entre 30 et 50 µg/m^3, et allant jusqu'à 120 µg/m^3. Quant à la valeur limite journalière de la concentration en PM_{10}

recommandée par l'OMS (50 µg/m^3), elle est adoptée par 47 pays. Certains pays (Burkina Faso, Botswana, Bénin, Sénégal, Ouzbékistan et Arabie saoudite) ont fixé des seuils supérieurs à 150 µg/m^3. D'autres ne règlementent pas du tout les PM_{10} (Australie, Canada, Japon, Malawi, Paraguay, Singapour et États-Unis). En ce qui concerne la valeur limite annuelle de la concentration en $PM_{2,5}$, 62 pays adoptent une limite d'environ 25 µg/m^3, soit une valeur supérieure à la recommandation de l'OMS (10 µg/m^3). Cette dernière est adoptée par quatre pays (Afghanistan, Cameroun, Canada et Iran). Seulement deux pays adoptent une valeur limite inférieure à celle de l'OMS (Australie et Malawi (8 µg/m^3)) (Kutlar Joss *et al.*, 2017).

2. Impact des PM sur la santé

2.1. Pollution atmosphérique et santé publique

La pollution de l'air est le quatrième facteur de risque de mortalité dans le monde. En 2017, la pollution atmosphérique a abouti à la mort de 7 millions de personnes (WHO, 2018). En 2016, l'Agence Européenne de l'Environnement estime à 412 000 le nombre de décès prématurés causés par les particules pour l'Europe. En France, 33200 décès prématurés ont été associés aux $PM_{2,5}$ en 2016 (EEA, 2019). La pollution atmosphérique ainsi que les particules fines, ont été classées comme cancérogène avéré pour l'Homme (classe I), par le Centre International de Recherche sur le Cancer (OMS, Communiqué de presse N°221, 17/10/2013). L'effet de la pollution atmosphérique sur la santé de l'Homme est fonction de plusieurs paramètres tels que la nature et la concentration du polluant dans l'air, la durée d'exposition, l'âge et la santé de la personne exposée. Une étude réalisée à partir d'une cohorte de 60 millions de personnes aux Etats Unis a montré qu'une augmentation de la concentration en $PM_{2.5}$ de 10 µg/m^3, était associée à une augmentation de la mortalité de 7,3% (Di *et al.*, 2017). Karimi and Shokrinezhad, (2020) se sont intéressés aux effets de la pollution de l'air par des composés gazeux (CO, NO_2, SO_2 et O_3) et PM, sur la mortalité des enfants ayant moins de 5 ans, entre 1992 et 2018 dans le monde. Il a été conclu que l'augmentation de la concentration des $PM_{2,5}$ et PM_{10} de 10 µg/m^3 était liée à une augmentation de 3,4 % et 2,5 % de la mortalité des enfants, respectivement. Pour les gaz CO,

NO_2, SO_2 et O_3, une augmentation de 1 partie par million (ppm) est associée à une augmentation de 3,1 % de mortalité.

En Europe, l'étude de grande ampleur « Aphekom » menée dans 25 villes européennes, comprenant 39 millions d'habitants, a permis de conclure sur les bénéfices tirés d'une diminution de 10 µg/m^3 de la concentration en particules et de ses effets à long terme. Elle a conclu à la possibilité d'un gain en espérance de vie de 22 mois chez l'adulte de 30 ans et plus, avec des variantes d'une ville à l'autre selon le niveau de concentration moyen de $PM_{2,5}$. Autrement dit, le non-respect des recommandations de l'OMS sur le niveau de $PM_{2,5}$ aurait pour conséquence 19000 décès prématurés, dont environ 15000 seraient causées par des maladies cardiovasculaires (Wothe (Henschel) *et al.*, 2011).

Lelieveld et al., (2020) ont utilisé un modèle pour calculer la perte d'espérance de vie due à la pollution par les $PM_{2,5}$ et par l'ozone au niveau mondial, en 2015. Les résultats ont montré que les valeurs dépassent celles de la cigarette, avec une perte de 2,9 années.

Fischer et al., (2020) se sont intéressés à la relation entre la mortalité et les sources de PM (trafic routier, industrie, navigation, trafic non routier, fours, agriculture, autres sources intérieures, autres sources). Cette étude a été menée sur 7,5 millions d'adultes, entre 2008 et 2015 aux Pays-Bas. Les PM provenant de six de ces huit sources, étaient associées à une mortalité non accidentelle, à l'exception de la source industrielle et agricole, cette dernière étant inversement associée à la mortalité. Les résultats ont également montré qu'une augmentation de la concentration des particules primaires et des aérosols inorganiques secondaires de 1 µg/m^3, augmentait le risque de mortalité de 1 à 2 %. Les PM_{10} et $PM_{2,5}$ primaires provenant du transport maritime affichent les ratios de danger (mortalité) les plus élevés (Fischer *et al.*, 2020), devant les autres moyens de transport, les émissions industrielles et celles liée à l'agriculture.

Une étude récente au Royaume Uni, a examiné l'effet de O_3 et $PM_{2,5}$ sur la mortalité, au cours de deux épisodes de pollution atmosphérique de cinq jours, en 2006. La mortalité totale estimée, à la suite d'une exposition à court terme à la concentration maximale journalière de O_3 (8h), a été similaire lors des 2 épisodes étudiés, avec environ 70 décès quotidiens (Fenech *et al.*, 2019).

2.2. Déposition des PM le long de l'appareil respiratoire

Les principales voies d'entrée des particules dans l'organisme sont la bouche et le nez, que chaque être humain sollicite sans cesse pour la respiration. L'appareil respiratoire peut être divisé en deux parties, considérées comme des unités de filtration (Figure I-4) :

- La première partie constitue la région extra thoracique comprenant le nez, la bouche, le pharynx et le larynx. L'épithélium nasal assure le réchauffement et l'humidification de l'air inspiré et constitue le premier filtre pour une grande partie des particules, dont le Dae est supérieur à 5 µm.

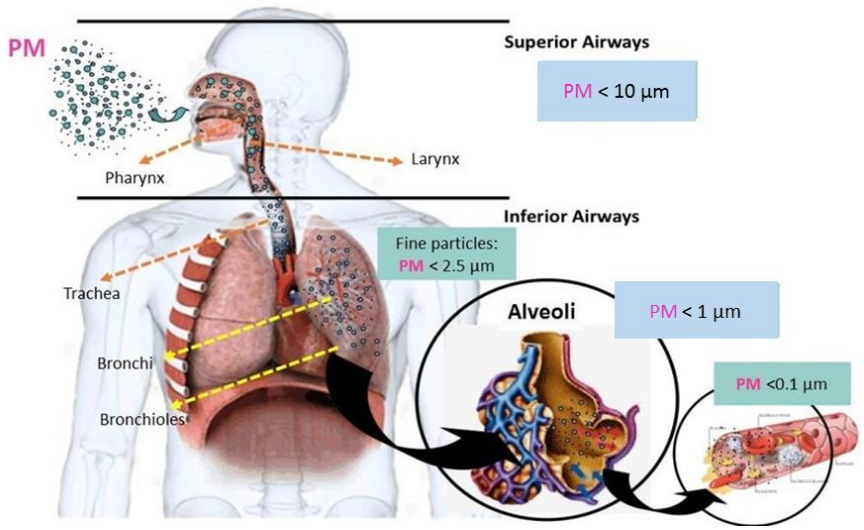


Figure I-4: Déposition des PM dans l'appareil respiratoire selon leur taille (Barraza, 2017).

- La deuxième partie constitue les voies aériennes inférieures (intra-thoraciques), comprenant la trachée, les bronches, les bronchioles et les alvéoles pulmonaires. Elles présentent plus précisément deux zones. La première représente la zone de conduction qui comprend la trachée, les bronches et les bronchioles. La seconde correspond à la zone respiratoire, où se produisent l'arrivée de l'air inspiré au niveau des bronchioles respiratoires et les échanges avec la circulation sanguine dans les alvéoles. Dans cette zone respiratoire, on dénombre des millions de sacs alvéolaires qui représentent une surface d'environ 80 m^2, en contact avec les 15 m^3 d'air inspirés en moyenne chaque jour par un individu adulte.

L'importance de cette surface fait de l'appareil respiratoire la cible principale des polluants présents dans l'air.

Suite à leur inhalation, certaines particules vont se déposer sur les surfaces de l'appareil respiratoire. En général, les particules avec les Dae les plus grands vont être retenues au niveau des voies aériennes supérieures, et plus le Dae est petit, plus les particules vont pénétrer en profondeur dans l'appareil respiratoire.

Les PM se déposent dans l'appareil respiratoire selon trois mécanismes physiques : la diffusion, la sédimentation et l'impaction.

La diffusion : les PM dont le Dae est inférieur à 500 nm pénètrent surtout par diffusion. Ils se comportent comme des molécules de gaz diffusantes, et peuvent avoir un temps de séjour long. Plus le Dae de la particule est faible, plus la distance parcourue par la diffusion augmente, plus la probabilité que les PM se déposent sur les surfaces des voies respiratoires est grande.

La sédimentation : elle concerne surtout les particules dont le Dae est supérieur à 500 nm et ce phénomène concerne les particules soumises à l'action de la gravité. La distance à laquelle une particule se dépose dans un temps donné augmente avec sa masse, donc avec sa densité et /ou son diamètre.

L'impaction : ce processus repose sur l'inertie des particules, et dépend du diamètre des PM, de leur densité et de la vitesse du flux d'air (Figure I-5).

Selon ces mécanismes, les particules se déposent différemment dans les principales régions des voies respiratoires en fonction de leur taille. Environ 95% des PM dont le Dae est supérieur à 10 µm sont captés au niveau du nez, puis évacués.

Les particules dont le Dae est compris entre 2,5 et 10 µm ($PM_{2,5-10}$) continuent leur chemin et sont retenues principalement au niveau de l'arbre trachéo-bronchique, et sont éliminés par clairance mucocilière.

Environ 20% des $PM_{0,1-2,5}$ sont capables d'échapper à ces barrières, et parviennent à pénétrer jusqu'aux alvéoles pulmonaires. Leur élimination se fait alors par clairance macrophagique, qui est un processus lent, ce qui explique un temps de résidence pouvant atteindre plusieurs semaines (Marano, 2007).

Enfin, les $PM_{0,1}$ se répartissent tout le long de l'arbre respiratoire et adoptent un comportement de plus en plus proche de celui des gaz avec la diminution de leur diamètre, conduisant à une augmentation du taux de déposition au niveau extra-thoracique. Concernant les PM solubles dans les fluides respiratoires, l'absorption systémique peut être relativement complète pour tous les modèles de dépôt, et il peut y avoir une toxicité locale. Les particules hydrosolubles subissent des modifications au niveau de leur taille dans les milieux humides, tandis que les petites particules insolubles s'agglomèrent fréquemment (Gualtieri *et al.*, 2017). Après inhalation et une fois dans le sang, les PM peuvent toucher différents organes tels que le cœur, le cerveau et les poumons, et peuvent induire des modifications biologiques, et l'apparition de différentes formes de pathologies au niveau du cœur, sang, poumons, et autres organes (Figure I-6).

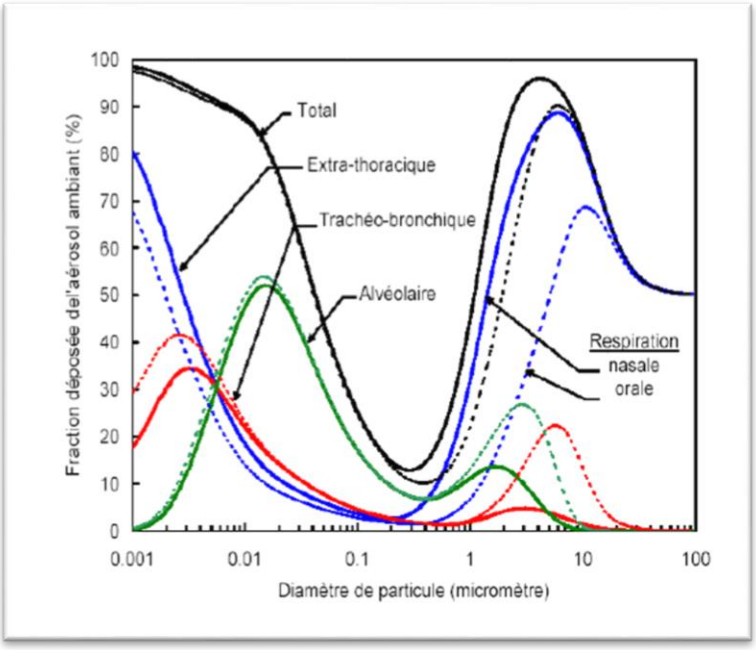


Figure I-5: Prédiction des zones de dépôt des particules dans l'appareil respiratoire en fonction de la taille des particules (Source IRSST 2006).

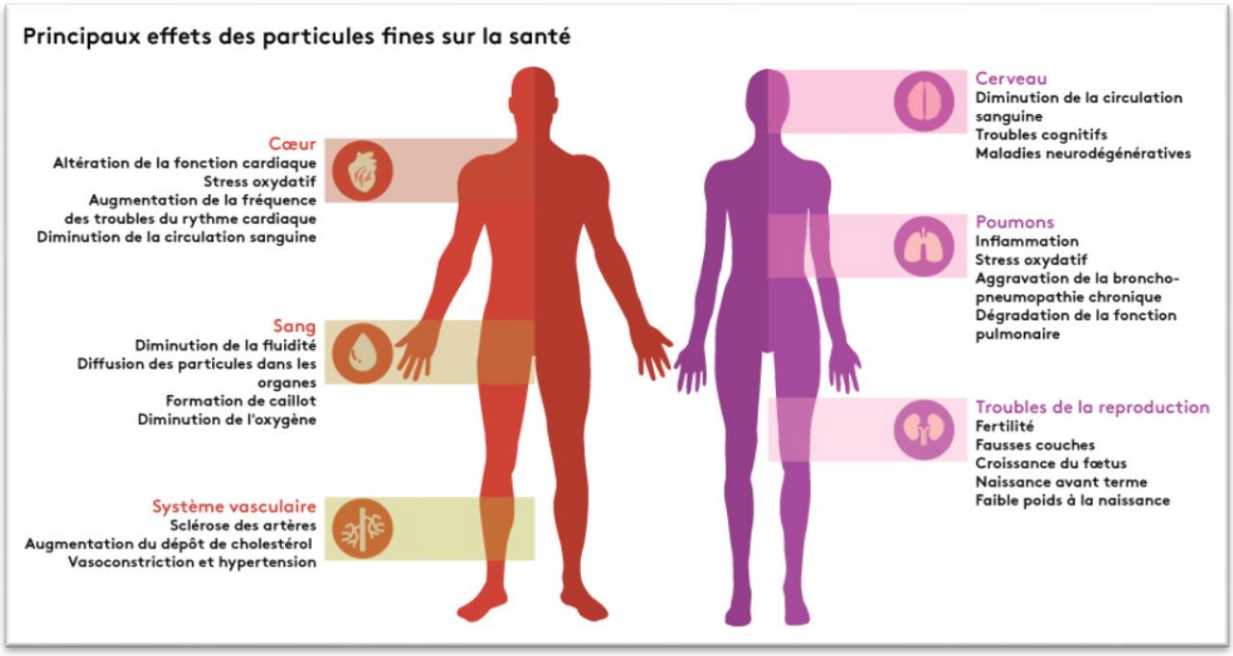


Figure I-6: Principaux effets des particules fines sur la santé (INVS, 2018).

2.3. Pathologies

L'exposition à la pollution atmosphérique est désormais bien reconnue en tant que problème majeur de santé publique. Au cours de ces dernières décennies, plusieurs études épidémiologiques à court et à long termes, des études cliniques et des suivis de données physiopathologiques, ont été menées pour mieux comprendre les effets de la pollution atmosphérique sur la santé humaine. La corrélation entre l'élévation de concentrations ambiantes des PM, et l'augmentation du taux de la mortalité, et des pathologies comme le cancer du poumon et les maladies cardiovasculaires, a été largement étudiée. Cette sous-partie porte sur une présentation des principales pathologies connues et potentiellement causées par une exposition aux PM.

2.3.1. Maladies cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires regroupent l'ensemble des maladies du cœur et des vaisseaux sanguins. Elles concernent le muscle cardiaque, l'aorte, les artères, les valves, les vaisseaux cérébraux et ceux des membres inférieurs. Plusieurs études épidémiologiques ont

trouvé que l'exposition à la pollution atmosphérique à long et à court terme augmentait la mortalité cardiovasculaire, par une augmentation des infarctus du myocarde, des accidents vasculaires cérébraux et des insuffisances cardiaques. Bien que le risque cardiovasculaire augmente avec le niveau et la durée de l'exposition, toutes les études ont conclu qu'il n'y a pas de seuil de sécurité en dessous duquel il n'y a pas d'effet (Bourdrel *et al.*, 2017). Yang et al., (2019) ont trouvé que l'exposition à long terme aux PM_1 était associée à une probabilité plus élevée de maladies cardiovasculaires. Feigin et al., (2016) ont démontré que la pollution de l'air a contribué à 33,4 % du nombre des accidents vasculaires cérébraux (AVC), entre 1990 et 2013, dans 188 pays. Scheers et al., (2015) ont identifié 20 études menées sur un total de plus de 10 millions de personnes, en Amérique du nord, Europe, et Asie, portant sur la relation entre l'exposition à long terme aux particules, et les AVC, ou la mortalité par AVC. Pour l'exposition aux PM_{10}, le rapport de risque combiné pour chaque augmentation de 10 $\mu g/m^3$ était de 1,061 et de 1,080 pour les AVC, et pour la mortalité par AVC, respectivement. Compte tenu de l'exposition aux $PM_{2,5}$, les ratios de risque pour une augmentation de 5 $\mu g/m^3$ étaient de 1,064 et 1,125 pour les AVC et la mortalité, respectivement. Le projet européen des cohortes pour les effets de la pollution atmosphérique (ESCAPE), a étudié l'effet de l'exposition à long terme aux polluants atmosphériques, sur l'incidence des événements coronariens aigus dans 11 cohortes (en Finlande, Suède, Danemark, Allemagne et en Italie). L'étude comprenait 100 166 personnes, entre 1997 et 2007. Les résultats ont montré qu'une augmentation de 5 $\mu g/m^3$ de la moyenne annuelle des $PM_{2,5}$, et de 10 $\mu g/m^3$ de la moyenne annuelle des PM_{10}, était associée à une augmentation de 13 % et 12 % du risque d'événements coronariens, respectivement (Cesaroni *et al.*, 2014). Une étude réalisée au niveau de 15 agglomérations en Angleterre et au Pays de Galles, entre 2003 et 2006, a conclu qu'une augmentation de la concentration en PM_{10} (de 10 $\mu g/m^3$ à très court terme), augmente le risque d'infarctus du myocarde dans les six heures qui suivent l'exposition. Ensuite, ce risque diminue et s'annule au-delà de 72 heures, ce qui est justifié par le fait que la pollution atmosphérique agit notamment en précipitant la survenue d'un événement cardio-vasculaire (Bhaskaran *et al.*, 2011).

2.3.2. Maladies respiratoires

Les maladies respiratoires touchent les voies aériennes, y compris les voies nasales, les bronches et les poumons. Elles vont d'infections aiguës comme la pneumonie et la

bronchite à des affections chroniques telles que l'asthme et la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO).

La bronchopneumopathie chronique obstructive (ou BPCO) et l'asthme sont deux maladies inflammatoires des bronches. La BPCO est une maladie chronique qui se caractérise par un rétrécissement progressif et une obstruction permanente des voies aériennes et des poumons, entrainant une gêne respiratoire. L'asthme se manifeste par une constriction des voies respiratoires, entrainant des difficultés à respirer, parfois occasionnée par une composante allergique. L'asthme est la maladie respiratoire chronique la plus répandue dans le monde : elle touche environ 340 millions de personnes sa prévalence a augmenté de 17,2 % entre 2006 et 2016 (Havet, 2018). La BPCO toucherait quant à elle près de 65 millions de personnes dans le monde, sous une forme modérée à sévère, selon l'OMS.

Une étude récente en Chine a évalué la relation entre les concentrations journalières des PM et les entrées à l'hôpital en lien avec une maladie respiratoire. Les résultats ont montré que les visites à l'hôpital pour des maladies respiratoires, associées à une augmentation de 10 µg/m^3 de la concentration moyenne cumulée sur 6 jours des $PM_{2,5}$ et $PM_{2,5–10}$, étaient accrues de 5,4 et de 6,4%, respectivement. Ces deux polluants ont été associés à l'augmentation des visites pour l'infection aiguë des voies respiratoires supérieures, la pneumonie, l'asthme, et la BPCO (Zhang *et al.*, 2019). Khreis et al., (2017) ont examiné l'association entre l'exposition des enfants (0-18 ans) à la pollution de l'air due au trafic, et le risque d'incidence de l'asthme ou de prévalence tout au long de la vie. Les résultats ont montré des associations positives et statistiquement significatives entre l'apparition de l'asthme et l'exposition aux $PM_{2,5}$ et PM_{10}. Hendryx et al., (2019) ont analysé les données de cohorte sur des femmes, suivies pour 21 ans pour la BPCO et l'asthme en Australie. Les nouveaux cas de BPCO étaient à 11,5 % et les nouveaux cas d'asthme étaient à 9,4%. Modélisés séparément, les $PM_{2,5}$ et les PM_{10} étaient significativement associés au risque de BPCO, mais n'étaient pas significativement associés à l'apparition de l'asthme chez les femmes

2.3.3. Cancer

Malgré l'hétérogénéité concernant les niveaux et sources de pollution dans le monde, le lien entre l'exposition aux polluants atmosphériques et l'apparition des cancers reste avéré

dans tous les continents. Plusieurs études ont trouvé que l'exposition aux PM était liée au cancer du poumon, de cancer du sein, cancer gastrique, du rein ou encore de la vessie.

Cancer du poumon : l'étude européenne des cohortes pour les effets de la pollution atmosphérique (ESCAPE), a utilisé les données de 17 études de cohorte basées dans neuf pays européens, pour étudier l'effet des PM sur le cancer du poumon. Au cours du suivi (moyenne de 12,8 ans), 2095 cas de cancer du poumon ont été diagnostiqués. Une association statistiquement significative est trouvée entre le risque de cancer du poumon et les PM_{10} (rapport de risque (HR)=1,22 pour une concentration de 10 $\mu g/m^3$), et les $PM_{2,5}$, (HR=1,18 pour une concentration de 5 $\mu g/m^3$). Les mêmes augmentations de PM_{10} et de $PM_{2,5}$ ont été associées à des HR de 1,51 et 1,55, respectivement, pour les adénocarcinomes du poumon (Raaschou-Nielsen *et al.*, 2013). Au Canada, en 2015, 6,9 % de cas de cancer du poumon étaient attribués à l'exposition aux $PM_{2,5}$ (Gogna *et al.*, 2019). Weichenthal et al., (2017) ont réalisé une étude au Canada sur 1,1 million d'adultes, entre 1996 et 2012, sur l'effet de l'exposition à long terme aux particules ultrafines, et l'apparition de plusieurs maladies, parmi lesquelles le cancer de poumon. Les résultats ont montré que ces PM n'étaient pas associés à une incidence de cancer du poumon, malgré la présence des émissions des véhicules diesel, qui sont une source importante de PM ultrafine en milieu urbain, et connues comme cancérigène (Benbrahim-Tallaa *et al.*, 2012). L'hypothèse émise était que la condensation ou l'agglomération rapide de ces PM en particules plus grosses, a tendance à concentrer les composés cancérigènes en PM de plus grande taille (Weichenthal *et al.*, 2017).

Cancer de l'appareil digestif et urinaire : la pollution de l'air affecte principalement les cancers gastriques par le biais de particules en suspension, qui peuvent être directement inhalées et pénétrer dans l'estomac. L'étude européenne des cohortes pour les effets de la pollution atmosphérique (ESCAPE) a trouvé une corrélation positive entre les $PM_{2,5}$ et l'incidence des cancers gastriques dans 11 cohortes européennes. L'augmentation de la concentration en $PM_{2,5}$ de 5 $\mu g/m^3$ augmente le risque de cancer gastrique de 38% (Nagel *et al.*, 2018). L'étude de prévention du cancer II (CPS-II) a examiné la relation entre la pollution de l'air ambiant avec la mort due aux cancers (sauf cancer du poumon), pour 623 048 participants de 1982 à 2004. Les résultats ont montré que les $PM_{2,5}$ était significativement associés aux décès par cancer du rein (HR = 1,14) pour une concentration de 4,4 $\mu g/m^3$, et pour le cancer de la vessie (HR = 1,13) (Turner *et al.*, 2017).

2.3.4. Autres maladies et effets des PM

D'autres maladies et effets sur la santé ont également été liées à une exposition aux PM, telles que le retard de développement psychomoteur de l'enfant, le diabète, certaines maladies auto immunes, l'ostéoporose et les fractures osseuses consécutives, des conjonctivites, la blépharite, des pathologies inflammatoires de l'intestin, l'acné et le vieillissement cutané (Schraufnagel *et al.*, 2019).

Effet sur le système nerveux : des études épidémiologiques suggèrent des associations entre l'exposition prénatale ou postnatale aux polluants atmosphériques et les symptômes du trouble du déficit de l'attention avec ou sans hyperactivité (TDAH). La connaissance sur les mécanismes d'action des particules pendant le développement précoce du cerveau, et la relation avec le TDAH reste limité (Myhre *et al.*, 2018). Une revue sur l'effet de la pollution atmosphérique sur le déclenchement de l'autisme a conclu que l'exposition croissante aux $PM_{2,5}$ et au PM_{10}, surtout pendant la période prénatale, a été associée à un risque croissant d'autisme (Lam *et al.*, 2016). Les affections du système nerveux se manifestent également par des troubles de la mémoire, les troubles du sommeil, la colère, la fatigue, les tremblements, la vision floue et des troubles articulaires.

Effet sur les os : des études ont été menées sur 9,2 millions de personnes, concernant les niveaux à long terme de $PM_{2,5}$ et les admissions à l'hôpital, dues aux fractures liées à l'ostéoporose aux États-Unis entre 2003 et 2010. Les résultats ont montré que le risque d'admission pour fracture osseuse liée à l'ostéoporose était plus élevé dans les zones où les niveaux de $PM_{2,5}$ étaient plus élevés (Prada *et al.*, 2017).

Maladies auto-immune : la relation entre les PM et cette catégorie de maladie est très peu étudiée. Une étude au Canada, utilisant des données sur les concentrations moyennes des $PM_{2,5}$ entre 2006 et 2011, a trouvé une relation entre l'augmentation de la concentration de ces derniers, et l'augmentation du risque des maladies rhumatismales auto-immunes systémiques surtout pour les femmes, et notamment celles de plus de 45 ans (Bernatsky *et al.*, 2016).

Effets sur la peau : bien qu'il n'y ait pas de preuve directe que les PM peuvent pénétrer dans la peau, il est rapporté que les particules peuvent pénétrer la peau à travers les follicules pileux en fonction de leur taille (Lademann *et al.*, 2004). Kim et al., (2016) dans leur revue sur la pollution de l'air et ses effets sur la peau, ont conclu à partir de plusieurs études que les particules ultrafines, $PM_{2,5}$ et les PM_{10} peuvent affecter la progression et l'intensification des symptômes des maladies cutanées inflammatoires, telles que la dermatite atopique, l'acné et le psoriasis.

Effets sur les yeux : une étude sur l'effet des PM_{10} sur l'intensification de la blépharite a été menée sur 200 personnes au Brésil en 2008. Les résultats ont montré qu'une augmentation de 28,8 µg/m^3 de la concentration en PM_{10} a provoqué une augmentation du nombre de cas de débris de paupières le même jour de l'examen clinique (Malerbi *et al.*, 2012).

Effets sur la fertilité : Xue and Zhang, (2018) dans leur étude sur l'effet des $PM_{2,5}$ sur la fertilité entre 2009 et 2010, ont révélé une réduction de 2% du taux de fertilité suite à une augmentation de 10 µg/m^3 des niveaux de $PM_{2,5}$. Une étude rétrospective a été menée en Chine, pour étudier l'association entre les $PM_{2,5}$ et les paramètres de qualité du sperme, pour 4841 échantillons de sperme collecté entre 2013 et 2018. La concentration moyenne de PM_{10} sur 90 jours a montré une association négative significative avec la concentration des spermatozoïdes, et la concentration des spermatozoïdes motiles. L'augmentation de 1 µg/m^3 de PM_{10} est associée à une diminution de la concentration des spermatozoïdes de 0,13 x 10^6/mL et à une diminution de la concentration des spermes motiles de 0,094 x 10^6/mL (Qiu *et al.*, 2020).

2.4. Mécanismes de toxicité

Dans cette partie, certains mécanismes majeurs de l'impact toxicologique des PM seront présentés : la mort cellulaire, la génotoxicité et l'inflammation. Nous nous focaliserons ensuite sur le stress oxydant, étant largement décrit dans la littérature comme l'un des mécanismes clés des événements toxicologiques sous-jacents déclenchés dans la cellule après exposition aux PM, mécanisme qui sera largement étudié dans la suite de notre travail.

2.4.1. La mort cellulaire

La mort cellulaire peut être classée en fonction de son aspect morphologique (apoptotique, nécrotique, autophagique ou associée à la mitose), des critères enzymologiques (avec ou sans implication de nucléases ou de classes distinctes de protéases, telles que les caspases, les calpaïnes, les cathepsines et transglutaminases), les aspects fonctionnels (programmés ou accidentels, physiologiques ou pathologiques) ou les caractéristiques immunologiques (immunogènes ou non immunogènes) (Kroemer *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2014; Arnhold, 2020).

L'apoptose est une mort cellulaire programmée se résumant à une autodestruction des cellules sous l'impulsion d'un signal pro-apoptotique. Cette apoptose s'accompagne de l'arrondissement et la réduction du volume cellulaire, la rétraction des pseudopodes, la condensation de la chromatine, la fragmentation nucléaire, classiquement peu ou pas de modifications ultra-structurales des organites cytoplasmiques, de l'engloutissement par les phagocytes résidents. Plusieurs études récentes ont mis en évidence un lien entre ce mécanisme de mort cellulaire, et l'exposition des cellules pulmonaires BEAS-2B aux PM, certains métaux, ou encore le noir de carbone (Badran, Verdin, *et al.*, 2020; N. Jiang *et al.*, 2020; Cao *et al.*, 2021).

Contrairement à l'apoptose, la mort des cellules nécrotiques est une réponse aux lésions cellulaires et au stress sévère associés à la perte de l'intégrité de la membrane plasmique. Les produits cytoplasmiques sont libérés des cellules nécrotiques de l'espace extracellulaire, où ils pourraient endommager d'autres cellules et tissus. La nécrose des cellules est principalement déclenchée par des facteurs externes tels qu'un traumatisme, une infection, un stress osmotique ou mécanique, ou encore sous l'effet de toxines (Peixoto, de Oliveira Galvão and Batistuzzo de Medeiros, 2017).

L'autophagie est un processus lors duquel le cytoplasme de la cellule est dégradé par l'action de ses propres lysosomes. Elle est déclenchée par la nucléation de la membrane d'isolement et est caractérisée par la séquestration de matériel cytoplasmique dans les autophagosomes, pour une dégradation en masse par les lysosomes. L'autophagie est une

défense cellulaire majeure contre le stress oxydant et peut se manifester en réponse à une accumulation de protéines ou d'organites endommagés. La dérégulation de l'homéostasie redox dans des conditions pathologiques entraîne une génération excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), générant un stress oxydant et des dommages oxydatifs aux composants cellulaires. Il est avéré que l'autophagie est nécessaire pour maintenir l'homéostasie redox. Les ERO activent l'autophagie, qui facilite l'adaptation cellulaire et diminue les dommages oxydatifs en dégradant les macromolécules intracellulaires et organites endommagés (Ornatowski *et al.*, 2020).

La catastrophe mitotique est une forme de mort cellulaire associée à une entrée prématurée ou inappropriée de cellules en division. Le stress chimique ou physique peut induire une catastrophe mitotique. Ce type de mort cellulaire peut être déclenché par des agents affectant la stabilité des microtubules et divers médicaments anticancéreux agissant sur les points de contrôle du cycle cellulaire (Poon, 2016).

2.4.2. Génotoxicité

La génotoxicité est la capacité d'un agent chimique ou physique, tel que les PM, à réagir avec le matériel génétique d'un organisme, provoquant des modifications réversibles ou irréversibles dans sa structure, et aboutissant à l'altération des informations véhiculées par l'ADN dans les cellules. Platel et al., (2020) ont étudié le potentiel génotoxique des particules fines ($PM_{2,5\text{-}0,18}$) et quasi ultrafines ($PM_{0,18}$) prélevées d'une zone urbano-industrielle à Dunkerque (France), en utilisant des tests des comètes et, du micronoyau. L'évaluation in vitro a été réalisée avec 2 lignées de cellules pulmonaires immortalisées (BEAS-2B et NCI-H292) et des cellules épithéliales bronchiques primaires humaines (NHBE). Les résultats ont montré que les échantillons de PM avaient induit des dommages primaires à l'ADN. Lim et al., (2020) ont quant à eux mesuré l'activation de la signalisation des dommages à l'ADN dans cellules de carcinome hépatocellulaire humain (HepG2) exposées à des extraits organiques de PM_{10} prélevés à Stockholm (Suède). Les résultats ont mis en évidence un potentiel génotoxique des PM_{10}, même pour les échantillons de faible teneur en HAP. Çakmak et al., (2019) ont examiné la génotoxicité de 30 échantillons de $PM_{2,5}$ collectés sur différents sites et pendant différentes saisons dans la province de Kütahya (Turquie), en utilisant le test des

comètes, sur des cellules épithéliales alvéolaires humaines A549. Les résultats ont montré que la génotoxicité des $PM_{2,5}$ prélevées sur le site trafic-urbain était supérieure à celle prélevées sur le site rural, et était plus importante en hiver en milieu urbain et l'été sur le site rural. Bocchi et al., (2019) ont étudié la génotoxicité de la fraction hydrosoluble des $PM_{2,5}$ et PM_1 prélevés à Bologne (Italie), durant trois saisons (été, automne et hiver) sur une période de trois ans, en utilisant le test des comètes et le test du micronoyau, sur des cellules épithéliales alvéolaires humaines A549. Les résultats ont montré des ruptures de brins d'ADN pour les cellules exposées aux échantillons d'été et d'hiver, et des pertes chromosomiques pour les échantillons collectés en hiver. Il a également été montré que le fer et le cuivre étaient associés à l'induction de micronoyaux. Huang et al., (2020) ont quant à eux étudié sur des cellules A549 la génotoxicité des $PM_{2,5}$ prélevées en période hivernale en Chine, et ont trouvé une corrélation entre les métaux lourds et la génotoxicité mesurée par le test des comètes.

2.4.3. Inflammation

L'inflammation est un processus de réaction de l'organisme, (à une échelle cellulaire, tissulaire ou vasculaire) provoquée par une perturbation assimilable à une agression (virus, agent toxique, conflit immunologique). Il s'agit en général d'une fonction bénéfique normale de l'organisme, notamment activée contre les agents exogènes, comme les PM. Elle consiste en premier lieu à reconnaitre le pathogène par les macrophages, cellules épithéliales… Ces derniers expriment différents récepteurs associés à la membrane cellulaire, qui reconnaissent les pathogènes en se liant à des structures moléculaires spécifiques. La réponse inflammatoire implique l'interaction de nombreux médiateurs tels que les cytokines, qui sont des protéines de petit poids moléculaire. Ces cytokines sont sécrétées par les macrophages alvéolaires et par les cellules épithéliales pulmonaires, et sont soit des cytokines pro-inflammatoires capables d'induire le processus inflammatoire, ou des cytokines anti-inflammatoires, qui ont le rôle est de le réguler. Les interleukines (IL), qui sont des cytokines pro-inflammatoires, interviennent dans la phase aigüe de l'inflammation. Plusieurs études ont trouvé que les PM induisent la production des cytokines inflammatoires TNFα, IL-1β, IL-6, et IL-8 (Bai et al., 2019; Son et al., 2020; Wang et al., 2019; Dieme et al., 2012; Rönkkö et al., 2020). Une étude récente a étudié le potentiel inflammatoire des particules ($PM_{10-2,5}$, $PM_{2,5-0,1}$ et $PM_{0,1}$)

prélevées au sud de la mer de Salton (Etats-Unis) sur des macrophages. Les résultats ont montré que les $PM_{10-2,5}$ induisaient une réponse inflammatoire dans les macrophages mesurée par l'augmentation de l'expression des marqueurs inflammatoires IL-1ß, IL-6, IL-8 et CXCL2, tandis que les $PM_{2,5-0,1}$ et $PM_{0,1}$ n'ont démontré que des augmentations significatives de l'expression du CYP1A1. Ces observations ont été expliquées non seulement par les caractéristiques physiques des particules, notamment leur taille, mais également par les espèces chimiques retrouvées dans les différentes fractions granulométriques (D'Evelyn *et al.*, 2021).

2.4.4. Stress oxydant

2.4.4.1. Définitions et historique

Le stress oxydant se définit par un déséquilibre entre la production des Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) et les capacités cellulaires antioxydantes. En 1985, le concept de stress oxydant a été introduit en recherche dans le domaine de la biologie et de la médecine, dans le livre intitulé «Oxidative Stress» (Sies, 1985b). En 1986, Sies, (1986) rédigea une revue intitulée « Biochemistry of Oxidative Stress », portant sur les effets du stress oxydant sur les protéines, les lipides, l'ADN, et le système de défense antioxydant. Le stress oxydant a alors été défini comme «une perturbation de l'équilibre pro-oxydant/antioxydant en faveur du premier» (Sies, 1985a). Cette définition a été actualisée par la suite (Sies and Jones, 2007), pour devenir «un déséquilibre entre les oxydants et les antioxydants, en faveur des oxydants, conduisant à une perturbation de la signalisation et du contrôle redox et / ou à des dommages cellulaires et moléculaires» (Sies, 2015).

Les ERO sont des molécules réactives indispensables au métabolisme des êtres vivants. Elles sont produites à de faibles concentrations durant un métabolisme cellulaire normal, et jouent un rôle important dans la régulation de nombreux mécanismes cellulaires tels que l'autophagie et l'apoptose (Milkovic *et al.*, 2019). Les ERO jouent un rôle important vis-à-vis des cellules immunitaires, de l'élimination phagocytaires des microorganismes et de la médiation de l'activation des cellules T (Nathan and Cunningham-

Bussel, 2013; Schieber and Chandel, 2014). Les ERO peuvent aussi être produites suite à un stress environnemental, comme une exposition aux PM. Ils peuvent être sous forme radicalaire, tel que le radical hydroxyle (OH°), et sous forme non radicalaire tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

Les ERO ont été découvertes en 1954 dans les tissus végétaux et animaux, par la technique de résonance paramagnétique, et une relation a été trouvée entre les radicaux libres et l'activité métabolique et certains processus photochimiques (Commoner, Townsend and Pake, 1954). En 1956, il a été montré que le vieillissement pouvait être attribué essentiellement à des attaques de radicaux libres sur les constituants cellulaires et sur les tissus conjonctifs (Harman, 1956). Plus récemment, un lien en une surproduction cellulaire non maitrisée d'ERO et le développement de pathologies a été avancé.

2.4.4.2. Formation des espèces réactives de l'oxygène

Formation des ERO par complexe enzymatique mitochondrial de la chaine respiratoire :

La production d'énergie sous forme d'ATP est appelée phosphorylation oxydative, et se fait surtout dans la membrane interne des mitochondries, par des chaînes de transport d'électrons. Le dioxygène est réduit pour former H_2O pendant le métabolisme normal. Cette réduction se déroule en plusieurs étapes, aboutissant à la formation des ERO. La Figure I-7 présente la formation des ERO pendant la réduction de l'oxygène. Dans un premier temps, les radicaux superoxydes $O_2^{\bullet-}$ sont formés, et leur taux est régulé par les superoxydes dismutases (SOD). Ces enzymes agissent en catalysant la dismutation des anions superoxydes ($O_2^{\bullet-}$) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Cette molécule peut réagir avec les métaux comme le fer et le cuivre (réaction de Fenton), formant le radical hydroxyle $OH^{\bullet}$. La dismutation du H_2O_2 est catalysée par l'enzyme héminique catalase (CAT), et par la glutathion peroxydase (GPx).

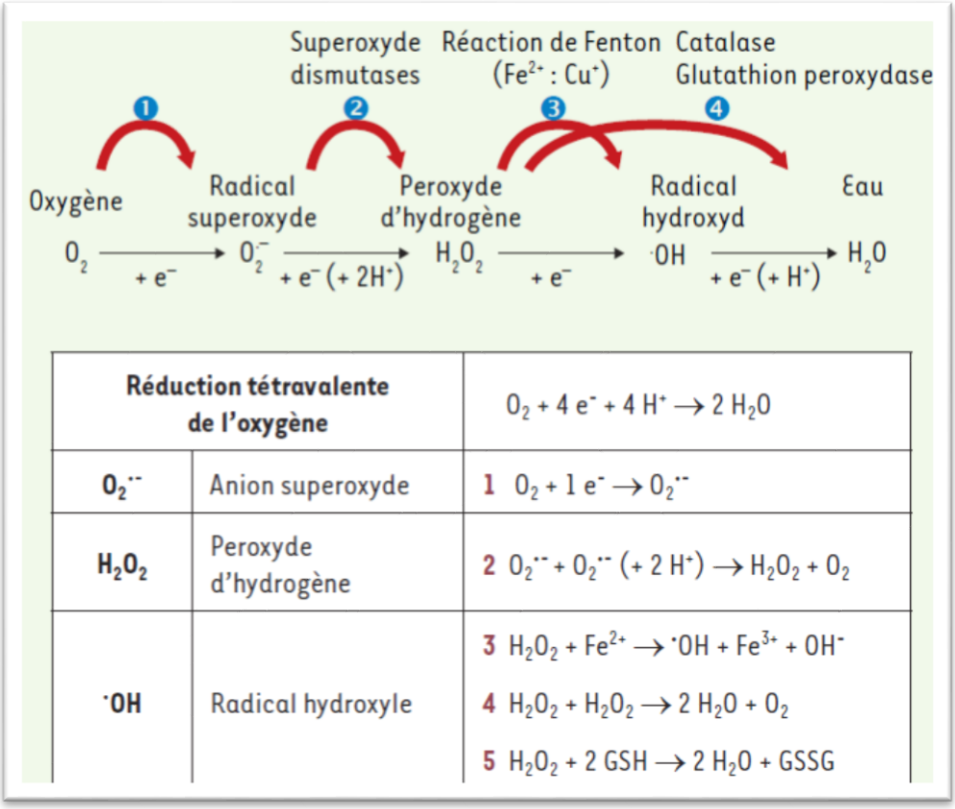


Figure I-7: Formation des ERO par réduction de l'oxygène (Migdal and Serres, 2011)

Autres origines des ERO :

La formation des radicaux superoxydes $O_2^{\bullet-}$ peut se faire également par la réaction entre l'O_2 et la NADPH, catalysée par l'enzyme NAD(P)H oxydase membranaire (NOX).

Les ERO peuvent également se former par d'autres processus, comme par exemple, durant la métabolisation des purines, en utilisant la xanthine oxydase comme catalyseur. Elle peut aussi se faire par l'oxydation des acides gras insaturés, catalysée par les enzymes du réticulum endoplasmique, dont la famille des cytochromes P450. Les peroxysomes, les lysosomes et la mitochondrie peuvent également former des ERO (Zhou, Shao and Spitz, 2014).

Parmi les ERO, le radical hydroxyle $OH^{\bullet}$ est l'oxydant le plus puissant (Milkovic *et al.*, 2019). Il possède une constante de vitesse élevée, une faible durée de vie, et ne possède pas de cibles privilégiées. Il peut agir sur un substrat suivant trois réactions : arrachement d'un électron, arrachement d'un atome d'hydrogène, ou addition sur une double liaison. Le radical superoxyde $O_2^{\bullet-}$ possède la plus faible réactivité, due à sa faible constante de vitesse. Cependant, il peut former d'autres ERO beaucoup plus réactives, par les processus suivants:

- réaction d'Haber-Weiss, qui aboutit à la formation du radical hydroxyle ;

- l'intervention de la forme active de $O_2^{\bullet-}$, qui est le radical perhydroxyle ($HO_2^{\bullet}$), et qui peut réagir avec les acides gras polyinsaturés avec lesquels $O_2^{\bullet-}$ ne réagit pas (Panov, 2018);
- réaction entre $O_2^{\bullet-}$ et le monoxyde d'azote radicalaire $NO^{\bullet}$, formant le peroxynitrite $OONO^-$, connu pour ses effets toxiques sur l'ADN, les protéines et les lipides (Rubbo, Trostchansky and O'Donnell, 2008).

Il existe un équilibre entre le taux de production des ERO, et leur taux d'élimination par les systèmes de défense antioxydants. Cependant, lorsqu'une rupture de l'homéostasie rédox a lieu, à cause d'une diminution des capacités antioxydantes, ou bien d'une surproduction d'ERO, on parle alors de stress oxydant. Ce phénomène peut aboutir à l'oxydation non spécifique et irréversible de l'ADN, des protéines et des lipides cellulaires (Migdal and Serres, 2011; Ndong Ba *et al.*, 2019; Badran, Ledoux, *et al.*, 2020).

2.4.4.3. Impact sur les lipides, les protéines et sur l'ADN

Ayant un fort degré de réactivité, les ERO peuvent réagir avec les lipides et les protéines et peuvent également causer des altérations oxydantes à l'ADN.

Effets des ERO sur les lipides :

Les lipides sont des cibles d'espèces oxydantes en raison de leur structure moléculaire contenant des doubles liaisons réactives (Porter, Caldwell and Mills, 1995). Lorsque la défense antioxydante enzymatique ou non enzymatique de la cellule est submergée par une production excessive d'ERO, il en résulte une oxydation des lipides, ce qui provoque la production de molécules dérivées de la peroxydation lipidique hautement réactives telles que le 4-hydroxy-2-nonénal, le 4-hydroxy-2-hexénal, l'acroléine, et le malondialdéhyde (MDA). Ce dernier est toxique car capable de se fixer de manière covalente avec certains groupements spécifiques de l'ADN et/ou des protéines (Marnett, 1999). Les acides gras insaturés et leurs esters, sont la cible majeure de plusieurs oxydants non enzymatiques, comme les radicaux oxygénés et les peroxynitrites. La peroxydation de l'acide arachidonique catalysée par des radicaux libres aboutit à la formation des produits d'oxydation secondaires, comme les isoprostanes. Ces dernières sont considérées comme des biomarqueurs stables de la peroxydation lipidique endogène et du stress oxydant. La peroxydation lipidique modifie en

effet les caractéristiques chimiques et l'organisation physique des membranes cellulaires, pour induire une perte fonctionnelle, et les produits de la peroxydation lipidiques peuvent jouer un rôle dans l'autophagie et l'apoptose (Su *et al.*, 2019). La peroxydation lipidique médiée par les radicaux libres induit une isomérisation cis-trans des doubles liaisons, entraînant une augmentation de la rigidité et de la perméabilité des membranes. L'oxydation lipidique non régulée peut induire une perturbation de l'homéostasie, une inflammation chronique et un déséquilibre métabolique, conduisant à diverses maladies chroniques (Niki, 2020).

Effet des ERO sur les protéines :

Les modifications oxydatives des protéines peuvent généralement être classées en deux catégories: l'oxydation irréversible et l'oxydation réversible, qui peuvent tous deux être induits sélectivement par des espèces réactives de l'oxygène (Cai and Yan, 2013). Une des modifications irréversibles importantes induites par les ERO sur les protéines, est l'ajout de groupements fonctionnels carbonylés réactifs, tels que les groupements aldéhydiques par exemple. Cela aboutit à la formation des protéines carbonylées. Les aldéhydes réactifs qui résultent de la peroxydation lipidique peuvent également entrainer la formation des protéines carbonylées (Akagawa, 2020). Les ERO peuvent aussi oxyder les chaînes latérales des acides aminés, surtout les acides aminés soufrés, basiques et aromatiques, ce qui pourrait aboutir à une inactivation partielle ou totale des protéines (Grimsrud *et al.*, 2008; Weng *et al.*, 2017).

Effet des ERO sur l'ADN :

La capacité des ERO à réagir avec l'ADN est différente d'une espèce à l'autre. H_2O_2, l'anion superoxyde, et le NO, sont très peu réactifs vis-à-vis de l'ADN, contrairement aux radicaux hydroxyles. De ce fait, H_2O_2 et l'anion superoxyde doivent être convertis en espèces plus réactives par une réaction de Fenton ou Haber-Weiss, ou en peroxynitrite (pour NO) par réaction avec le superoxyde (Epe, 2020). Les ERO peuvent induire la formation d'adduits entre les dérivés lipidiques de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et l'ADN, peuvent former des adduits entre les protéines affectées par le stress oxydatif et l'ADN. Ils peuvent également rompre des simple et doubles brins d'ADN, induire des aberrations chromosomiques, induire la distorsion de la double hélice de l'ADN, oxyder les bases puriques et pyrimidiques de l'ADN… L'oxydation des bases se produit principalement au niveau des atomes d'oxygène et d'azote et peut entraîner la formation de nombreuses bases modifiées (Cooke *et al.*, 2003). L'attaque radicalaire peut être directe ou indirecte. L'attaque

directe par les radicaux peut principalement conduire à des bases modifiées telles que la 8-oxoguanine, la 8-nitroguanine, la formamidopyrimidine, la 8-oxoadénine, le formimido uracile, la 5-hydroxy-cytosine, le 5-hydroxyméthyluracile et la thymine-diol oxazolone. L'attaque indirecte peut causer des dommages oxydatifs à l'ADN, causés par des aldéhydes réactifs résultant de la peroxydation lipidique, qui peuvent être ajoutés au groupe amino des bases d'ADN (Sedelnikova *et al.*, 2010). La guanine est la base la plus astreinte à l'oxydation. Les dérivés de la guanine formés lors de l'attaque primaire des radicaux hydroxyles ou des oxydants à un, deux ou quatre électrons, se stabilisent par une oxydation ou une réduction supplémentaire Le produit d'oxydation impliquant deux électrons 8-oxodG ou 8-OHdG semble être généré dans l'ADN cellulaire par la plupart des oxydants, avec les rendements les plus élevés (Cui *et al.*, 2013). Elle se forme par l'ajout d'un groupement hydroxyle à la molécule de guanine. Ensuite, la base guanine va se désapparier avec la base thymine, et induire une transversion de GC à TA. La 8-OHdG est donc un marqueur biologique spécifique du stress oxydant couramment recherché pour mettre en évidence les dommages à l'ADN.

2.4.4.4. Biomarqueurs et indicateurs de stress oxydant

La mesure directe des niveaux des ERO avec une grande précision est difficile, en raison de leur courte durée de vie (les radicaux hydroxyles ont une demi-vie inférieure à une nanoseconde), et de leur réactivité rapide avec les composants de régulation de l'état redox. Par conséquent, pour évaluer le stress oxydant, il est préférable de mesurer indirectement la présence d'ERO, en examinant les dommages oxydatifs que ces radicaux causent aux lipides, aux protéines et à l'ADN. Pour mesurer le stress oxydant, un nombre important de biomarqueurs et d'indicateurs ont été proposés. Les biomarqueurs du stress oxydant sont les molécules modifiées par des interactions avec les ERO, et les molécules du système antioxydant qui subissent des modifications en réponse au stress oxydant. Les biomarqueurs les plus utilisés sont les suivants (Ho *et al.*, 2013):

- La 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine (8-OHdG) :

C'est l'une des formes prédominantes des lésions oxydatives à l'ADN induites par les ERO, et a été largement utilisé comme biomarqueur pour le stress oxydant et la

cancérogenèse (Korkmaz, Butuner and Roggenbuck, 2018; Qing *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2020). Elle peut être quantifiée par chromatographie liquide à haute performance (HPLC), par chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (GC-MS), et la spectrométrie de masse (Valavanidis, Vlachogianni and Fiotakis, 2009), mais la forme la plus répandue est le dosage colorimétrique par méthode ELISA.

- Les isoprostanes :

Ce sont des composés stables, appartenant à la famille des prostaglandines, générés par la peroxydation d'un acide gras polyinsaturé (l'acide arachidonique) (Morrow *et al.*, 1992). Afin de les quantifier, plusieurs techniques peuvent être utilisées, telles que les chromatographies en phase gazeuse ou en phase liquide, toutes deux couplées à la spectrométrie de masse (GC/MS et LC/MS), , les dosages immunoenzymatiques (ELISA) et les dosages radio-immunologiques dans les échantillons de plasma et d'urine (Musiek *et al.*, 2005). La 8-isoprostane compte parmi les marqueurs de stress oxydant les plus étudié dans l'urine et les cellules (Badran, Verdin, *et al.*, 2020; Graille *et al.*, 2020).

- Le Malondialdéhyde (MDA) :

C'est un composé généré par la peroxydation d'acides gras polyinsaturés. Le MDA est généralement quantifié à partir d'échantillons de plasma, par le biais d'un test colorimétrique, basé sur la réaction entre le MDA et l'acide thiobarbiturique (TBA) (Cherian *et al.*, 2019). Il existe également des kits ELISA à base d'anticorps, pour détecter le MDA.

- Les protéines carbonylées :

La carbonylation des protéines est la mesure la plus couramment utilisée de la modification oxydative des protéines. Elle est le plus souvent mesurée par spectrophotométrie, ou par immunochimie en dérivatisant les protéines avec le 2,4 dinitrophénylhydrazine (DNPH) (Wehr and Levine, 2013; Housseiny *et al.*, 2020).

- Nitrotyrosines :

Ce sont des composés produits par la nitration des protéines tyrosine, par le peroxynitrite et le dioxyde d'azote. Bien que les intermédiaires précis et le mécanisme de nitration *in vivo* aient été controversés, des mesures reflétant la nitration de la tyrosine ont été utilisées comme indicateurs du stress oxydant. La nitrotyrosine libre (3-NO_2-Tyr) peut être

mesurée par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) couplée au GC, ou à la HPLC (Duncan, 2003), ou encore par test fluoroimmunologique (Tanabe *et al.*, 2014).

- Protéines glutathionylées :

C'est une réaction entre un résidu réactif de cystéine, et le glutathion tripeptide cellulaire, aboutissant à la formation d'un pont disulfure. Deux principaux types de stratégies ont été développés pour détecter les protéines glutathionylées. Les techniques d'analyse les plus utilisées sont basées sur l'utilisation de glutathion marqué, soit par radiomarquage 35S, soit par biotinylation (Gao *et al.*, 2009).

- La myélopéroxydase (MPO) :

C'est une enzyme héminique abondante dans les granulocytes de cellules inflammatoires humaines. La MPO catalyse la conversion du peroxyde d'hydrogène en OH, $ONOO^{-}$, l'acide hypochloreux (HOCl) et NO_2, pouvant ensuite modifier les lipides, les lipoprotéines et les protéines. L'augmentation de la concentration de cette enzyme peut être considérée comme biomarqueur du stress oxydant. Il existe des dosages immuno-enzymatiques actuels (ELISA) pour la concentration de MPO, et un test de bioluminescence, désigné activité MPO sur une surface polymère, pour mesurer l'activité MPO dans des échantillons de plasma humain en utilisant le substrat bioluminescent L-012 (Goiffon, Martinez and Piwnica-Worms, 2015).

- Les lipoprotéines de basse densité (LDL) oxydées, et phospholipides oxydés :

Les niveaux oxydés de lipoprotéines de basse densité (LDL) sont également parfois mesurés dans le sérum ou le plasma humain en tant que biomarqueur du stress oxydant, en utilisant la technique ELISA sandwich basé sur l'anticorps monoclonal exclusif de souris 4E6 (Katerji, Filippova and Duerksen-Hughes, 2019).

- Capacité antioxydante nette du sérum :

La mesure de la capacité antioxydante peut se faire par la quantification de l'enzyme catalase (CAT), la glutathion peroxydase 1 (GPX-1) et la SOD. Les Western blots, les gels d'activité et les tests d'activité sont diverses méthodes utilisées pour déterminer l'activité des enzymes dans les cellules. D'autres techniques, dont l'immunohistochimie et l'immunogold, peuvent évaluer les niveaux des différentes enzymes antioxydantes dans les cellules (Weydert and Cullen, 2010).

Les biomarqueurs ci-dessus nécessitent pour leur quantification une préparation préalable assez chronophage des échantillons de sang, d'urine, ou de cellules, et sont relativement coûteux. Il existe d'autres moyens, encore aujourd'hui en pleine expansion, qui permettent de prédire et d'évaluer la capacité d'un toxique (tel que les PM) à induire un stress oxydant, et ceci sans avoir recours aux tests biologiques. Ceci est réalisable par l'étude du potentiel oxydant.

2.5. Le Potentiel Oxydant

Le potentiel oxydant (OP) peut se définir comme la capacité des PM à générer des ERO, et/ou à oxyder les antioxydants. Les ERO que l'on associe aux PM peuvent exister nativement sous la forme ERO sur et/ou à l'intérieur de la particule elle-même, ou peuvent apparaître après interaction des PM et de leur constituants avec les fluides et les cellules. Les tests permettant l'étude du OP sont des tests acellulaires, utilisant des méthodes chimiques, qui ont l'avantage d'être rapides, peu coûteuses, relativement faciles à réaliser et adaptés à l'automatisation en comparaison aux tests cellulaires. Néanmoins, une revue récente a synthétisé les résultats de 29 publications étudiant la relation entre les mesures de potentiel oxydant et l'évolution des paramètres biologiques. Il apparaît que la majorité de ces études ont trouvé une relation significative entre OP et au moins un paramètre biologique, et que 7 études n'ont trouvé aucune relation entre les méthodes acellulaires et les méthodes cellulaires (Øvrevik, 2019). Néanmoins, dans les cas où une relation a été trouvée, le paramètre biologique en question était rarement lié au stress oxydant.

Parmi les méthodes les plus utilisées pour estimer le OP, on peut distinguer celles qui quantifient les ERO intrinsèquement présentes dans les particules (méthode DCFH), celles qui quantifient les radicaux OH° créés à partir de H_2O_2 en présence des PM (méthode utilisant la RPE) et celles qui utilisent des méthodes indirectes en suivant et en quantifiant la consommation d'une espèce antioxydante (acide ascorbique ou glutathion GSH) ou d'un réducteur (dithiothréitol) en présence de PM.

2.5.1. Mesure du potentiel oxydant

Les tests de potentiel oxydant les plus utilisés dans la littérature s'appuient sur le suivi de différentes réactions ou de différentes espèces réactives. Une présentation est donnée ci-après.

2.5.1.1. méthode utilisant la 2′,7′-dichlorodihydrofluorescéine (DCFH)

La DCFH est une sonde couramment utilisée pour quantifier les ERO présents dans particules. C'est un réactif non fluorescent qui devient fluorescent (DCF) lorsqu'il est oxydé en présence des ERO. L'intensité fluorescente est convertie en concentration de H_2O_2 pour obtenir la mesure finale des ERO dans les particules (Bates *et al.*, 2019). Crobeddu et al., (2017) ont étudié le potentiel oxydant des $PM_{2,5}$ collectées à Paris en utilisant différentes méthodes, et ont trouvé des valeurs de coefficient de corrélation Spearman significatives entre le potentiel oxydant déterminé par la méthode DCFH (OP-DCFH) et celui donné par les autres méthodes de (GSH : 0,52, AA : 0,49, GSSG : 0,36, et DTT : 0,61). OP-DCFH était significativement corrélé avec les concentrations de certains éléments métalliques. Simonetti et al., (2018), suite à l'analyse du potentiel oxydant de différents échantillons de PM, ont trouvé que les résultats OP-DCFH étaient comparables à OP-DTT, répondant le plus aux particules fines. Une étude récente a trouvé que OP-DCFH était relié au carbone organique présents dans les particules (Jovanovic *et al.*, 2019).

2.5.1.2. Méthode utilisant la technique de résonance paramagnétique électronique (RPE)

La technique RPE permet de détecter des espèces possédant un ou plusieurs électrons célibataires. Elle est ainsi adaptée à la détection des espèces radicalaires, telles que OH°. De ce fait, elle rend possible d'accéder à une évaluation du potentiel oxydant. Dans ce cas, celui-ci correspond à la capacité des PM à générer des radicaux hydroxyles (OH°) en présence de H_2O_2; les radicaux générés étant piégés par le 5,5-diméthyl-1-pyrroline-N-oxyde (DMPO) (Shi *et al.*, 2003). Le résultat OP correspond à la moyenne des amplitudes totales du quartet DMPO–OH, en unité arbitraire par µg de PM. Yang et al., (2015) ont trouvé de fortes corrélations entre OP-RPE et Cu (r=0,65) et Fe (r=0,6), lors de l'analyse du OP de $PM_{2,5}$

collectés aux Pays-Bas. Cette méthode a également été appliquée sur des $PM_{0,25}$ prélevées sur deux sites différents à Los Angeles (Etats-Unis), et les résultats ont montré une corrélation significative entre les espèces radicalaires détectées avec les ERO intracellulaires de cellules épithéliales bronchiques humaines 16HBE (He *et al.*, 2018). Van Den Heuvel *et al.*, (2016) ont étudié le potentiel oxydant induit par des PM_{10} prélevées sur différents sites en Belgique (108 échantillons), et ont n'ont pas trouvé de corrélation significative entre OP-RPE et les résultats *in-vitro* de cytotoxicité et d'inflammation (IL-8) sur des cellules BEAS-2B. Dans une étude plus récente (Van Den Heuvel *et al.*, 2018), une relation a été mise en évidence entre OP-RPE et le test d'Ames de mutagenèse. Par ailleurs, la méthode RPE a été utilisée dans un petit nombre d'études servant à comparer OP et des données d'études épidémiologiques (effets sur les poumons, asthme, COPD…) et les résultats ne semblent pas montrer de relations (Øvrevik, 2019).

2.5.1.3. Méthode utilisant l'acide ascorbique (AA)

L'AA est un antioxydant physiologique qui empêche l'oxydation des lipides et protéines (Valko, Morris and Cronin, 2005). L'acide ascorbique est oxydé en acide déhydroascorbique, par les espèces redox actives présentes dans les particules. La cinétique de consommation de l'acide ascorbique est mesurée par spectrophotomètre-UV. Le protocole de mesure du potentiel oxydant en utilisant l'acide ascorbique varie d'une étude à l'autre, et ceci permet d'expliquer en grande partie l'hétérogénéité des résultats obtenus. Certaines études utilisent l'eau ultra-pure (Fang *et al.*, 2016) pour extraire les échantillons, d'autres utilisent du tampon phosphate (Visentin *et al.*, 2016) ou encore le méthanol (Janssen *et al.*, 2014). Une étude récente a trouvé que le test AA était particulièrement sensible aux métaux surtout Fe et Cu des PM_{10}, émis par le trafic hors échappement, comme l'abrasion des freins et la remise en suspension de la poussière de route (Perrone *et al.*, 2019). Weber et al., (2018) ont trouvé que les résultats OP-AA étaient plutôt associés aux sources de combustion de biomasse et de trafic. Daellenbach et al., (2020) ont trouvé que OP-DTT et OP-AA étaient corrélés entre eux(R^2 = 0,68).

Janssen et al., (2015) ont mis en évidence une corrélation entre OP-AA et la production de l'interleukine IL-6. He et al., (2018) ont trouvé que OP-AA et la mesure de surproduction des ERO était corrélée (r = 0,95), suite à l'exposition des cellules humaines bronchiques 16HBE aux $PM_{0,25}$ et $PM_{2,5}$ collectées à Los Angeles (Etats-Unis).

2.5.1.4. Méthode utilisant le dithiotréitol (DTT)

La mesure du potentiel oxydant des PM à l'aide du DTT est l'une des méthodes les plus utilisées dans la bibliographie. Le DTT est considéré comme un substitut chimique des réducteurs cellulaires, tels que le NADH ou le NADPH, capables de réduire l'O_2 en anion superoxyde (O_2^-) et d'induire un stress oxydant (Kumagai *et al.*, 2002). Le déroulement de ce test est similaire à celui utilisant l'acide ascorbique. Il s'agit de suivre dans le temps l'oxydation du DTT par les espèces rédox actives des PM. La vitesse de disparition du DTT est alors proportionnelle à la concentration d'espèces redox-actives dans l'échantillon de PM. Les mesures sont faites à l'aide d'un spectrophotomètre-visible. Le protocole de mesure du potentiel oxydant par la méthode utilisant le DTT varie d'une étude à l'autre. En particulier, et tout comme pour la méthode utilisant l'AA, le solvant utilisé pour l'extraction des PM est l'une des causes de la variabilité des résultats d'une étude à l'autre. Certaines études utilisent l'eau ultra-pure pour extraire les échantillons (Hedayat *et al.*, 2016), d'autres utilisent du tampon phosphate (McWhinney *et al.*, 2013), du méthanol (Perrone *et al.*, 2015) ou encore des fluides pulmonaires synthétiques (Gamble, ALF) (Calas *et al.*, 2017). Une étude récente a trouvé que ce test était sensible aux métaux surtout Cu, Mn et Fe (Guo *et al.*, 2019). Delfino et al., (2013) ont évalué le potentiel oxydant des échantillons de $PM_{2,5}$ et ont trouvé une corrélation entre OP-DTT et les teneurs en carbone organique (r=0,8) et les composés organiques hydrosolubles (r=0,9). Ils ont également trouvé une corrélation entre les résultats de OP-DTT et la formation *in vitro* des ERO. Il a également été montré récemment que OP-DTT pouvait être relié à la fraction fine des particules émises par les sources industrielles (Massimi, Ristorini, *et al.*, 2020). (Daellenbach *et al.*, 2020) ont conclu que le potentiel oxydant des PM mesuré à l'aide du DTT était essentiellement corrélé à des contributions de sources anthropiques et s'expliquait surtout par les émissions des véhicules hors échappement du mode grossier (15% à 49%) et les aérosols organiques secondaires du mode fin (24% à 51%).

Jaramillo et al., (2018) ont trouvé que OP-DTT des extraits des particules diesel était corrélé avec l'expression génique du CYP-1A1. Quelques études ont enfin eu pour objectif de rechercher une relation entre le OP-DTT et des effets sanitaires en population. Ainsi, ont étudié le potentiel oxydant des prélevées par la méthode DTT, et ont trouvé une relation entre les valeurs de OP-DTT de $PM_{2,5}$ et les entrées à l'hôpital pour l'asthme, dans le cadre d'une étude réalisée à Atlanta (Etats-Unis) Abrams et al., (2017). Par ailleurs, dans une étude menée

aux Pays-Bas, Strak et al., (2017) ont trouvé quant à eux que les résultats OP-DTT de $PM_{2,5}$ étaient fortement associés à la prévalence de diabète chez les adultes.

2.5.1.5. Mesure de l'appauvrissement en antioxydants dans le fluide pulmonaire simulé (SLF)

Le fluide recouvrant les voies respiratoires (RTLF) est la première interface physique que les PM inhalées rencontrent. Il a été démontré qu'il contient des antioxydants tels que l'ascorbate, l'urate et le glutathion réduit (GSH), qui assurent des rôles protecteurs pour les voies respiratoires (Cantin *et al.*, 1987; Peden *et al.*, 1990; Gao, Ripley, *et al.*, 2020). L'appauvrissement en antioxydants dans le SLF consiste à placer des particules dans une solution contenant des concentrations physiologiquement pertinentes (200 µM) de chacun de ces 3 antioxydants à un pH = 7,0. La concentration des antioxydants (urate et ascorbate) est quantifiée en utilisant un spectrophotomètre UV/Vis ou par HPLC. La concentration de GSH restante est calculée indirectement en mesurant le glutathion total (GSx) et les concentrations de disulfure de glutathion (GSSG), à l'aide d'un test de recyclage enzymatique GSH-GSSG (Baker, Cerniglia and Zaman, 1990). Cependant, la composition du SLF varie selon les études et affecte par la suite les résultats du OP (Shahpoury *et al.*, 2019). Une étude a comparé différentes méthodes pour évaluer le potentiel oxydant des $PM_{2,5}$ collectés à Paris sur deux sites différents (trafic, urbain), et leur capacité à refléter la réponse oxydante et inflammatoire. La mesure de la diminution de la concentration des antioxydants urate et ascorbate a montré une forte corrélation avec la production d'ERO intracellulaires sur les cellules de carcinome pulmonaire mucoépidermoïde NCI-H292, évaluée par oxydation du DCFH. Ce test a été également corrélé avec l'expression de gènes anti-oxydants (superoxyde dismutase 2, hème-oxygénase-1), ainsi que IL-6 (Crobeddu *et al.*, 2017). De plus, dans une étude plus récente, les résultats de OP obtenus par cette méthode ont été fortement corrélés aux HAP sur un site sous l'influence du trafic, et corrélé au potassium pour l'échantillon lié à la combustion de bois (Crobeddu *et al.*, 2020). Liu *et al.*, (2018) ont trouvé que OP-GSH était significativement lié à la concentration en 8-OHdG et IL-6.

2.5.2. Sensibilité des tests de potentiel oxydant

Dans la littérature, les différents tests de potentiel oxydant ont été utilisés pour évaluer le OP de différents échantillons de particules. Vu les différences entre les méthodes et les caractéristiques physico-chimiques des échantillons, les résultats obtenus sont souvent hétérogènes. Concernant l'AA et le DTT, les études montrent que ces molécules sont à la fois sensibles à des espèces communes mais aussi différentes. L'AA serait surtout sensible aux métaux et espèces organiques oxygénées telles que les quinones (Visentin *et al.*, 2016; Yu *et al.*, 2018), tandis que le DTT serait davantage sensible aux métaux de transition (Charrier and Anastasio, 2012; Yang *et al.*, 2014). Plusieurs études ont en définitive conclu sur la complémentarité entre les tests de OP (Janssen *et al.*, 2013; Fang *et al.*, 2016; Conte *et al.*, 2017), afin de prendre en considération au mieux l'ensemble des espèces pouvant contribuer au OP des PM et aussi la diversité des sources d'émission susceptibles d'influer sur ce dernier (Calas *et al.*, 2018).

3. Caractéristiques des PM impliqués dans un effet toxique

Après avoir apporté des preuves de la toxicité des PM par le biais des études épidémiologiques, en mettant en évidence des relations entre une exposition PM et différentes pathologies, il est important de se pencher sur la question des constituants des particules, qui peuvent être responsables des effets toxiques. Les recherches en toxicologie expérimentale ont permis d'accroitre la connaissance entre les paramètres physico-chimiques des PM et des effets toxiques, en suivant l'influence de différents paramètres comme la taille des particules, la concentration des composés chimiques, leur bioaccessibilité, ou encore la durée d'exposition.

3.1. Effet de la taille des PM

Il n'est pas évident d'étudier l'effet de la taille des PM sur la toxicité, indépendamment de sa composition chimique, puisque certaines gammes granulométriques ont tendance à

contenir majoritairement certains composés chimiques. Cependant, il est bien admis qu'en présentant une surface spécifique élevée les particules les plus fines ont la capacité d'adsorber des composés chimiques de différente nature, comme des composés organiques et des espèces oxydantes présentes dans l'air. Le poumon est susceptible de répondre assez différemment à un grand nombre de particules de petite taille mais présentant au global une grande surface, plutôt qu'à un nombre plus petit de particules, mais de taille plus grande (Bogunia-Kubik and Sugisaka, 2002). Sahu et al., (2014) ont étudié l'effet de la taille des particules de noir de carbone (nano et micrométrique) sur la viabilité, la phagocytose, l'induction des cytokines et les dommages à l'ADN, sur des cellules THP-1. Les résultats ont montré que les particules ayant une taille de 50 nm présentent une plus grande toxicité que les particules ayant une taille de 500 nm. Wilson et al., (2002) ont incubé les particules fines et ultrafines de noir de carbone avec la dichlorofluorescine sensible aux ERO, et ont trouvé que lors de l'ajout de sulfate cuivrique ($CuSO_4$), de sulfate ferreux ($FeSO_4$) ou de chlorure ferrique ($FeCl_3$), la génération des ERO en présence de particules ultrafines est plus importante que dans le cas des particules fines. Sahu et al., (2016) ont comparé les effets cytotoxiques des nanoparticules et microparticules de ZnO et de SiO_2 sur différentes cellules humaines (cellules épithéliales pulmonaires L-132, et monocytes THP-1) par le test MTT qui mesure l'activité métabolique et donc la viabilité cellulaire. Les résultats ont montré que ces particules présentaient une cytotoxicité dose-dépendante, qui est plus importante pour les particules nanométriques.

3.2. Effet des composés organiques

Cette famille de composés comprend notamment les alcanes, des alcènes, aldéhydes, cétones, acides carboxyliques, composés aminés, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et leurs dérivés, les dioxines et furanes. Une étude menée en considérant un extrait organique de $PM_{2,5}$ collectées en Corée a conclu que l'extrait, et les fractions aliphatiques aromatiques et légèrement polaires de ces PM, ont généré une cassure de l'ADN et une formation de micronoyaux d'une manière dose-dépendante (Oh *et al.*, 2011). Des études *in vitro* ont rapporté des corrélations entre le contenu en carbone total (EC/OC) et la peroxydation lipidique, lors de l'exposition des cellules épithéliales bronchiques humaines aux PM (Huang, Hsu and Chan, 2003). Cependant, le carbone peut servir de noyaux sur

lesquels d'autres composés s'adsorbent, ce qui complique encore l'interprétation toxicologique.

3.2.1. Effet des HAP

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des composés qui se forment par pyrolyse incomplète de matières organiques. Les métabolites des HAP sont des composés cancérigènes et génotoxiques. En première étape, leur formation consiste à la formation des époxydes, par l'addition d'un atome d'oxygène à travers une double liaison. Ceci est souvent médié par la phase I des réactions métaboliques, impliquant principalement par la superfamille des monooxygénases à cytochromes P450 (CYP). Une fois formés, les époxydes peuvent être hydratés pour former des diols, phénols, et peuvent aussi réagir avec le glutathion. Chacun de ces différents produits peut être encore métabolisé (Hall and Grover, 1990). Un exemple bien documenté est la bioactivation du benzo[a]pyrène (B[a]P) (Figure I-8) qui subit un processus en plusieurs étapes impliquant le CYP1A1, et la conversion en r7,t8-dihydroxy-t-9,10-époxy-7,8,9,10-tétrahydrobenzo [a] pyrène (BPDE) médiée par l'époxyde hydrolase, et pourra ensuite produire des dommages à l'ADN (Barnes *et al.*, 2018). Billet et al., (2007) ont trouvé que les HAP adsorbés sur les PM induisaient des augmentations significatives des expressions d'ARNm, du cytochrome cyp2E1, cyp2F1, P450 CYP 1A1 et glutathion s-transférase-pi1. Ils ont conclu que l'activation métabolique des HAP fortement adsorbés sur les particules, est l'un des mécanismes impliqués dans la toxicité observée sur des cellules épithéliales pulmonaires humaines (Billet *et al.*, 2007). Les expositions aux HAP peuvent aussi induire un stress oxydant. An et al., (2011) ont conclu que les dérivés du B [a] P ont la capacité d'induire la production d'espèces réactives de l'oxygène à partir des cycles redox, causant un stress oxydant.

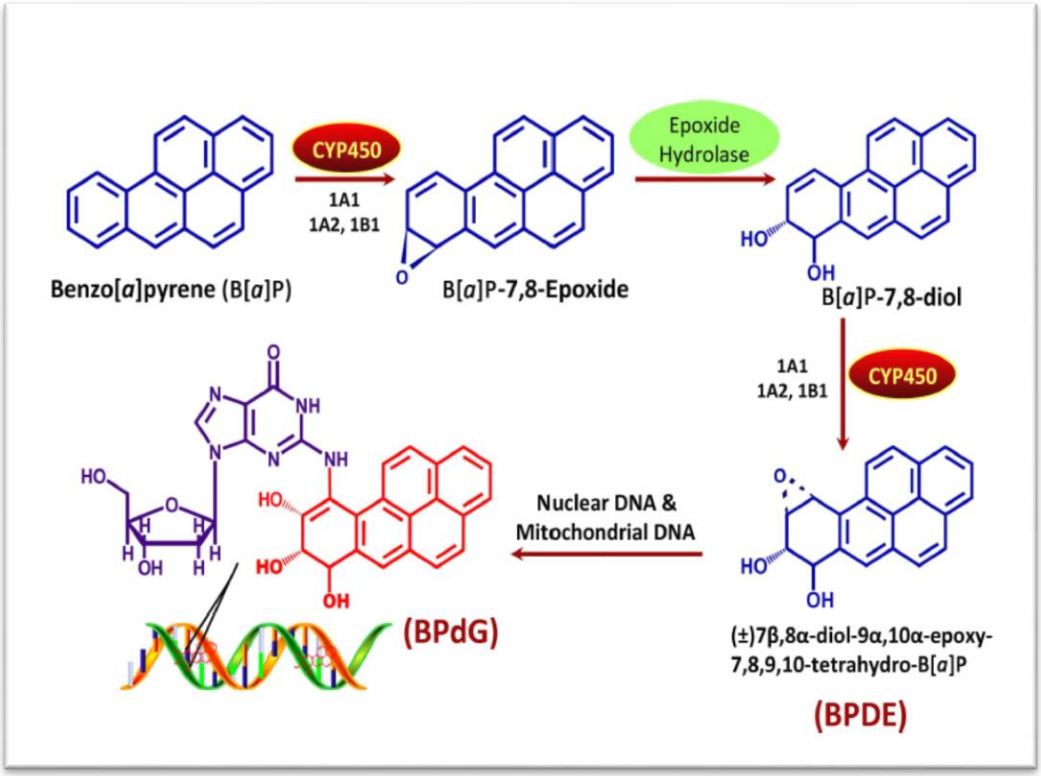


Figure I-8: Dommage à l'ADN causé par le benzo[a]pyrène (Barnes et al., 2018).

3.2.2. Effet des HULIS

Les HULIS (de l'anglais Humic-Like Substances) sont des polyacides hydrosolubles, constitués d'éléments structurels poly-conjugués, et d'un noyau aromatique portant des chaînes aliphatiques substituées avec des groupements fonctionnels polaires : carboxyle (-COOH), hydroxyle (-CH_2OH) et carbonyle (-$COCH_3$). Les HULIS sont des composés redox-actifs des PM, et peuvent servir de porteurs d'électrons pour catalyser la formation des ERO (Lin and Yu, 2011). Les HULIS regroupent surtout des quinones, et des composés ayant des groupements carboxylate. Les radicaux à base de quinone peuvent complexer les métaux, entraîner un transport d'électrons, consommer les antioxydants par des réactions entre les quinones et les thiols (R-SH), et catalyser la réaction Fenton. Les HULIS peuvent former un complexe avec le Fe (II), et ce complexe s'oxyde et provoque la réduction de O_2 en O_2^- , et réagit avec H_2O_2 pour former OH° (Gonzalez *et al.*, 2017). Une étude récente a observé des effets additifs, antagonistes et synergiques dans le mélange de Fe-HULIS, Cu-HULIS et Mn-HULIS respectivement, lors de l'étude du potentiel oxydant par le test DTT (Yu *et al.*, 2018).

Ghio et al., (2015) a démontré que l'exposition des cellules épithéliales respiratoires à l'acide humique, a entraîné une plus grande génération d'oxydants et une libération plus importante d'interleukines. Dans les systèmes biologiques, les quinones peuvent réagir avec les nucléophiles cellulaires (GSH, sulfhydryls protéiques), et / ou former des ERO par un cycle rédox (Figure I-9). Les quinones peuvent subir une réduction d'un seul électron, catalysé par P450 / NADPH oxydoréductase. Ceci génère des anions radicaux semiquinones, très instables, et facilement oxydés en quinones par l'oxygène. La réduction de l'oxygène génère le radical superoxyde, qui est ensuite transformé en peroxyde d'hydrogène par l'action de la SOD. Le H_2O_2 réagit avec les métaux comme le fer et le cuivre (Fenton), et aboutit à la formation du radical hydroxyle. La plupart des quinones peuvent également subir une réduction de deux électrons pour former l'hydroquinone ou le catéchol catalysé par le NADPH / quinone oxydoréductase (NQO1), qui représente un mécanisme de détoxication majeur (Bolton and Dunlap, 2017).

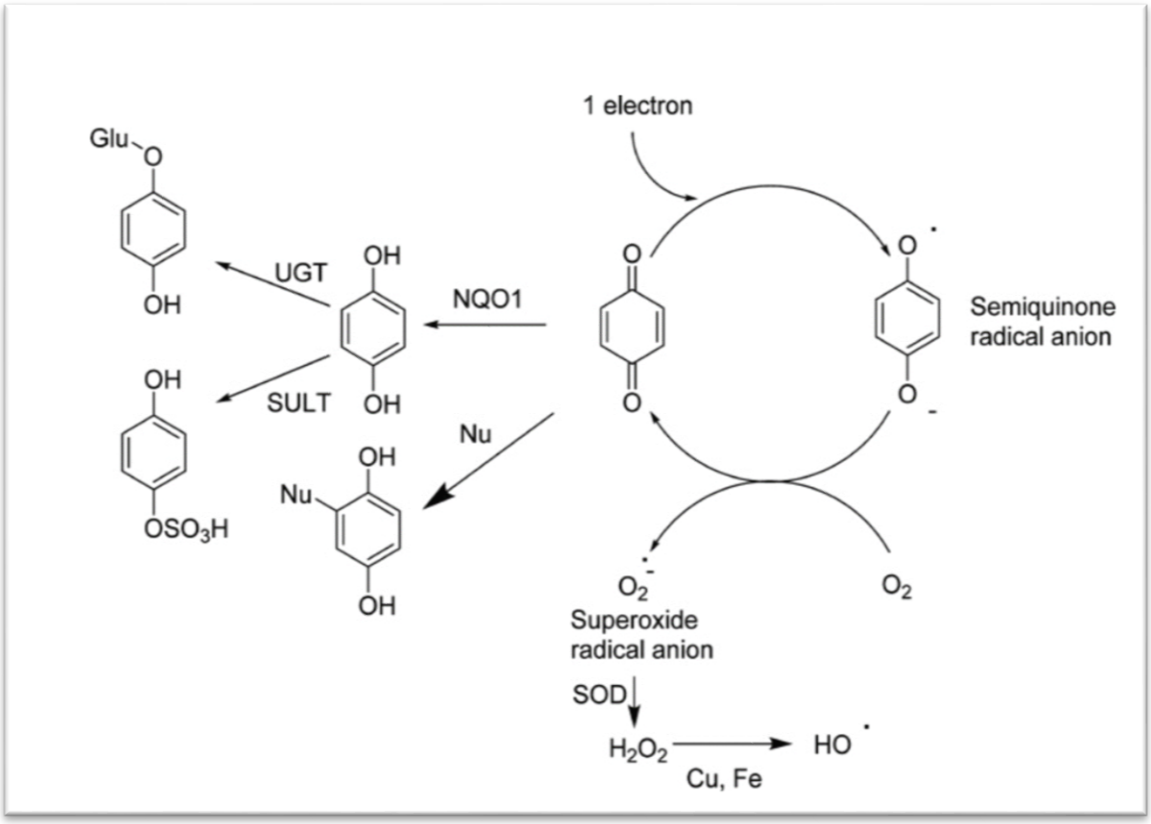
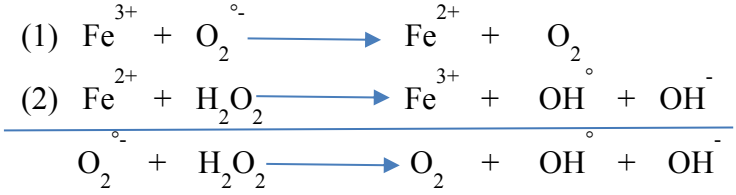


Figure I-9: Mécanisme de toxicité induit par les quinones (Bolton and Dunlap, 2017)

3.3. Effet des métaux

Les métaux sont classés en deux groupes. Le premier comprend les éléments présentant des propriétés redox comme le fer (Fe), le cuivre (Cu), le chrome (Cr), le vanadium (V) et le cobalt (Co), qui selon leur degré d'oxydation, peuvent contenir des électrons non-appariés dans les orbitales d. Ces caractéristiques en font des espèces capables de générer des ERO par la réaction Fenton. La réaction ci-dessous représente la réaction de Fenton impliquant les ions du fer, et au global, la réaction de Haber-Weiss (Valko, Morris and Cronin, 2005).



Le second groupe comprend les métaux non redox actifs, tels que les éléments mercure (Hg), cadmium (Cd), nickel (Ni), zinc (Zn), arsenic (As) et le plomb (Pb). Alors que les métaux redox actifs subissent des réactions cycliques redox, les métaux non redox actifs tels que As et Cd exercent leur toxicité par la consommation du glutathion et la liaison à des groupes sulfhydryle de protéines. As est connu pour se lier directement aux thiols, et peut aussi exercer sa toxicité par d'autres mécanismes, impliquant la formation de peroxyde d'hydrogène dans des conditions physiologiques. La présence de zinc non redox actif peut augmenter les dommages à l'ADN en altérant les mécanismes de réparation de l'ADN. L'exposition des cellules à As et Cd peut entraîner des perturbations métaboliques du cuivre et du fer redox-actifs, avec l'apparition d'un stress oxydant induit par la formation accrue d'ERO (Valko *et al.*, 2016). Certains métaux peuvent activer des facteurs de transcription tels que NF-kB, AP-1 et p53, via le transfert des électrons. Ces facteurs contrôlent l'expression de certains gènes : le facteur nucléaire de transcription NF-kB participe aux réponses inflammatoires, tandis que AP-1 joue un rôle dans la croissance et la différenciation cellulaire. La protéine p53 est un point de contrôle du cycle cellulaire, et son inactivation peut se traduire par une division cellulaire incontrôlée. La Figure I-10 représente les réactions induites par les ions métalliques non rédox actifs tels que le Pb, Cd, Zn et As, Hg, ainsi que certains métaux redox actifs comme le V et Cr (Samet *et al.*, 2019) :

- les métaux peuvent réagir avec les thiols (-SH) des cystéines ($C_3H_7NO_2S$) de la forme réduite du glutathion (GSH) et les protéines régulatrices (Ouyang *et al.*, 2018).

- les métaux peuvent aussi inhiber directement ou à partir de H_2O_2, l'enzyme glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) (Peralta *et al.*, 2015), qui est une oxydoréductase (catalyse le transfert d'électrons), ce qui augmente les niveaux de phosphate de nicotinamide adénine dinucléotide (NADPH), par réduction de $NADP^+$ par la voie du pentose phosphate (PPP).

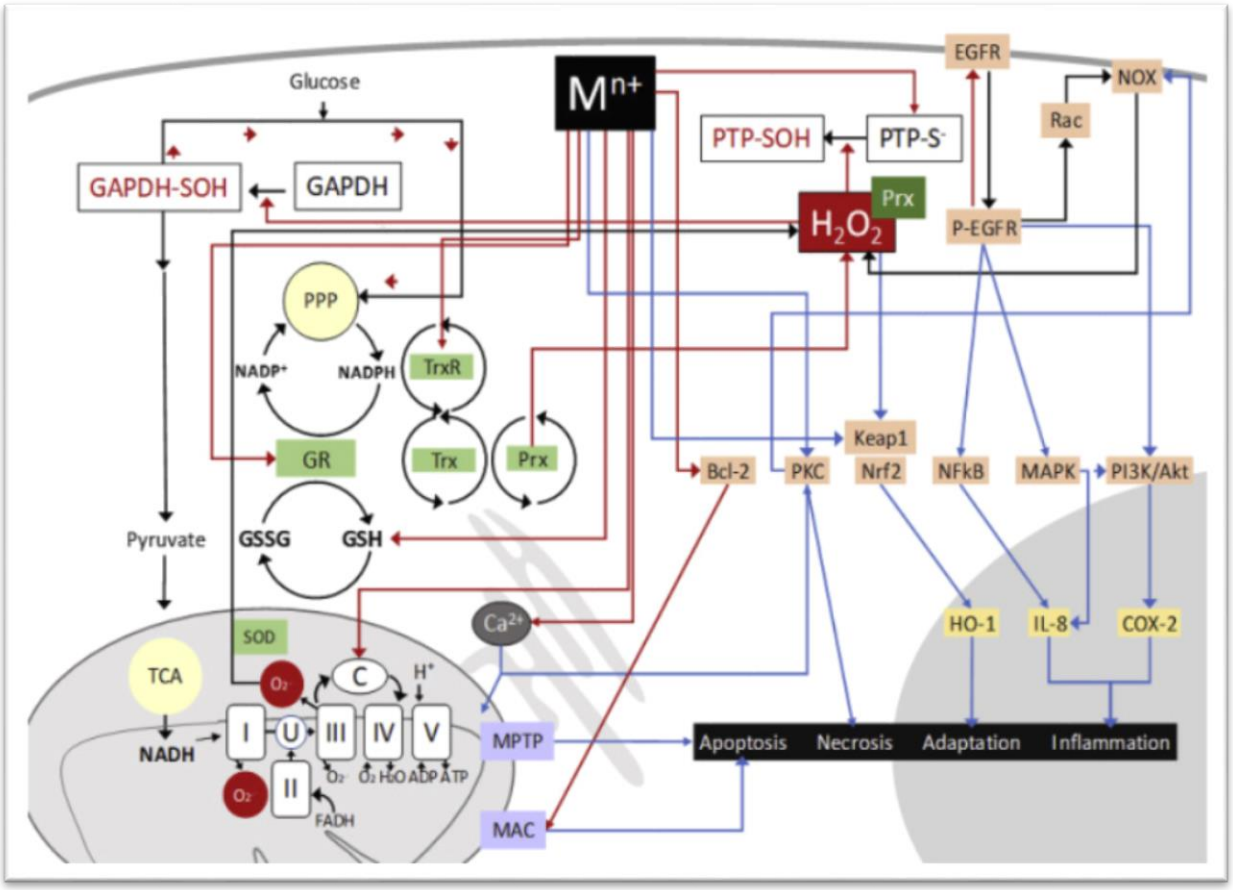


Figure I-10:Mécanismes non cycliques du stress oxydant induit par les métaux. Les processus d'activation sont représentés par des flèches bleues, les effets inhibiteurs sont indiqués par des flèches rouges (d'après Samet et al., 2019).

- Ces éléments peuvent également inhiber les protéines tyrosine phosphatases (PTP), qui sont un groupe d'enzymes qui éliminent les groupes phosphate des résidus de tyrosine phosphorylés sur les protéines (Maret, 2019). Ceci génère une activité kinase basale (transfert le phosphate à partir d'un ATP à un substrat), dans le récepteur du facteur de croissance

épidermique (EGFR). Cela permet une signalisation en aval via la MAPK « mitogen activated protein kinase », via le facteur nucléaire kappa B (NFkB), et la phosphatidyl-inositol-3 kinase (PI3K / Akt). Ceci conduit à la signalisation en aval, à l'expression des gènes inflammatoires, et à l'activation de la NADPH oxydase (NOX), qui est une source de H_2O_2.

- Les métaux altèrent le flux d'électrons dans les protéines mitochondriales, ce qui augmente la production d'anion superoxyde ($O_2^{\circ-}$), qui est ensuite transformé en H_2O_2, catalysé par l'enzyme superoxyde dismutase (SOD).

- Les métaux peuvent provoquer la dérégulation du transport du Ca^{2+}, et cela augmente ses niveaux dans les mitochondries et le cytosol, favorisant l'ouverture des pores de transition de perméabilité membranaire (MPTP), ainsi que l'activation des NADPH oxydase par des kinases telles que la protéine kinase C (PKC) (Boyman *et al.*, 2019).

- Les métaux réagissent directement avec les enzymes antioxydantes contenant un groupement thiol, telles que la glutathion réductase (GR), la thiorédoxine (Trx) et les protéines du système Trx, la thiorédoxine réductase (TrxR) et la peroxirédoxine (Prx).

- Les métaux se lient à la protéine Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1 en anglais), conduit à l'activation de la voie Nrf2 (Yamamoto, Kensler and Motohashi, 2018), qui régule l'expression génique des enzymes impliquées contre le stress oxydant telles que l'hème oxygénase (HO-1), qui protège la cellule non seulement par son pouvoir oxydant, mais aussi par son pouvoir anti-inflammatoire.

- Les métaux peuvent induire l'activation de la protéine régulatrice lymphome 2 à cellules B (Bcl-2), ce qui peut conduire à l'apoptose par l'activation du canal de l'apoptose mitochondriale (MAC) (Samet *et al.*, 2019).

3.4. Effet de la fraction biologique

La fraction biologique contient les bactéries, les spores fongiques, le pollen et d'autres, et peut représenter environ 20% des PM dans des zones peuplées continentales (Matthias-Maser, Bogs and Jaenicke, 2000). Les bactéries semblent être les micro-organismes procaryotes les plus abondants dans les $PM_{2,5}$ et PM_{10} (Cao *et al.*, 2014), et les endotoxines peuvent atteindre des concentrations élevées, telles que 30 EU/mg de PM (Mueller-Anneling *et al.*, 2004). Les endotoxines sont associées à un constituant de la paroi cellulaire extérieure des bactéries gram-négatives. Ce terme décrit l'activité biologique des lipopolysaccharides (LPS). Des études réalisées au Mexique, ont montré que les PM_{10} induisent les plus fortes doses de TNF-α et d'IL-6, et une partie de ces effets était due aux endotoxines, car l'ajout d'un inhibiteur d'endotoxine a permis une diminution de la réponse. Schins et al., (2004) ont montré que les endotoxines présentes dans la fraction grossière des PM, était responsable des principales sécrétions d'IL-8 et TNF-α, après instillation intra-trachéale dans le poumon du rat. Une étude réalisée sur les microbes présents dans les $PM_{2,5}$ et PM_{10}, a conclu que tous les microbes ont montré des corrélations positives avec les marqueurs de cytotoxicité. De plus, l'augmentation du nombre de cellules apoptotiques est positivement corrélée avec les PM collectés de l'air l'intérieur, alors que pour les échantillons d'air extérieur, seulement les Streptomyces sp ont montré une corrélation similaire. Les microbes, à l'exception de Streptomyces sp ont montré une corrélation positive avec les niveaux du marqueur inflammatoire dans tous les échantillons (Happo *et al.*, 2014). Samake et al., (2017) ont étudié le potentiel oxydant des bioaérosols par le test de DTT. Les résultats montrent que les bioaérosols induisaient la production des ERO, avec des variations selon le type de micro-organismes et leur concentration. Les auteurs ont conclu que les spores fongiques produisaient jusqu'à 10 fois plus d'ERO que les cellules bactériennes. Pour les concentrations les plus élevées, les spores fongiques présentent autant de réactivité oxydante que le cuivre et la naphtoquinone, qui sont très redox actives.

3.5. Effet des ions hydrosolubles

Les sulfates et les nitrates peuvent exister individuellement sous forme de particules solides ou liquides, ou peuvent être adsorbés sur d'autres particules telles que des particules carbonées, les sels marins ou les particules de cendres. La surface d'une particule de sulfate peut elle-même être recouverte de métaux de transition ou de composés organiques. L'inhalation de ces aérosols acides, peut aboutir à un dépôt d'ions hydrogène dans les voies respiratoires, ce qui peut abaisser le pH si la capacité tampon du fluide pulmonaire est dépassée. Si le sulfate est complètement neutralisé en sulfate d'ammonium, le pH sera alors plus élevé que si le sulfate n'est que partiellement neutralisé, par exemple, à un rapport ammonium / sulfate de 1,5 ou 1. Les basses valeurs de pH des aérosols peuvent causer la dissolution des métaux, le stress oxydant et l'inflammation (Freedman, Ott and Marak, 2019). Les ions hydrosolubles ne sont pas directement toxiques, mais peuvent provoquer des effets indirects sur la santé en influant sur la formation de composés toxiques ou la modification de leur forme chimique. Il peut être mentionné le rôle de catalyseur d'ions hydrosolubles dans des réactions de formation des aérosols organiques secondaires, ou encore leur effet sur la solubilisation et donc l'augmentation de la biodisponibilité des métaux (Reiss *et al.*, 2007; Kelly and Fussell, 2012).

3.6. Effet cocktail

Plusieurs études ont évalué la possibilité d'avoir une réponse cellulaire qui résulte d'effets additifs, synergiques ou même des effets antagonistes entre les composés chimiques des PM. Pan et al., (2004) ont étudié la toxicité des particules diesel (DEP), à l'aide de tests de mesures du potentiel oxydant (DTT, AA, RPE), et à partir de mesures de dommages à l'ADN, en préparant les particules dans du tampon phosphate, et en faisant l'extraction des DEP dans l'acide, et dans le DCM-DMSO. Les auteurs ont montré que la toxicité pouvait être due à l'interaction des composés organiques et inorganiques redox actifs, ce qui produit des PM dont la réactivité chimique globale peut être différente de celle obtenue en considérant la somme des composés pris individuellement. Wilson et al., (2002) ont trouvé que la capacité du noir de carbone à générer des ERO *in vitro*, est renforcée par l'ajout de sulfate cuivrique,

de sulfate ferreux, ou de chlorure ferrique et ceci de manière synergique. Dans une étude récente, Lin and Yu, (2020) ont montré que l'ajout des acides carboxyliques et d'imidazole à des solutions de Fe (II) et de Cu (II), ont des effets différents sur la consommation de l'acide ascorbique et la formation des radicaux hydroxyles. Les acides carboxyliques augmentent les effets des métaux, tandis que les imidazoles les atténuent. Pushparajah et al., (2017) ont trouvé que l'incubation du benzo [a] pyrène avec soit du dibenzo [a, h] anthracène, ou du fluoranthène, dans des tranches de foie du rat, a conduit à une interaction synergique, dans la mesure où l'activité éthoxyrésorufin O-dééthylase était statistiquement plus élevée que les effets ajoutés, lorsque des tranches ont été incubées avec les composés individuels. Une autre étude portant sur les mélanges de benzo [a] pyrène, avec soit du dibenzo [a,l] pyrène, du dibenzo [a,h] anthracène, du benzo [b] fluoranthène, du fluoranthène ou du 1-méthylphénanthrène a été menée. Les mélanges de HAP ont montré un effet additif sur l'apoptose et sur le blocage du cycle cellulaire. La formation d'adduits à l'ADN dans les mélanges, était plus élevée que prévu sur la base des composés individuels, indiquant un effet synergique (Staal *et al.*, 2007). Des tests de mortalité cellulaire menés sur des cellules A549, ont montré que les cellules traitées avec un mélange de Mn et Fe présentaient une mortalité cellulaire significativement plus élevée (34,2 %) que celles traitées avec Fe seul (15,3 %) (Yuan *et al.*, 2019). Wu et al., (2012) ont étudié la cytotoxicité des ions métalliques sur les cellules primaires épithéliales endométriales humaines. Les résultats ont indiqué que le système Cu^{2+}+ Zn^{2+} présentait un effet antagoniste, et un effet synergique a été observé dans le système Cu^{2+}+ Ag^{+}. Yu et al., (2018) ont évalué les effets synergiques et antagonistes de l'interaction entre les métaux et les HULIS des PM, par le test DTT et la mesure de la génération de OH°. Les résultats ont montré un effet additif entre le Fe et les quinones dans la consommation de DTT, et un effet fortement synergique dans la génération d'OH°. L'élément Cu interagit de façon antagoniste avec les quinones à la fois au regard des données de consommation de DTT et que dans la génération d'OH°. Le Mn interagit en synergie avec les quinones dans l'oxydation du DTT mais de manière antagoniste dans la génération de OH°. L'évaluation des effets toxiques des PM est complexe et représente encore à ce jour un défi compte tenu des nombreuses interactions entre les composés chimiques renfermés dans les particules.

Objectifs et stratégie expérimentale de l'étude

De nos jours, la pollution de l'air représente un réel enjeu de santé publique, vu qu'elle touche la majorité des organes du corps humain, et l'immense majorité de la population mondiale. Il ne fait aujourd'hui plus aucun doute que particules fines ($PM_{2,5}$) sont responsables de nombreux effets sur la santé de l'Homme. Elles sont particulièrement impliquées dans les pathologies respiratoires étant donné que ces dernières peuvent pénétrer profondément dans le système respiratoire et atteindre les alvéoles pulmonaires.

Plusieurs études se sont intéressées à étudier la toxicité des PM, par des études épidémiologiques, *in-vivo*, *in-vitro*, ou encore à proposer un critère évalué par des méthodes chimiques acellulaires permettant de décrire leur toxicité potentielle. Le stress oxydant est l'un des mécanismes clés des événements toxicologiques sous-jacents déclenchés dans la cellule après exposition aux $PM_{2,5}$. Les $PM_{2,5}$ constituent un mélange hétérogène très complexe d'ions hydrosolubles, d'éléments majeurs et traces métalliques, de composés organiques hydrosolubles et non, comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques. Cependant, suivant la typologie des sites considérés et la nature des sources d'émission, les caractéristiques des particules varient. Ces dernières peuvent également influer sur la réponse cellulaire.

A ce jour, il subsiste un manque de connaissances sur les fractions/ constituants/ sources des PM qui contribuent le plus au stress oxydant. En effet, des constituants chimiques comme les hydrocarbures ou les métaux, qui peuvent plus ou moins se solubiliser dans le fluide pulmonaire (bio-accessibilité), sont connus pour être des acteurs majeurs dans le déclenchement de la réponse oxydative cellulaire. Il demeure cependant important de déterminer s'ils interviennent dans le déclenchement du stress oxydant sous leur forme solubilisée ou s'ils interagissent avec les cellules également/surtout à l'état particulaire. Ainsi, il demeure complexe de discriminer ce qui fait qu'une particule atmosphérique engendre un effet toxique : est-ce dû à la particule elle-même indépendamment de sa composition, à la fraction bio-accessible, organique, hydrosoluble, à la teneur en métaux ou en composés organiques,… ou encore à l'association de ses différentes caractéristiques?

C'est à ces questions que le présent projet tentera d'apporter des éléments de réponse.

Ce travail de thèse s'inscrit dans ce contexte, et vise alors à :

-Etudier la variation des valeurs de potentiel oxydant en fonction de la composition chimique des PM, et de leurs sources d'émission (locales et distantes) ;

- Etudier les déterminants de la réponse cellulaire en particulier le stress oxydant en recherchant le lien entre la composition chimique des particules, leurs différentes fractions et les effets observés ;

- Etudier le lien entre le potentiel oxydant et le stress oxydant.

Pour répondre aux objectifs de la thèse, une démarche expérimentale a été établie (Figure I-11). Ce travail est divisé en deux parties:

Tout d'abord, il s'agira d'étudier les variations des valeurs de OP en fonction de la composition chimique des PM, et de leurs sources d'émission (locales et distantes). Pour cela, nous avons considéré des échantillons de $PM_{2,5}$ sur filtres collectés à Dunkerque, et caractérisés dans des travaux précédents (Kfoury, 2013). Ces particules ont été extraites avec une solution Gamble, qui est un fluide pulmonaire synthétique, afin d'obtenir la fraction bioaccessible des particules. La mise au point des tests OP (DTT et AA) en version « microplaque » a été réalisée dans le cadre de la thèse, avant leur application sur la fraction bioaccessible des échantillons. Ces méthodes ont l'avantage d'être rapides et moins couteuses que les méthodes cellulaires, et pourraient se présenter comme un indicateur plus pertinent que la concentration des particules pour évaluer le potentiel toxique d'une exposition aux PM.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié les déterminants de la réponse cellulaire, en particulier lié au stress oxydant, et le lien entre la composition chimique des particules, leurs différentes fractions, et les effets toxiques observés.

Pour cela, la cytotoxicité (mesure de l'activité de la déshydrogénase mitochondriale (test WST-1), l'inflammation (mesure de l'IL-6), et le stress oxydant (quantification des ERO par la mesure des superoxydes et hydroperoxydes, d'adduits oxydatifs à l'ADN par quantification de la 8-OHdG, des atteintes à la membrane par quantification de la 8-isoprostane, et aux protéines par quantification des protéines carbonylées), ont été évalués sur des cellules pulmonaires BEAS-2B (lignée cellulaire humaine, immortalisée et d'origine non tumorale). Les cellules ont été exposées à différentes fractions d'échantillons de particules. Les échantillons choisis pour cette partie sont des échantillons de particules atmosphériques $PM_{2,5\text{-}0,3}$ collectés sous différentes influences -

Urbain, Trafic, Industries- et à différentes saisons pour le site Urbain. Afin de mieux comprendre les effets observés avec les $PM_{2,5-0,3}$ de composition complexe, des échantillons synthétiques tels que des oxydes métalliques purs ou mélanges, du noir de carbone ont également été étudiés en termes d'induction d'un stress oxydant et de potentiel oxydant. Les fractions (organique, hydrosoluble, PM total, PM débarrassées des fractions hydrosoluble et organique) de ces échantillons ont été considérées. La méthodologie adoptée permettra d'approfondir la relation entre les réponses cellulaires liées au stress oxydant, les valeurs de potentiel, et l'effet des différentes fractions de PM. Un des objectifs visés est de déterminer dans quelle mesure ces tests acellulaires sont capables de prédire le stress oxydant et les dommages qui en découlent.

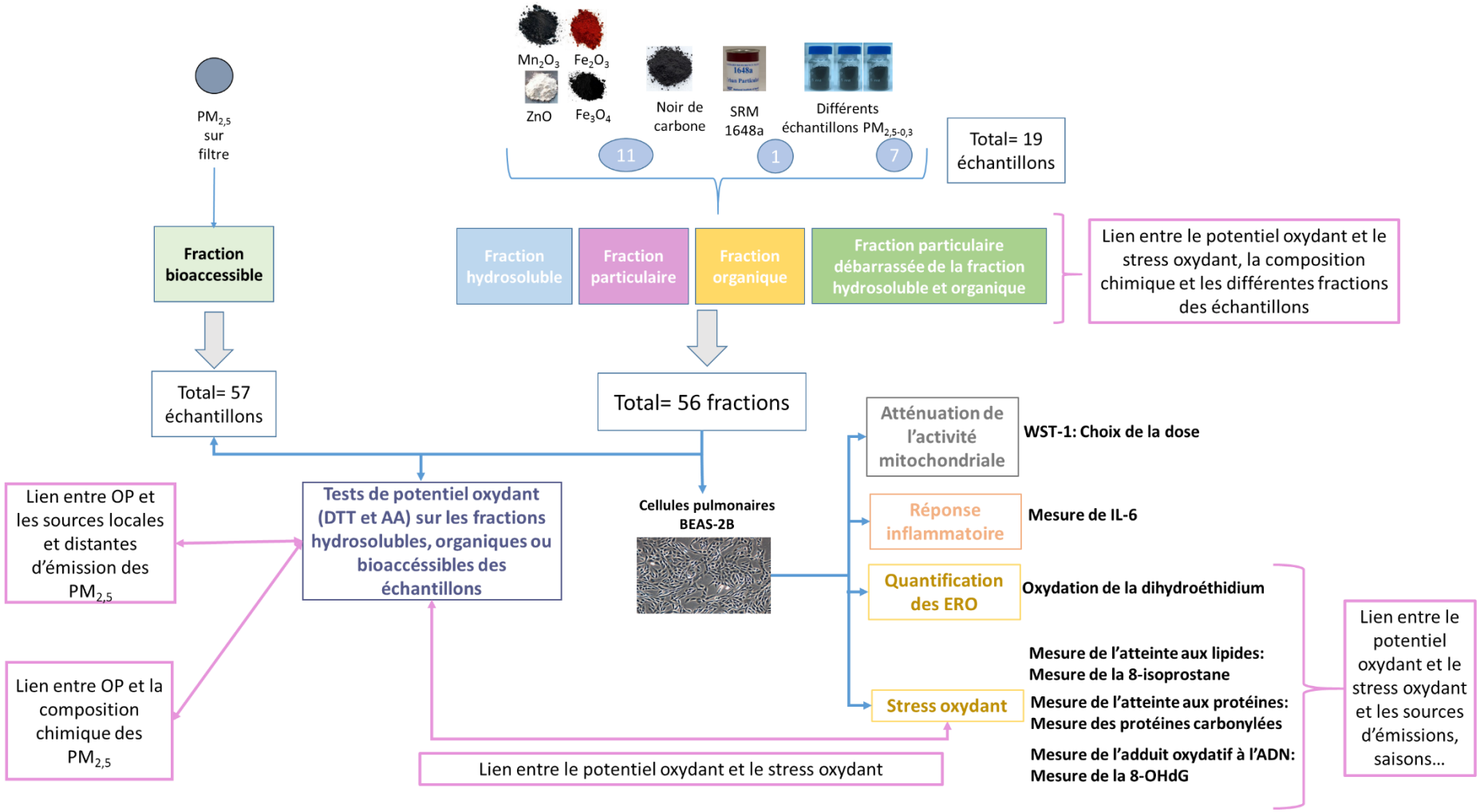


Figure I-11: Démarche expérimentale et objectifs de la thèse.

Chapitre II : Matériel et méthodes

Chapitre II : Matériel et méthodes

Introduction

Ce chapitre présente les différents matériels et méthodes utilisés afin de répondre aux objectifs de la thèse. Ici, nous évoquerons la stratégie utilisée pour la sélection des échantillons de particules $PM_{2,5\text{-}0,3}$ et le choix des échantillons synthétiques. Ce choix est basé sur les différences de propriété physicochimique des échantillons (sources d'émission, saisons, composition chimiques). L'étude d'échantillons synthétiques a été envisagée afin de mieux comprendre l'effet des composés chimiques au sein de la particule sur le potentiel oxydant et la réponse cellulaire.

Dans ce travail, nous proposons d'étudier le stress oxydant et le potentiel oxydant déclenchés par les différentes fractions des PM. Ainsi nous présenterons les protocoles de préparation de différentes fractions à partir de chaque échantillon: PM globale, fraction organique et fraction hydrosoluble des PM, PM débarrassée des fractions organiques et hydrosolubles, la fraction bioaccessible (obtenue dans une solution de Gamble qui mime un fluide pulmonaire synthétique).

Un volet important de cette thèse porte sur le développement d'un protocole de mesure du potentiel oxydant des PM en version microplaque. Nous détaillerons alors dans ce chapitre les optimisations et protocoles des différents tests de potentiel oxydant, qui permettent d'estimer la capacité des particules à produire des ERO.

Ensuite, nous allons décrire les protocoles des tests servant à évaluer la cytotoxicité des échantillons et à choisir une dose convenable, pour ensuite évaluer leur aptitude à induire un stress oxydant et une réponse inflammatoire.

1. Echantillons sélectionnés pour l'étude

Des échantillons de $PM_{2,5}$ prélevés sur filtre en zone industrielo-urbaine à Dunkerque ont été choisis pour l'étude de la relation du potentiel oxydant avec la composition chimique et les sources d'émission des particules.

Des échantillons $PM_{2,5\text{-}0,3}$ sous forme de particules libres (sans filtre), collectées dans le Nord de la France, sous différentes influences en des sites représentatifs des émissions du trafic routier, industrielles et urbaines, mais également pendant différentes saisons ont été sélectionnés pour ce travail. Ces échantillons permettent l'extraction de toutes les fractions des particules.

De plus, des échantillons synthétiques, servant à mimer les émissions industrielles, ont été aussi considérés. Ces derniers comprennent du noir de Carbone (Evonik Degussa, Printex U), et des oxydes métalliques (Fe_2O_3, Fe_3O_4, Mn_2O_3, ZnO), considérés seuls ou en mélange. Un échantillon certifié de particules atmosphériques urbaines (National Institute of Standards and Technology NIST SRM1648a), a été également sélectionné pour cette étude.

1.1. Echantillons de $PM_{2,5}$ considérés pour l'étude du potentiel oxydant

Nous avons considéré des échantillons de $PM_{2,5}$ collectés sur filtre et caractérisés pour leur composition chimique dans le cadre de la thèse d'Adib Kfoury (Kfoury, 2013). Ces $PM_{2,5}$ ont été prélevées dans le centre-ville de Dunkerque, lors de deux campagnes de prélèvements réalisées du 16 novembre au 31 décembre 2010, et du 10 mars au 30 avril 2011.

Le préleveur utilisé est un préleveur haut-volume (30 m^3/h) fabriqué par la société DIGITEL®: le DA-80. Ce dernier a été placé sur le toit du bâtiment universitaire « Lamartine » situé en centre-ville de Dunkerque. Deux types de filtres ont été utilisés, des filtres en cellulose pour l'analyse des ions et éléments, et des filtres en quartz pour la quantification du carbone. Afin d'étudier le potentiel oxydant, et la relation avec les sources d'émissions et la composition chimique, nous avons considéré 57 échantillons, notamment ceux qui présentaient des fortes concentrations en particules, et ceux qui montraient des contributions plus ou moins importantes des sources d'émissions identifiées. Concernant le site de prélèvement, ce dernier est influencé par les émissions du trafic routier, des

domestiques, des activités industrielles (métallurgie, raffineries de pétrole, cimenterie, chimie organique), d'un complexe sidérurgique intégré (ISW), et d'une aciérie électrique (ESP) (Kfoury *et al.*, 2016).

1.2. Echantillons de particules $PM_{2,5-0,3}$ considérés pour l'évaluation des effets sur les cellules pulmonaires BEAS-2B et le lien avec le potentiel oxydant

Nous avons considéré des échantillons de $PM_{2,5-0,3}$ collectés à milieu urbain à Dunkerque en différentes saisons ainsi qu'à Grande-Synthe (typologie industries) et Roubaix (typologie trafic routier) (Figure II-1). Ce sont des particules collectées par la technique d'impaction en cascades ne nécessitant par l'utilisation de filtres.

L'échantillonnage de $PM_{2,5-0,3}$ à Dunkerque et leur caractérisation chimique a été réalisée dans le cadre du projet : Environnement-Santé-Travail: « Biomarqueurs de toxicité de la pollution atmosphérique particulaire influencés par l'âge, PACATOX » (ANSES, 2014). L'échantillonnage des PM a été réalisé durant un an, du 19 mars 2014 au 18 mars 2015. A partir des prélèvements initiaux, cinq échantillons moyens de particules ont été constitués :

- Un échantillon moyen annuel (Urbain- Mixte) : 19 mars 2014 au 18 mars 2015
- Quatre échantillons saisonniers :
    - Urbain- Printemps : 19 mars au 21 juin 2014,
    - Urbain- Eté: 21 juin au 26 septembre 2014,
    - Urbain- Automne: 27 septembre au 17 décembre 2014,
    - Urbain- Hiver: 18 décembre 2014 au 18 mars 2015.

L'échantillon de $PM_{2,5-0,3}$ représentatif de l'influence des émissions industrielles a été collecté à Grande-Synthe. Le préleveur était localisé à proximité d'activités sidérurgiques et chimiques (vapocraquage, stocks pétroliers), sur le toit de la station ATMO Hauts-de-France, implantée à Grande Synthe. L'échantillonnage des $PM_{2,5-0,3}$ a eu lieu entre le 28 février 2017 et le 02 juin 2017. L'échantillon de $PM_{2,5-0,3}$ représentatif des émissions du trafic routier a été prélevé à Roubaix. Le préleveur a été placé sur le toit d'une station ATMO Hauts-de-France. L'échantillonnage a eu lieu entre le 02 mars 2017 et le 1er juin 2017. Ces échantillons ont été

caractérisés dans le cadre du projet Environnement-Santé-Travail: "Impact des $PM_{2,5}$ variant selon leur source (Trafic routier - Industries) sur la santé respiratoire. Approche in vitro (TRIPLER)" (ANSES, 2016).

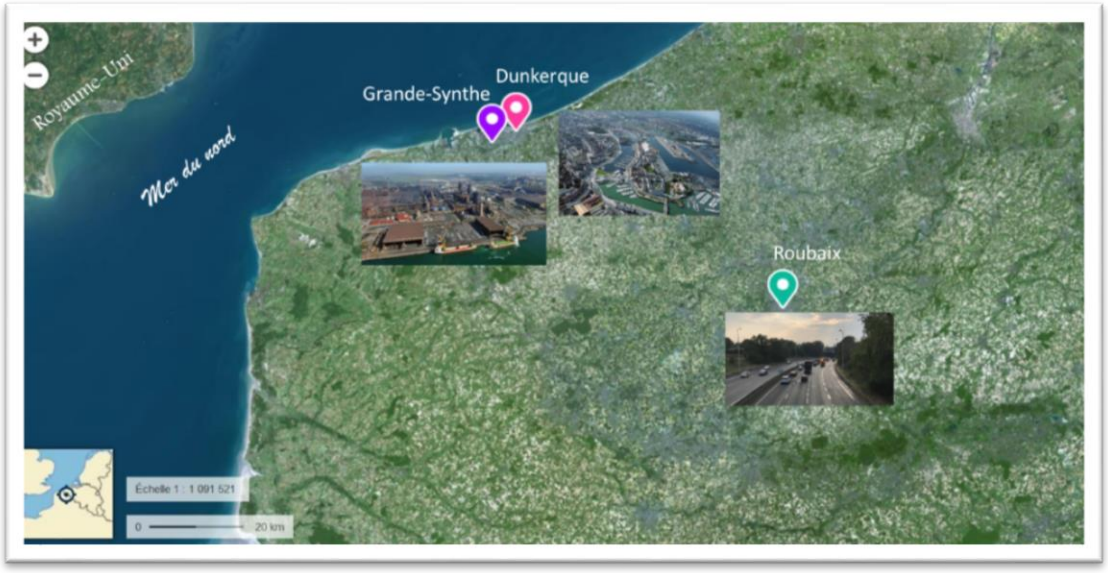


Figure II-1: Carte présentant les sites de prélèvement des échantillons de PM à Dunkerque, Grande-Synthe et Roubaix ; modifiée de www.geoportail.fr

Les $PM_{2,5\text{-}0,3}$ collectés à Dunkerque, Grande-Synthe et Roubaix ont été prélevées à l'aide d'un impacteur à cascades (Staplex® 235, TFIA, 68 m^3/h). Les particules sont récupérées en fonction de leur diamètre aérodynamique à l'aide d'un ensemble de plaques métalliques (étages) munies de fentes calibrées. Les particules qui possèdent une inertie suffisante s'écartent de la trajectoire du flux d'air et s'impactent sur les plaques, les autres sont dirigées à travers des fentes vers les étages inférieurs jusqu'à ce qu'elles acquièrent la quantité de mouvement suffisante pour se déposer.

Les analyses granulométriques des échantillons prélevées à Dunkerque ont montré que 98 % des particules ont un diamètre < 1 µm et 99,8 % d'entre elles ont un diamètre < 2,5 µm. Les données de répartition par taille indiquent que pour l'échantillon collecté à Roubaix et Grande-Synthe, 95% et 96% des PM ont un diamètre < 2,5 µm, respectivement.

L'échantillon certifié de particules atmosphériques urbaines (National Institute of Standards and Technology NIST SRM1648a) a été également sélectionné pour cette étude. Ces particules possèdent un diamètre moyen de 5,85 µm (National Institute of Standards & Technology, 2015).

1.3.Echantillons synthétiques

Différents oxydes métalliques, du noir de carbone, considérés seuls ou en mélange, ont été considérés dans ce travail, dans le but de simuler la composition des PM émises par l'activité sidérurgique et pour mieux comprendre les effets observés sur les échantillons réels. Le secteur de la sidérurgie à Dunkerque émet des particules riches en oxydes métalliques notamment à base de Cr, Cu, Fe, Mn, et Zn, de même que des composés carbonés (Kfoury, 2013). Pour cette raison, nous avons retenu différents oxydes métalliques et un échantillon de noir de carbone:

Fe_2O_3 et Fe_3O_4 : Le choix de ces deux composés est dû à la présence majoritaire de ces deux composés dans les PM prélevées à l'émission sur le site sidérurgique, et qui ont été identifiés par analyse par diffraction de rayons X (XRD) (Hleis *et al.*, 2013). Le composé Fe_2O_3 utilisé dans cette étude est fourni par la Société Honeywell Fluka™, (CAS : 1309-37-1, pureté = 95 %) et Fe_3O_4, par la Société Sigma –Aldrich (CAS :1317-61-9 ; pureté = 95 %).

Mn_2O_3 : Le Manganèse est parmi les éléments qui ont été identifiés dans les matières premières d'un site métallurgique et les poussières collectées à l'intérieur de l'aciérie (Hleis *et al.*, 2013). Le solide utilisé est un produit commercialisé par Sigma –Aldrich, (CAS : 1317-34-6 ; pureté = 99 %).

ZnO : Le Zn est fortement lié aux émissions de l'aciérie électrique (Ledoux *et al.*, 2006; Kfoury *et al.*, 2016). Le produit utilisé est fourni par la Société Acros (CAS : 1314-13-2 ; pureté = 99 %).

Le noir de carbone (NC) : Le noir de carbone utilisé est le composé Printex U (Evonik Degussa) obtenu par un procédé à la flamme. Dans cet échantillon, une caractérisation a

montré que les particules sont liées entre elles, et se présentent surtout comme des agglomérats pouvant atteindre jusqu'à 10 micromètres, ce qui est comparable avec les suies réelles. Cependant, ces agglomérats de suies une fois placés dans un solvant sous l'effet des Ultra-Sons, se dispersent en particules élémentaires, dont le diamètre varie entre 80 et 120 nm (Courcot *et al.*, 2009).

2. Préparation des différentes fractions

- Les échantillons de particules ont été étudiés en les considérant entières ou en en considérant spécifiquement certaines de leurs fractions. Ainsi, nous nous sommes intéressés aux particules globales et à 3 fractions:
- la fraction hydrosoluble,
- la fraction organique,
- la fraction particulaire débarrassée des fractions hydrosoluble et organique.

2.1. Fraction hydrosoluble

Une masse de particules (60 mg de chaque échantillon réel / 200 mg de chaque échantillon synthétique) est extraite dans un tube conique en verre, avec 3 mL d'eau ultra pure, soumis aux ultrasons pendant 20 minutes. Ensuite, les tubes sont centrifugés pendant 10 minutes à 4°C et à 2500 g. Le surnageant est récupéré dans un flacon à scintillation en polyéthylène. Le culot de particules est de nouveau remis en suspension dans l'eau ultra-pure, et les étapes de récupération sont répétées répétés deux fois, de façon à extraire l'ensemble des composés hydrosolubles (Landkocz *et al.*, 2017). Le volume final de surnageant récupéré est de 15 mL. Enfin, l'extrait aqueux est filtré sur un filtre seringue en nylon (Grosseron ; 0,2 µm ; 25 mm), et conservé à -18 °C jusqu'à utilisation. Il représente la fraction hydrosoluble des PM, et a une concentration moyenne de 5 et 15 mg éq PM/mL pour les échantillons réels et synthétiques, respectivement.

2.2.Fraction organique

Une masse de particules (60 mg de chaque échantillon réel / 200 mg de Noir de carbone ou SRM1648a), est extraite dans un tube conique en verre, avec 3 mL de dichlorométhane (DCM), soumis aux ultrasons pendant 20 minutes. Ensuite, les tubes sont centrifugés pendant 10 minutes, à 4°C, et à 2500 g. Le surnageant est récupéré dans un vial en verre ambré de 20 mL. Le culot de PM est de nouveau remis en suspension dans le DCM, et ces étapes sont répétées 2 fois, pour extraire toute la fraction organique. Ensuite, l'extrait obtenu est concentré sous flux d'azote, en évaporant à sec (à la goutte), puis un changement de solvant est opéré. A cette fin, un volume de diméthyl sulfoxide (DMSO) est ajouté au résidu de manière à avoir une concentration finale moyenne de 35 mg/mL. L'extrait organique est transféré dans des vials en verre ambré de 2 mL, et conservé à -18 °C jusqu'à utilisation.

2.3. Particules débarrassées des fractions hydrosoluble et organique

Une partie des PM débarrassées de la fraction organique (25 mg des échantillons réels/ 100 mg du noir de carbone et du SRM 1648a) est extraite avec de l'eau ultra-pure selon le protocole décrit en 2.1 pour obtenir la fraction particulaire débarrassée des fractions organique et hydrosoluble. A la fin, le culot est séché à la température ambiante sous une hotte à flux laminaire, et conservé à -18 °C jusqu'à utilisation.

2.4.Fraction bioaccessible

Nous nous intéressons également aux espèces bioaccessibles des particules, pouvant se solubiliser dans le fluide pulmonaire. La solution de Gamble (pH= 7,4) est parmi les fluides pulmonaires synthétiques (SLF) les plus utilisés. Il représente le liquide interstitiel dans le poumon, et a été choisi comme solvant pour l'extraction des $PM_{2,5}$ afin de se rapprocher des conditions physiologiques. La solution Gamble, a été préparée fraichement avant utilisation, à partir de réactifs de qualité analytique et d'eau ultra-pure. Les composés ont été mélangés en suivant l'ordre indiqué dans le Tableau II-1 afin d'éviter la précipitation de sels. Le citrate a

été utilisé à la place des protéines, et l'acétate à la place des acides organiques (Colombo, Monhemius and Plant, 2008). Le pH de la solution de Gamble a été ajusté à 7,4 en ajoutant goutte à goutte de l'acide chlorhydrique (HCl à 10 %) (Wragg and Klinck, 2007) ou des gouttes de 1M de soude (NaOH) (Caboche *et al.*, 2011).

Tableau II-1 :Composition de la solution Gamble (Colombo, Monhemius and Plant, 2008).

Composés	Formule	Concentration (g/L)
Chlorure de magnésium	$MgCl_2$	0,095
Chlorure de sodium	NaCl	6,019
Chlorure de potassium	KCl	0,298
Hydrogénophosphate de sodium	Na_2HPO_4	0,126
Sulfate de sodium	Na_2SO_4	0,063
Chlorure de calcium dihydraté	$CaCl_2\ 2H_2O$	0,368
Acétate de sodium	$C_2H_3O_2Na$	0,574
Hydrogénocarbonate de sodium	$NaHCO_3$	2,604
Citrate de sodium dihydraté	$C_6H_5Na_3O_7.2H_2O$	0,097

Les $PM_{2,5}$ collectés sur filtres sur Dunkerque (57 échantillons) ont été sélectionnés pour cette extraction. 1/10 de chaque filtre en cellulose, contenant en moyenne 1394 µg de $PM_{2,5}$ (min = 86 µg; max = 4523 µg) a été extrait dans un tube en verre de 15 mL, contenant 14 mL de la solution Gamble. Le volume de solution a été choisi de manière à respecter les conditions réelles d'exposition humaine et éviter les phénomènes de saturation et de compétition entre les espèces. Pour ces raisons, il convient de respecter un ratio solide /liquide (S/L) compris entre 1/500 et 1/ 50000 (g/mL) (Caboche *et al.*, 2011).

Les tubes d'extraction ont été enrobés de papier aluminium pour bien les isoler et éviter leur refroidissement, placés sur une table oscillante thermostatée, et agités à 37 °C pendant 24 h, à une vitesse d'agitation de 250 oscillations/min (Figure II-2). Les suspensions ont été filtrées à l'aide de filtres en nylon de porosité 0,45 µm, et les surnageants ont été placés dans des flacons à scintillation, et conservés à -18 °C.

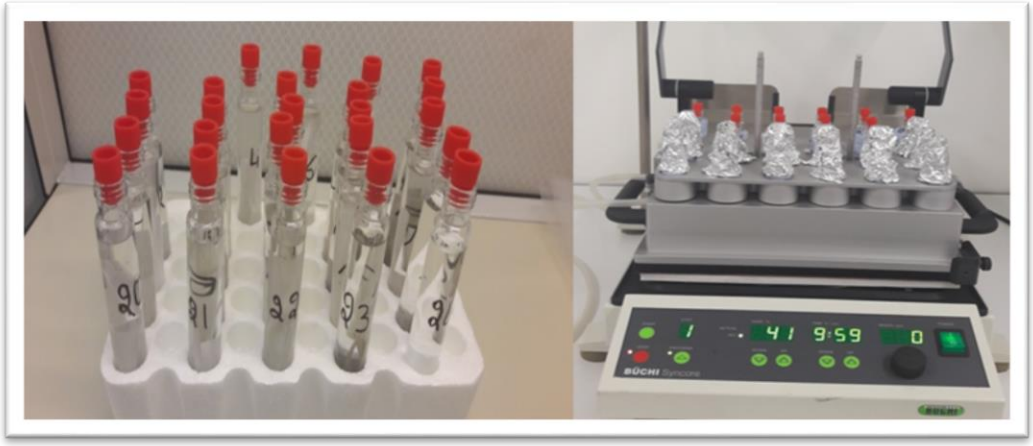


Figure II-2: Extraction des $PM_{2,5}$ sur filtre par la solution Gamble.

3. Codification des échantillons de particules/fractions considérés

Pour alléger la lecture des graphiques présentant les résultats, une codification a été adoptée pour chacun des échantillons. Les particules globales ($PM_{2,5\text{-}0,3}$), les extraits organiques et hydrosolubles, et les particules débarrassées de la fraction organique et hydrosoluble, sont symbolisées respectivement par PM, EO, Hyd, et dPM.

Pour les échantillons synthétiques, les codes sont relatifs à la composition chimique de l'échantillon ainsi qu'à la fraction étudiée, avec Fe2 pour Fe_2O_3, Fe3 pour Fe_3O_4, Zn pour ZnO, Mn pour Mn_2O_3 et NC pour le noir de carbone (Printex U).

Pour les échantillons de $PM_{2,5\text{-}0,3}$, les codes contiennent une première lettre symbolisant la typologie du site de prélèvement de l'échantillon (U: site sous influence des émissions urbaines, T : site sous influence des émissions du trafic routier, et I ; site sous influence des émissions industrielles). Pour les échantillons urbains, la première lettre est suivie par une deuxième symbolisant la saison de prélèvement des $PM_{2,5\text{-}0,3}$ (A : automne, H : hiver, P : printemps ; E : été et M : mixte). Enfin la fraction étudiée est précisée comme le cas des échantillons synthétiques. Les Tableau II-2 et Tableau II-3 résument les codes des échantillons synthétiques et réels utilisés sur les représentations graphiques.

Tableau II-2: Codes des échantillons synthétiques de particules.

Echantillon	Fraction hydrosoluble	Particules synthétiques	Particules après extraction
Fe_2O_3	Fe2-Hyd	Fe2-PM	
Fe_3O_4	Fe3-Hyd	Fe3-PM	
$Fe_2O_3 + Fe_3O_4$	Fe2/Fe3-Hyd	Fe2/Fe3-PM	
Mn_2O_3	Mn-Hyd	Mn-PM	
$Fe_2O_3 + Fe_3O_4 + Mn_2O_3$	Fe2/Fe3/Mn-Hyd	Fe2/Fe3/Mn-PM	
ZnO	Zn-Hyd	Zn-PM	
$Fe_2O_3 + Fe_3O_4 + ZnO$	Fe2/Fe3/Zn-Hyd	Fe2/Fe3/Zn-PM	
$Fe_2O_3 + Fe_3O_4 + Mn_2O_3 + ZnO$	Fe2/Fe3/Mn/Zn-Hyd	Fe2/Fe3/Mn/Zn-PM	
$Fe_2O_3 + Fe_3O_4 + Mn_2O_3 + ZnO$ + Noir de carbone	Fe2/Fe3/Mn/Zn/NC-Hyd	Fe2/Fe3/Mn/Zn/NC-PM	
$Fe_2O_3 + Fe_3O_4 + Mn_2O_3 + ZnO$ + Noir de carbone(dEO-PM)	Fe2/Fe3/Mn/Zn/NC(dEO-PM)-Hyd	Fe2/Fe3/Mn/Zn/NC(dEO-PM)-PM	
Noir de carbone	NC-Hyd	NC-PM	NC-dPM

Tableau II-3: Codes des échantillons de particules.

Echantillon	Site de prélèvement	Période de prélèvement	Typologie	Fraction hydrosoluble	Fraction organique	Particules globales	Particules après extraction
Grande-Synthe-industries	Grande-Synthe	28/02/2017 - 02/06/2017 (Printemps)	I	I-Hyd	I-EO	I-PM	I-dPM
Roubaix-Trafic	Roubaix	02/03/2017 - 01/06/2017 (Printemps)	T	T-Hyd	T-EO	T-PM	T-dPM
Urbain-Mixte	Dunkerque	19/03/2014 - 18/03/2015 (Annuel)	U	U-M-Hyd	U-M-EO	U-M-PM	U-M-dPM
Urbain-Printemps	Dunkerque	19/03/2014 - 21/06/2014 (Printemps)	U	U-P-Hyd	U-P-EO	U-P-PM	U-P-dPM
Urbain-Eté	Dunkerque	21/06/2014 - 26/09/2014 (Été)	U	U-E-Hyd	U-E-EO	U-E-PM	U-E-dPM
Urbain-Automne	Dunkerque	27/09/2014 - 17/12/2014 (Automne)	U	U-H-Hyd	U-A-EO	U-A-PM	U-A-dPM
Urbain-Hiver	Dunkerque	18/12/2014 - 18/03/2015 (Hiver)	U	U-H-Hyd	U-H-EO	U-H-PM	U-H-dPM
SRM 1648a			U	SRM-Hyd	SRM-EO	SRM-PM	SRM-dPM

4. Mesure du potentiel oxydant

4.1. Test au Dithiotreitol (DTT)

4.1.1. Principe

Le test basé sur la consommation de DTT a été utilisé dans le but d'évaluer le potentiel oxydant des particules. Ce test évalue la capacité des espèces redox actives des PM à transférer des électrons à l'oxygène dissous (Kumagai *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2003). En absence de composés rédox actives, le DTT possède un pouvoir réducteur vis-à-vis de l'oxygène, aboutissant à la formation de H_2O_2. Les espèces rédox-actives présentes dans les particules oxydent le DTT en DTT-disulfure, et catalysent la réduction des espèces oxygénées en ERO telles que l'anion superoxyde (O_2^-) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Le DTT simule alors les agents réducteurs biologiques (NADH et NADPH) (Verma *et al.*, 2014; Nicolas *et al.*, 2015). Lorsque le 5,5's-Dithio-bis-(2-acide nitrobenzoïque) (DNTB ou réactif d'Ellman) est ajouté au milieu réactionnel, le DTT restant réagit avec le DTNB, générant du DTT-disulfure et de l'acide 2-nitro-5-thiobenzoïque (TNB) (Figure II-3). Ce dernier est quantifié en mesurant son absorbance par spectrophotométrie à la longueur d'onde de 412 nm, et est proportionnel à la quantité restante de DTT (Visentin *et al.*, 2016).

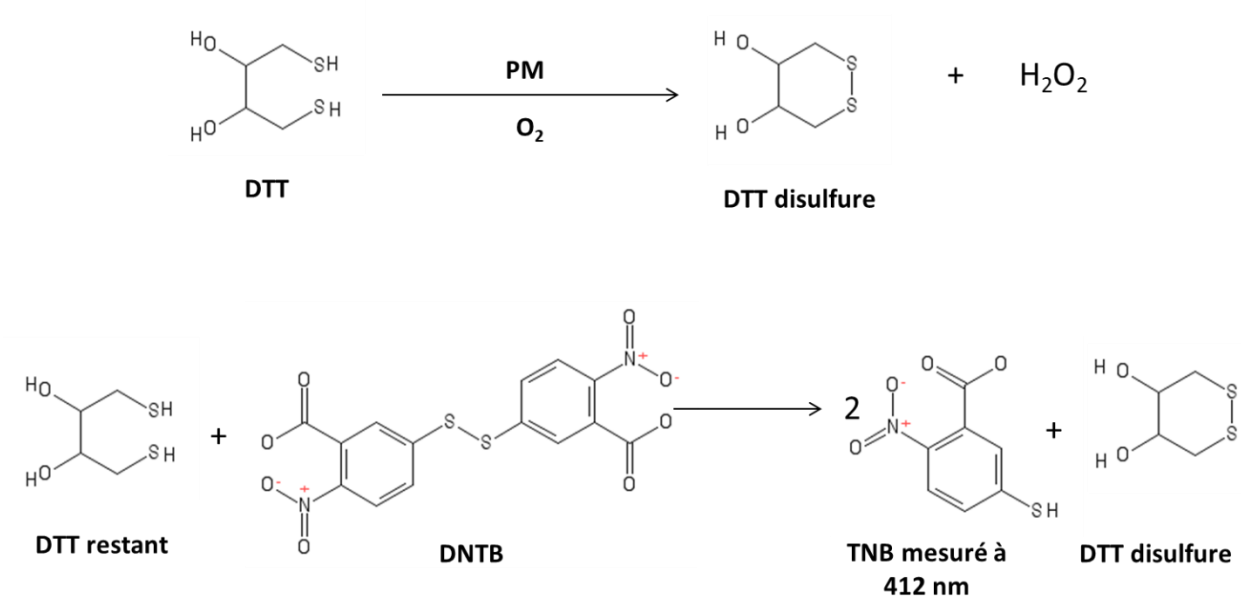


Figure II-3: Oxydation du Dithithreitol (DTT) par les espèces rédox actives des PM.

Le protocole utilisé est adapté de Calas *et al.*, (2017) et Perrone et al., (2015) et a été optimisé en version microplaque. Pour effectuer la mesure de la vitesse de consommation de DTT, il faut alors au départ préparer les solutions mères de DTT, DNTB de façon à avoir des résultats reproductibles et répétables tout au long de la mesure.

4.1.2. Optimisation du test au Dithiothréitol

Ce test n'avait jamais été réalisé au laboratoire et a nécessité une optimisation tout d'abord concernant la préparation et la conservation des solutions utilisées, puis au niveau du protocole de mesure.

4.1.2.1. Nature du solvant

L'optimisation du choix du solvant pour la préparation des solutions de DTT et DNTB a été réalisée. Dans la littérature, le DTT est souvent préparé dans du tampon phosphate salin (PBS) (Perrone *et al.*, 2015), et le solvant est parfois traité à la résine Chelex 100 avant l'ajout du DTT (Visentin *et al.*, 2016). Lors des premiers essais réalisés, le DTT a été préparé dans l'eau ultra-pure, et il a été constaté que la concentration de DTT décroissait dans le temps, même en absence de particules.

Afin de choisir un solvant qui permette d'obtenir une solution mère de DTT stable, nous avons considéré quatre solvants différents qui sont l'eau ultra-pure, eau ultra-pure traitée au Chelex, PBS 1x, et PBS 1x traité au Chelex. Nous avons ensuite suivi la concentration en DTT dans le temps (jusqu'à 35 min), en ajoutant tous les réactifs (PBS, DTT, DNTB) sauf les particules. La concentration initiale de DTT dans les puits était de 0,05 mM. La Figure II-4 montre que lorsque le DTT est préparé dans de l'eau ultra-pure, et dans les deux solvants traités au Chelex, la concentration de DTT diminue dans le temps et est quasiment nulle après 25 minutes. Dans le cas du PBS non traité au Chelex, la différence entre la concentration de départ et la concentration après 35 minutes est inférieur à 10%. En comparant le DTT non traité avec celui traité au Chelex, nous pouvons dire que le DTT est probablement oxydé par certains composés lors de ce traitement. En comparant le PBS avec l'eau traitée ou non au

Chelex, nous pouvons dire que la stabilité du pH à 7,4 lors de l'utilisation du PBS joue probablement un rôle vis-à-vis de la stabilité de la solution.

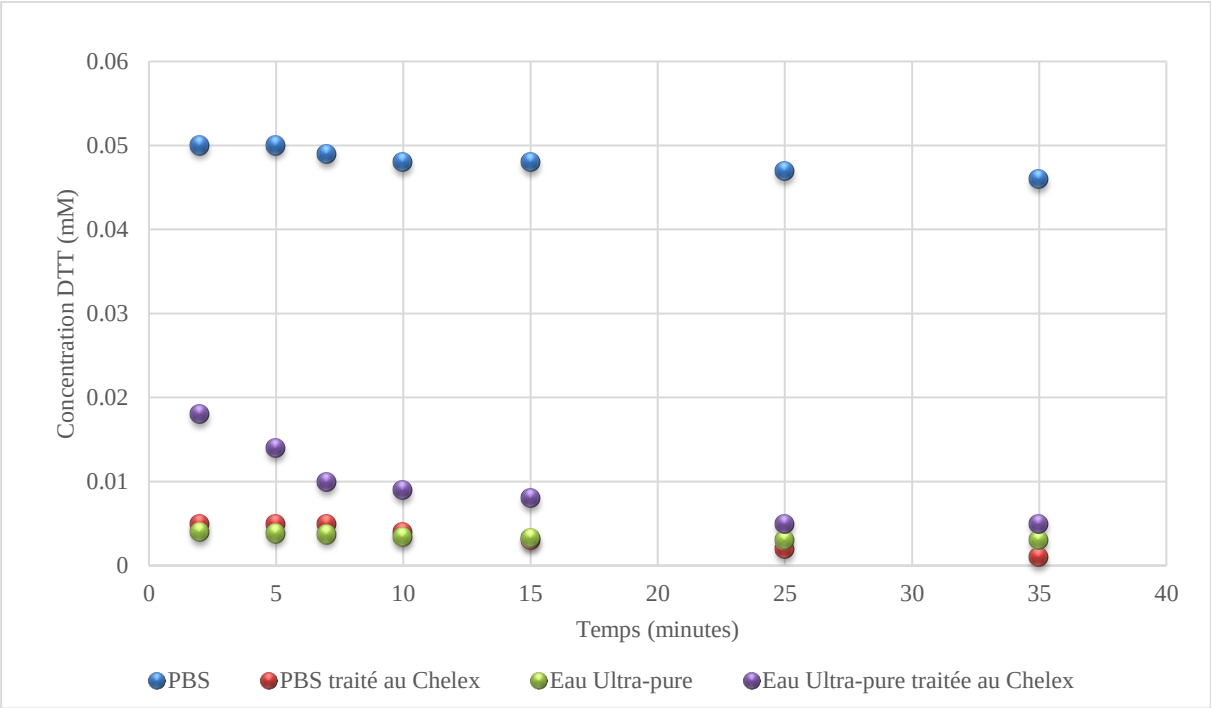


Figure II-4: Etude de la stabilité de DTT dans différents solvants.

Ainsi, nous avons choisi de préparer la solution de DTT dans le PBS 1x pour tous les tests; ces conditions permettant de conserver de manière satisfaisante la concentration de DTT durant le temps de l'expérience.

4.1.2.2. Conservation

En pratique, nous comptions utiliser une solution mère de DTT à diluer le jour de chacune des expériences. Il fallait donc préalablement s'assurer que la concentration de cette solution mère était stable dans le temps.

Après avoir choisi le solvant le plus adéquat vis-à-vis de la stabilité du DTT, les conditions de stockage et de conservation des solutions mères ont été évaluées. Une solution mère de DTT (4 mM) a été préparée dans du PBS, et divisée en petits volumes dans des vials

en verre ambré. Une partie a été conservée à 4 °C, et une partie congelée à -18 °C. Avant chaque test, un vial était retiré du réfrigérateur/congélateur, remis à la température ambiante, et son contenu était dilué au dixième avec du PBS 1x (concentration solution fille= 0,4 mM). L'absorbance de ces solutions fraichement préparées à partir de solutions mères conservées jusqu'à 14 jours a été mesurée, et convertie en concentration de DTT. La solution mère de DTT congelée est apparue stable jusqu'à 14 jours (sa concentration décroit légèrement), tandis que celle conservée à 4 °C a vu sa concentration diminuer d'un jour à l'autre, arrivant à presque 2 mM après 7 jours (Figure II-5). En conséquence, les solutions mères préparées ont alors été stockées au congélateur à -18 °C en attendant les analyses. Pour autant, avant chaque analyse, une mesure d'absorbance a été réalisée sur la solution pour s'assurer de sa bonne conservation.

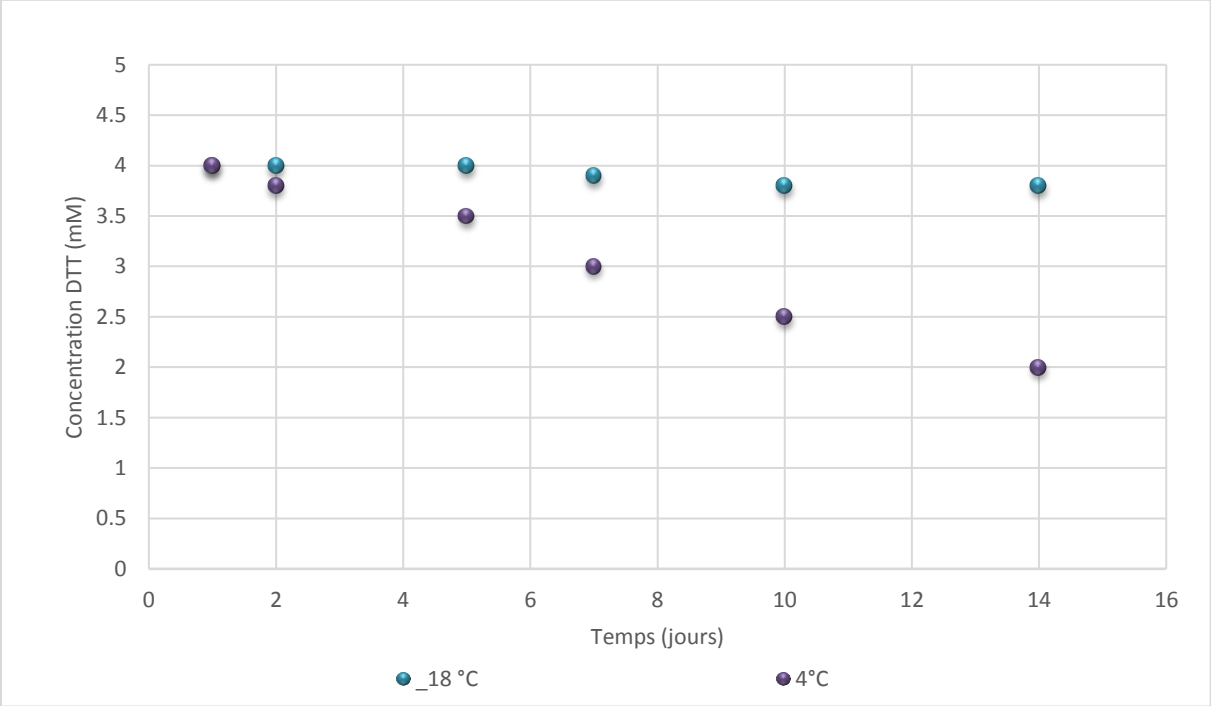


Figure II-5: Etude de la stabilité de la solution mère de DTT conservée à la température de 4°C et-18 °C.

4.1.3. Protocole de mesure

Les solutions mères de DTT et DNTB ont été préparées à une concentration de 4 mM et 1,5 mM, respectivement, dans du PBS 1x. Étant donné que les deux solutions sont sensibles à

la lumière (Damodaran, 1985; Eyer *et al.*, 2003), et instables à température ambiante, elles ont été conservées dans des flacons en verre ambré, et à la température de -18 °C.

Les mesures OP-DTT ont été effectuées dans des plaques noires 96 puits (Costar, 96 puits, noire avec fond plat transparent REF 3631). Premièrement, 120 µL de PBS (1x; pH = 7,4) et 40 µL d'extrait de particules (ou blanc, ou témoin positif), sont déposés dans les puits de la plaque. La plaque a ensuite été incubée à 37 °C pendant 10 minutes sous faible agitation. 25 µL de DTT (0,4 mM) ont ensuite été ajoutés pour initier la réaction d'oxydation. Au temps initial et après l'incubation pendant 5, 10, 20, 30, 45 et 60 minutes, 15 µL de DTNB (1,5 mM) ont été ajoutés dans les puits correspondants, pour le faire réagir avec le DTT restant, ce qui aboutit à la formation de du TNB. Après 10 minutes d'incubation à 37 °C, l'absorbance du TNB a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre UV–Visible (Thermo Fisher Scientific, Oy Ratastie 2, FI-01620 Vantaa, Finlande) à une longueur d'onde de 412 nm. Cette absorbance est proportionnelle à la concentration en DTT restant.

La 1,4-Naphtoquinone (1,4 NQ; 100 µM) a été utilisée comme contrôle positif. L'étalonnage est réalisé avec des concentrations connues de DTT dans les puits (0, 0,01, 0,02 0,03, 0,04 et 0,05 mmol/L). La vitesse de consommation de DTT (mmol /L /min) est calculée en utilisant la pente de la régression linéaire des 7 points de la courbe de variation de la concentration de DTT en fonction du temps (Figure II-6). Après soustraction de la pente du blanc, OP-DTTm et OP-DTTv ont été calculés, en divisant la valeur de la pente par la masse de $PM_{2,5}$ dans le puit, ou le volume d'air propre à cette masse, respectivement. Les échantillons sont analysés en triplicats, et les résultats sont présentés sous forme de moyennes des trois réplicats.

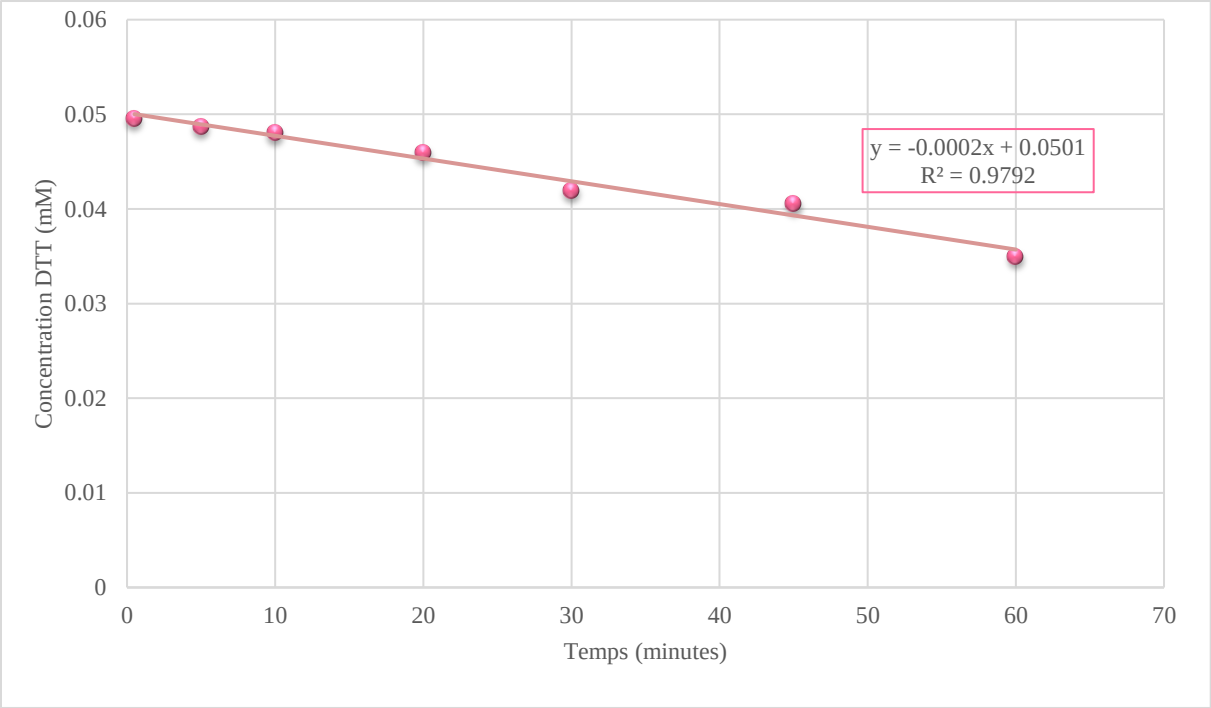


Figure II-6: Exemple de courbe représentant la variation de la concentration en DTT (mM) en fonction du temps pour un échantillon de particules.

4.2.Test à l'Acide Ascorbique (AA)

4.2.1. Principe

L'acide ascorbique (AA) est un réducteur présent dans le fluide épithélial pulmonaire avec d'autres antioxydants comme le glutathion réduit (GSH) et l'acide urique (UA). Étant donné que l'AA réagit de la même manière, qu'il se trouve avec un mélange de ces antioxydants ou seul, l'AA peut être utilisé seul, comme une méthode simplifiée pour l'étude du potentiel oxydant (Zielinski *et al.*, 1999). Lorsque l'acide ascorbique est ajouté aux extraits des particules, les espèces rédox-actives des particules oxydent l'AA en acide déshydroascorbique, et catalysent la formation des ERO en transférant un électron aux molécules d'oxygène (Figure II-7).

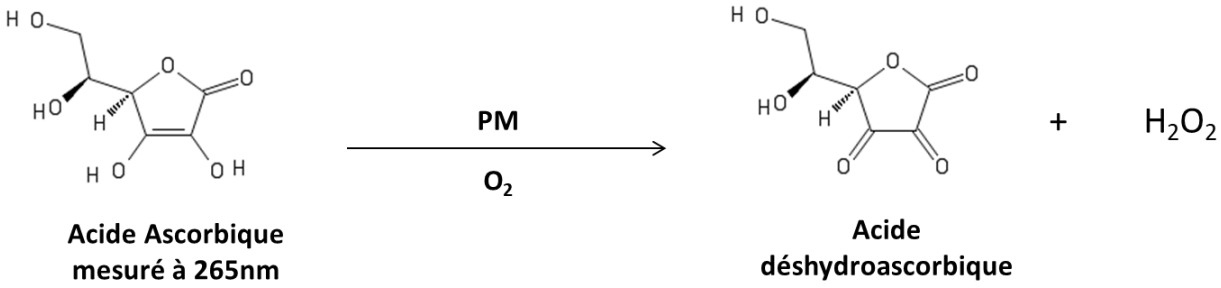


Figure II-7: Oxydation de l'acide ascorbique par les espèces rédox actives des PM pour la mesure du potentiel oxydant.

4.2.2. Optimisation du test à l'acide ascorbique

Afin de choisir le solvant qui permet d'avoir une meilleure stabilité de l'AA, l'absorbance de deux solutions d'AA de concentration 1 mM, la première étant préparée dans l'eau ultra-pure et la deuxième dans le PBS 1x, a été mesurée durant 2 heures, à la longueur d'onde de 265 nm.

La Figure II-8 montre que la vitesse de décroissance de l'absorbance, et donc de la concentration de l'AA en fonction du temps parait plus rapide lorsqu'il est préparé dans le PBS, car la pente obtenue en présence de PBS (0,0034), s'avère être 2 fois plus importante que lorsque AA est préparé dans l'eau ultra-pure (pente = 0,0017). Il peut être conclu que l'acide ascorbique dans l'eau ultra-pure est plus stable que lorsqu'il est introduit dans le PBS, au cours des 2 h de mesure. Par la suite, l'eau sera le solvant choisi pour préparer la solution d'acide ascorbique.

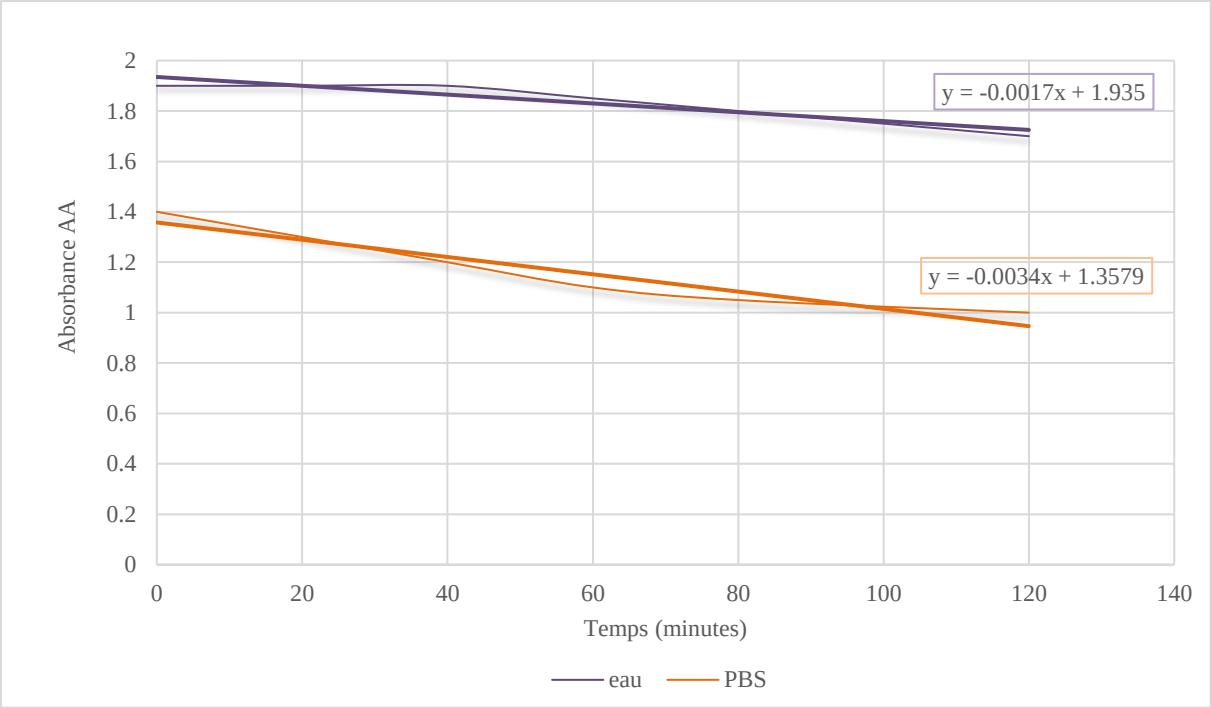


Figure II-8: Comparaison de la stabilité de l'acide ascorbique solubilisé dans l'eau Ultra-pure et le PBS.

4.2.3. Protocole de mesure

La solution mère d'AA a été préparée dans l'eau ultra-pure, et stockée à -18 °C en raison de son instabilité à température ambiante (Bode, Cunningham and Rose, 1990).

Les tests ont été réalisés dans des plaques 96 puits transparentes aux UV (Greiner bio-one UV-Star; REF: 655801). 160 µL d'extrait de particules ont été déposés dans chaque puits de la plaque, puis cette dernière a été incubée pendant 5 minutes à 37 °C, sous faible agitation. Ensuite, 40 µL de solution d'AA (1 mM) ont été ajoutés dans chaque puits, et la plaque a été agitée pendant 1 minute à 37 °C pour l'homogénéiser. Enfin, l'absorbance a été mesurée toutes les 2 minutes pendant 2 heures à 265 nm (longueur d'onde qui donne une absorbance maximale pour AA) (Jung and Wells, 1998). Pour les mesures, un spectrophotomètre (Thermo Fisher Scientific, Oy Ratastie 2, FI-01620 Vantaa, Finlande) a été utilisé et la plaque a été automatiquement secouée avant chaque mesure (Yang *et al.*, 2014).

La 1,4-Naphtoquinone (1,4 NQ; 100 µM) a été utilisée comme contrôle positif. Une gamme d'étalonnage a été réalisée (0, 0,05, 0,1, 0,15, et 0,2 mmol/L). Une courbe représentant la variation de la concentration en acide ascorbique en fonction du temps est

tracée pour chaque échantillon (Figure II-9). La pente de la partie linéaire de la courbe représente la vitesse de consommation de l'AA. Après soustraction de la pente du blanc, OP-AAm et OP-AAv ont été calculés en utilisant la même méthode utilisée pour le test de DTT.

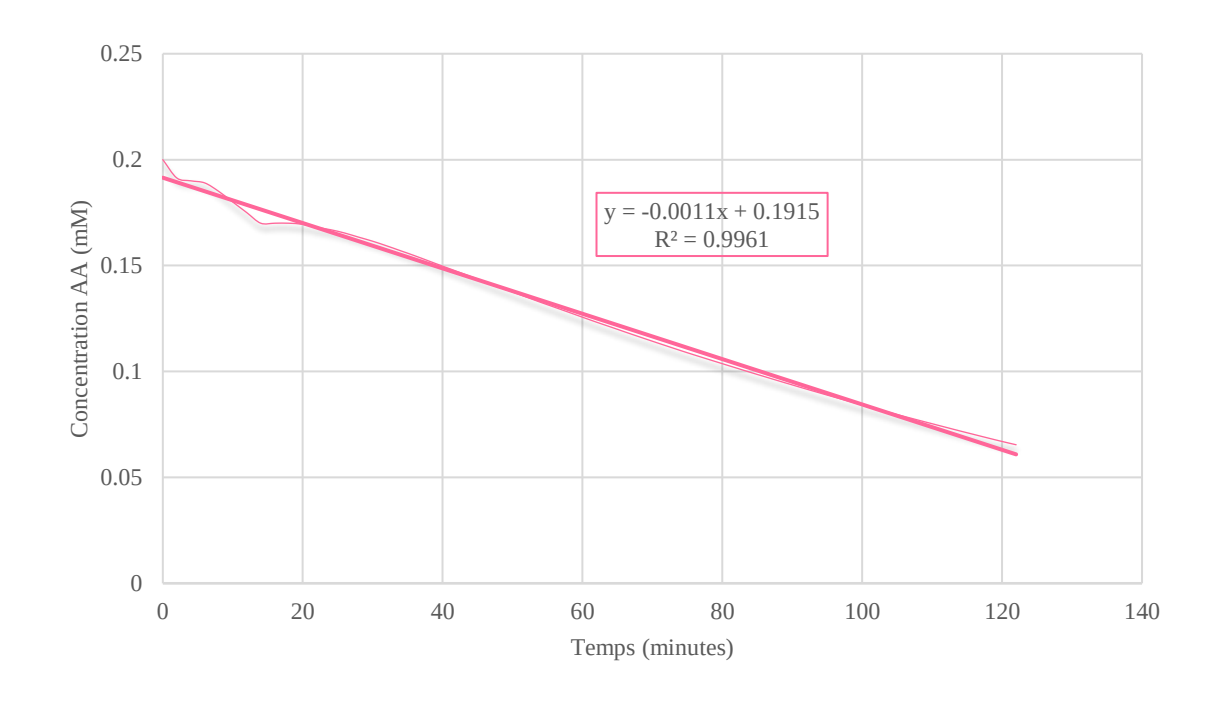


Figure II-9: Exemple de courbe représentant la variation de la concentration en AA (mM) en fonction du temps pour un échantillon de particules.

5. Evaluation de la toxicité des échantillons par les tests cellulaires

5.1. Culture et exposition des cellules

5.1.1. Culture cellulaire

La lignée cellulaire BEAS-2B a été utilisée pour l'ensemble des tests cellulaires. Ce sont des cellules épithéliales bronchiques humaines obtenues à partir d'un patient non cancéreux, puis immortalisées par transfection au virus hybride AD12-SV40. La culture des cellules a été faite dans des plaques 96 puits (Corning™ CellBIND™) dans des flasques T75 ou T150 cm^2 (Corning™ CellBIND™) en utilisant le LHC9 (Gibco™) comme milieu de

culture, et en ajoutant pour les expositions 1% de fongizone (amphotericin B) et 1% d'antibiotique (pénicilline-streptomycine) afin d'inhiber le développement bactérien et/ou fongique en raison de la présence potentielle d'une fraction biologique dans les particules atmosphériques.

5.1.2. Exposition des cellules

Les solutions contenant le toxique (particules et extraits) sont préparées le jour même de l'exposition des cellules dans du milieu de culture. La solution la plus concentrée (par exemple 96 µg/cm^2 pour les tests de cytotoxicité) est préparée en un premier temps, et à partir de cette dernière, les autres solutions moins concentrées (48, 24, 12, et 6 µg/cm^2) sont préparées en réalisant des dilutions en cascade. Les cellules sont alors exposées à ces suspensions ou solutions pour 48 h, avant récupération des cellules ou des surnageants de culture pour la détermination des paramètres de toxicité ciblés.

5.2. Evaluation de la cytotoxicité - mesure de l'activité de la déshydrogénase mitochondriale

5.2.1. Principe du test

Afin d'évaluer la cytotoxicité des différents échantillons de particules et de leurs extraits, le test WST1 a été réalisé. Le test WST-1 permet d'évaluer l'activité mitochondriale et la prolifération cellulaire. Il est basé sur le clivage du sel de tétrazolium WST-1 par la déshydrogénase mitochondriale (MDH) dans des cellules vivantes, pour produire le formazan mesuré à 440 nm.

5.2.2. Protocole

Le test WST1 a été réalisé dans des plaques 96 puits, en ensemençant 5000 cellules par puits (100 µL). Le test est réalisé le jour où le nombre de cellule atteint environ 40 000 cellules/puits. Les échantillons sélectionnés pour les tests de cytotoxicité sont les fractions

particulaire, fraction hydrosoluble, fraction organique, et particulaire débarrassée des fractions hydrosoluble et organique de tous les échantillons réels sauf $PM_{2,5}$ sur filtres. Les suspensions de particules et les extraits de particules ont été préparés aux concentrations suivantes : 6, 12, 24, 48 et 96 µg/cm^2. Le jour de l'exposition des cellules, 100 µL de chaque solution sont déposés dans le puits correspondant. Chaque échantillon est analysé en 4 réplicats, de même pour les contrôles positifs (cellules exposées au Triton) et contrôles négatifs (cellules sans particules). Le Kit « Cell Proliferation Reagent WST-1 » (Roche Diagnostics GmbH, Germany) a été utilisé. Dans la plaque contenant 100 µL de cellules/puits le réactif WST1 (sel de tetrazolium) a été ajouté dans chaque puits. La plaque est incubée à 37°C pour 2 h, puis l'absorbance du formazan est mesurée à 440 nm.

Les résultats de WST-1 sont présentés sous forme de pourcentage d'inhibition de l'activité mitochondriale, et sont calculés à l'aide de la formule suivante :

$$100 - \left(\frac{absorbance\ echantillon - absorbance\ low\ control}{absorbance\ high\ control - absorbance\ low\ control}\right) x100$$

Avec low control : cellules exposées au triton-X100 (détergeant : 100% de mortalité),
high control : cellules non exposées aux particules (100% de viabilité),
échantillon : cellules exposées aux différentes fractions des particules.

5.2.3. Choix de la dose

Les tests de cytotoxicité servent à choisir une dose pour les tests de stress oxydant. La dose doit permettre l'observation du stress oxydant avec le minimum de létalité. Le défi qui se présente est lié à l'hétérogénéité des échantillons (échantillons réels, oxydes métalliques, différents mélanges, différentes fractions…), ce qui a compliqué le choix de la dose. La dose 24 µg/cm^2 était le meilleur choix pour les tests de stress oxydant.

Il a été décidé d'analyser en triplicats toutes les fractions (56 fractions) de tous les échantillons, sauf les $PM_{2,5}$ sur filtres. Le nombre total d'échantillons pour chaque test de stress oxydant et d'inflammation est alors 168 échantillons.

5.3.Evaluation du stress oxydant

Nous avons choisi d'évaluer le stress oxydant induit par les différentes fractions des différents échantillons de particules. Les paramètres choisis sont la mesure de la surproduction des ERO, la mesure de l'altération de la membrane lipidique, la mesure des atteintes aux protéines et à l'ADN.

Pour doser les ERO, les cellules sont cultivées dans des plaques noires, en ensemençant 5000 cellules par puits. Les cellules sont exposées aux particules/extraits à la dose 24 µg/cm^2 le lendemain de l'ensemencement lorsque le nombre de cellules atteint 10 000 cellules/puits. Ce test est réalisé 48 h après l'exposition (40 000 cellules/puit). Pour la mesure de l'altération de la membrane lipidique, la mesure des atteintes aux protéines et à l'ADN, les cellules ont été cultivées dans des flasque T-75 (Corning™ CellBIND™) , et exposées aux particules/extraits pendant 48 h, à la dose 24 µg/cm^2.

5.3.1. Quantification des espèces réactives de l'oxygène au moyen du Dihydroethydium

5.3.1.1. Principe du test

Ce test est réalisé en utilisant le kit de dosage DHE (dihydroéthidium)- Espèces réactives de l'oxygène (Abcam- ab236206), qui mesure les espèces réactives de l'oxygène (radical superoxyde et peroxyde d'hydrogène) dans les cellules vivantes. Ce kit utilise le dihydroéthidium DHE de formule $C_{21}H_{21}N_3$, comme sonde fluorescente pour la détection de la présence des ERO.

Le DHE peut être oxydé par le radical superoxyde pour former le 2-hydroxyéthidium (2-OH-E$^+$), et par d'autres ERO pour former l'éthidium (E$^+$) (Figure II-10).

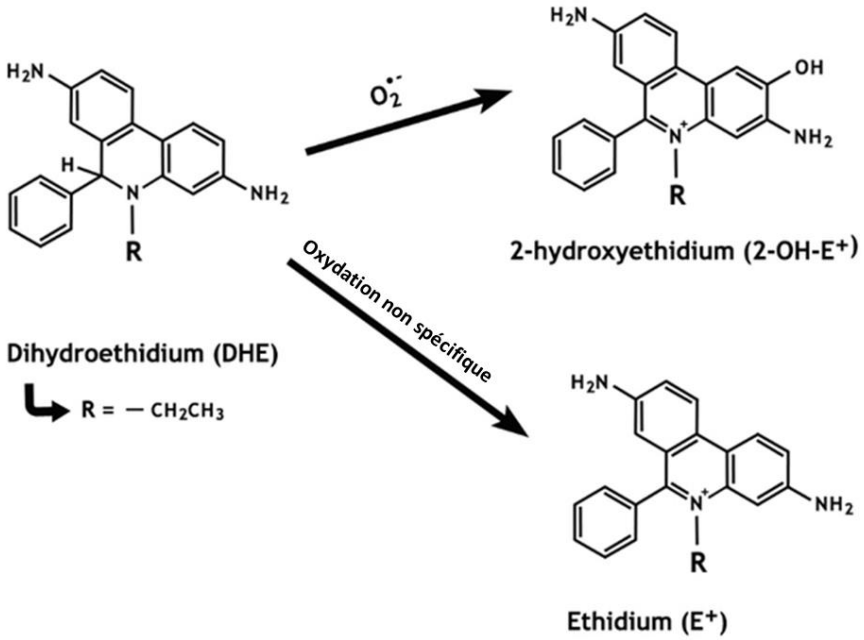


Figure II-10: Oxydation de la DHE par les ERO (Balbin Villaverde, Netherton and Baker, 2019).

L'Antimycine A, $C_{28}H_{40}N_2O_9$, un inhibiteur du complexe III de la chaîne de transport d'électrons mitochondriaux, est utilisé en tant que contrôle positif pour la génération des ERO. La N-acétyle cystéine joue le rôle d'un contrôle antioxydant. En effet, cette molécule est un précurseur dans la formation du glutathion antioxydant dans le corps. Le groupe thiol (sulfhydryle) lui confère des effets antioxydants et est capable de réduire les radicaux libres.

5.3.1.2. Protocole

Ce test consiste à aspirer le surnageant, et laver chaque puits avec le tampon du test. Ensuite, le tampon du test est aspiré, et le tampon de coloration des ERO est ajouté. Le contrôle négatif (N-acétyle Cystéine) est ensuite ajouté aux puits correspondants, et la plaque est incubée à l'obscurité à 37 °C pendant 30 minutes. Après l'incubation, le contrôle positif (antimycine A) est ajouté aux puits correspondants et la plaque est incubée à 37 °C pendant 1 h à l'obscurité. Enfin le tampon de coloration des ERO est aspiré, le tampon du test est ajouté aux puits, et la fluorescence est mesurée en utilisant une longueur d'onde d'excitation entre 480 et 520 nm, et une longueur d'onde d'émission entre 570 et 600 nm.

5.3.2. Evaluation de la lésion oxydative à l'ADN - quantification de la 8-OHdG

5.3.2.1. Principe du test

La 8-hydroxy-2-désoxy guanosine (8-OHdG) est formée suite aux dommages oxydatifs de l'ADN par les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote. La quantification se fait par une méthode compétitive qui peut être utilisée pour la quantification de 8-OHdG dans les cellules. Le test utilise une plaque recouverte de 8-hydroxy-2-désoxy guanosine, et un anticorps, lié à l'enzyme de peroxydase de raifort (PR) pour la détection. Cet anticorps reconnaît à la fois le 8-OHdG libre et le 8-OHdG incorporé à l'ADN.

5.3.2.2. Protocole

Avant de doser la 8-OHdG, il faut passer par plusieurs étapes : extraction et purification de l'ADN, dosage de l'ADN, digestion de l'ADN, dosage de la 8-OHdG.

Extraction et purification de l'ADN

Pour cette étape, le kit GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep est utilisé. Premièrement, la RNase A et la protéinase K sont ajoutées aux cellules exposées aux particules, dans le but de digérer l'ARN et les protéines, respectivement. Ensuite, une solution de lyse est ajoutée. Apres homogénéisation, les lysats sont incubés pendant 10 minutes à 70 °C. Vu que l'ADN est insoluble dans l'éthanol, ce dernier est ajouté aux cellules, et à l'aide des colonnes, la centrifugation permet la séparation de l'ADN du reste des organites et débris cellulaires. L'ADN, retenu sur la colonne, est ensuite lavé plusieurs fois à l'aide d'un tampon de lavage, et ensuite élué en ajoutant 100µL de solution Tris-HCl/EDTA.

Dosage spectrophotométrique de l'ADN

La quantification de l'ADN se fait par spectrophotométrie UV, en mesurant l'absorbance de l'ADN à 260 nm, à l'aide de la plaque µDrop™ (Thermo Scientific™).

Digestion de l'ADN

Après extraction et dosage de l'ADN, les échantillons sont incubés à 100°C pendant 2 minutes. Ensuite, de l'acétate de potassium, du sulfate de zinc et la nucléase P1 sont ajoutés, et les échantillons sont incubés à 37 °C pour une nuit. Le lendemain, le Tris-HCl (pH=8,3), et la phosphatase alcaline sont ajoutés, puis les échantillons sont incubés à 37 °C pour 30 minutes.

Dosage 8-OHdG

Après avoir digéré l'ADN, le dosage de la 8-OHdG est réalisé. La première étape consiste à préparer la gamme d'étalonnage 8-OHdG : 60; 30; 15; 7,5; 3,75; 1,875; 0,94; et 0 ng/mL, la déposer dans la plaque, et déposer les échantillons (Figure II-11).

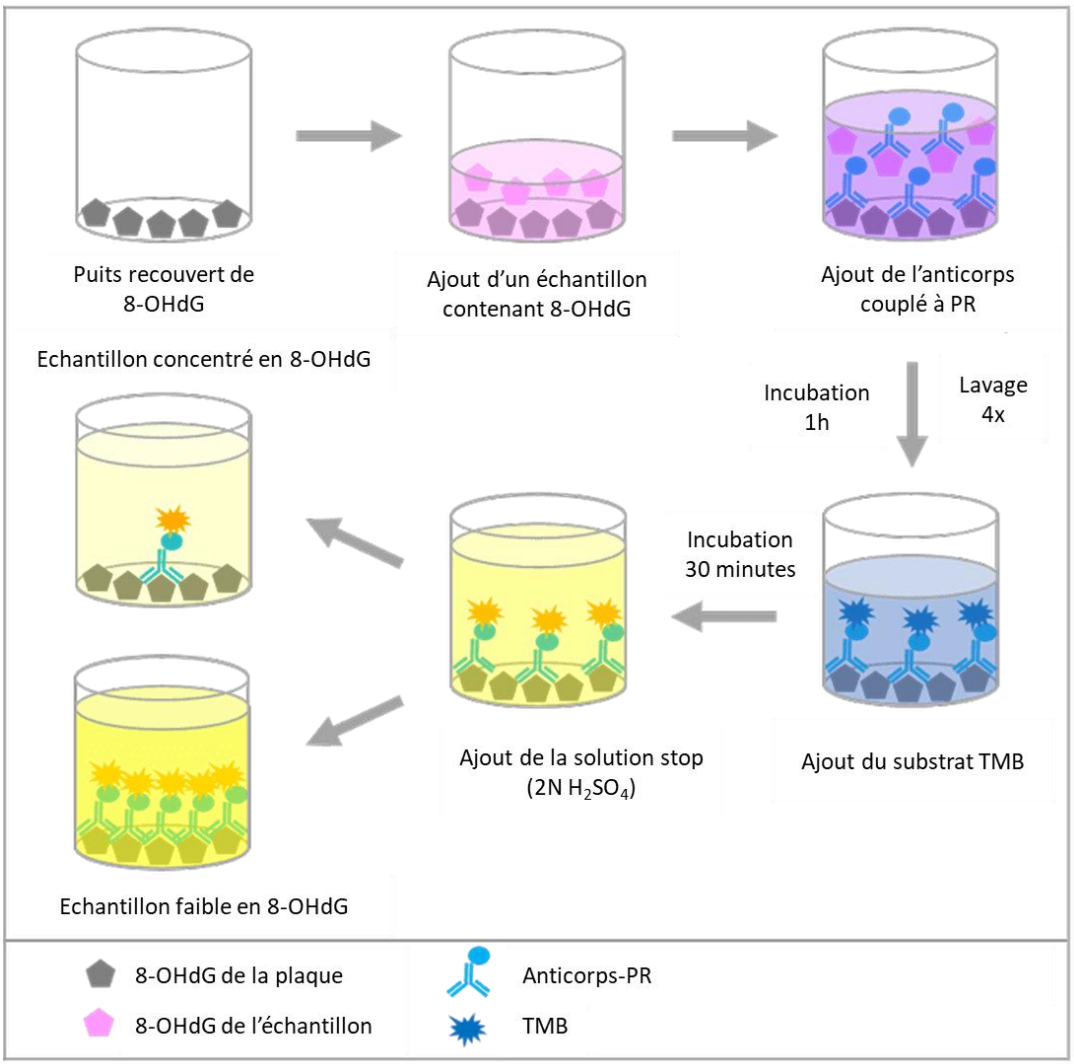


Figure II-11: Dosage de la 8-OHdG.

Ensuite, l'anticorps 8-OHdG est ajouté aux puits. La plaque est incubée 1h à température ambiante. Les antigènes libres (dans les étalons ou échantillons) et les antigènes liés à la plaque entrent en compétition pour se lier à l'anticorps. Ensuite la plaque est vidée et lavée 4 fois avec le tampon de lavage. Hormis les anticorps de détection conjugué à la PR qui sont liés aux antigènes de la plaque, tout est éliminé par lavage. Enfin, le substrat TMB est ajouté. Ce dernier réagit avec la PR et aboutit à une coloration bleue, la plaque est incubée à température ambiante à l'obscurité pour 30 minutes, et une solution d'acide sulfurique est ajoutée pour stopper la réaction. La solution dans les puits devient jaune et l'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 450 nm. En test de compétition, plus la quantité d'antigènes dans l'échantillon est élevée, plus l'absorbance est faible.

5.3.3. Evaluation des lésions oxydatives aux lipides - quantification de la 8-isoprostane

5.3.3.1. Principe du test

Les isoprostanes sont une famille d'eicosanoïdes d'origine non enzymatique produits par l'oxydation de phospholipides tissulaires par les ERO. Le kit «ab175819 8-isoprostane ELISA Kit» a été utilisé pour le dosage compétitif des 8-isoprostanes dans les cellules.

5.3.3.2. Protocole

Avant le dosage, il faut passer par une étape d'extraction de la 8-isoprostane des cellules, et une étape de saponification afin de cliver l'acide gras du squelette du glycérol.

Extraction de la 8-isoprostane

Premièrement, la triphénylphosphine TPP (0,04 mg /mL) est ajouté à chaque échantillon de cellules pour prévenir l'oxydation. Ensuite, les échantillons sont acidifiés à l'aide de l'acide éthanoïque pour précipiter les protéines (pH=3-4). Puis, une extraction de la

8-isoprostane est effectuée à l'aide de l'acétate d'éthyle, et est répétée 3 fois. La phase organique collectée est ensuite évaporée à sec sous flux d'azote.

Saponification

Une solution de KOH 20% est ajoutée à chaque échantillon pour solubiliser les acides gras « séchés ». Après incubation pendant une heure à 50 °C, l'eau ultra-pure est ajoutée, et la solution est acidifiée à l'aide de l'acide méthanoïque (pH=5). La 8-isoprostane est ensuite extraite dans l'acétate d'éthyle, à deux reprises, puis la phase organique récupérée est séchée sous flux d'azote. 20 µL d'éthanol sont ajoutés pour récupérer la 8-isoprostane, puis 80 µL de la solution de tampon de dilution des échantillons pour récupérer les gouttes d'éthanol restantes dans le tube.

Quantification de la 8-isoprostane

Premièrement, la gamme d'étalonnage de 8-isoprostane (0, 10, 50, 100, 500, 1000, et 5000 pg/mL) et les échantillons sont déposés dans la plaque. Ensuite l'anticorps couplé à PR est ajouté et la plaque est incubée à température ambiante pour 2 h. Puis la plaque est lavée 4 fois à l'aide du tampon de lavage. Le substrat TMB est alors ajouté et la plaque est incubée pour 30 minutes à T °C ambiante. Enfin, l'acide sulfurique 2 N (1 mol/L) est ajouté pour arrêter la réaction avant de mesurer l'absorbance à 450 nm.

5.3.4. Evaluation de la lésion oxydative aux protéines - quantification des protéines carbonylées

5.3.4.1. Principe du test

La carbonylation des protéines qui est une des modifications oxydatives irréversibles des protéines, est un marqueur du stress oxydant. Le dosage des protéines carbonylées est une méthode précise, basée sur la réaction du 2,4-Dinitrophenylhydrazine (DNPH) avec les protéines carbonylées (Figure II-12). Les DNP-hydrazones formées sont quantifiables à partir d'une mesure d'absorbance à 375 nm. Le kit « ab126287 Protein Carbonyl Content Assay Kit » est utilisé pour ce dosage.

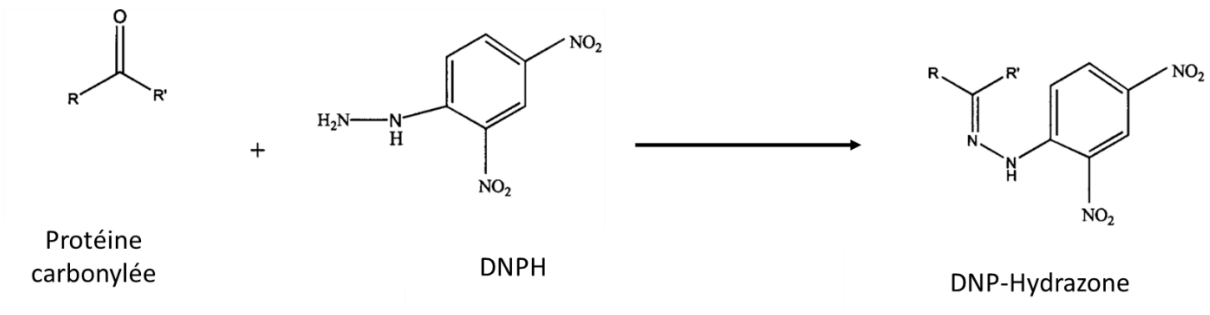


Figure II-12: Réaction entre les groupements carbonyle des protéines carbonylées et le DNPH (Castegna *et al.*, 2003).

5.3.4.2. Protocole

Avant de réaliser le test des protéines carbonylées, il faut doser les protéines totales dans les lysats cellulaires, à l'aide de la méthode de l'acide bicinchoninique (BCA) en utilisant le kit Bicinchoninic Acid Protein Assay (Sigma-Aldrich; USA). Le principe du dosage des protéines totales repose sur la formation d'un complexe Cu^{2+}-protéines en milieu basique, et ensuite la réduction du Cu^{2+} en Cu^{+} par ces protéines. Le BCA forme ensuite un complexe bleu-violet avec le Cu^{+}, qui sera quantifié par spectrophotométrie à 562 nm. Le test consiste à déposer dans une plaque 96 puits les échantillons (surnageants cellulaires), et les solutions étalons de sérum de veau fœtal (BSA) de concentrations 200, 400, 600, 800 et 1000 µg/mL. Ensuite, le mélange contenant le BCA et le sulfate de cuivre pentahydraté est ajouté dans les puits. La plaque est incubée à 37°C pendant 30 minutes et enfin, l'absorbance est mesurée à 562nm.

Suite au dosage des protéines totales, 0,5 à 2 mg de protéines par échantillon sont utilisés pour le dosage des protéines carbonylées. A l'aide de l'enzyme streptozicin (10%), les acides nucléiques (ADN et ARN) sont digérés, et éliminés par centrifugation à 15 000 g. Ensuite la DNPH est ajoutée au surnageant prélevé de chaque échantillon. Puis les échantillons sont incubés pendant 10 minutes à température ambiante. L'acide trichloracétique (TCA) est ajouté pour précipiter les protéines, et les échantillons sont incubés 5 minutes sur un bain de glace. Après la centrifugation, l'acétone est ajoutée au culot de protéines pour éliminer les DNPH libres. Ensuite, les échantillons sont conservés à -20 °C pendant une nuit. Le

lendemain, le surnageant est jeté et l'étape de l'acétone est répétée. Enfin, la guanidine est ajoutée pour solubiliser le culot protéique, et l'absorbance est mesurée à 375 nm.

Un dosage des protéines total est effectué à la fin de la manipulation pour rapporter la quantité des protéines carbonylées à la quantité des protéines totales présentes dans les puits.

5.4. Evaluation de la réponse inflammatoire - quantification de l'interleukine-6 (IL-6)

La réponse inflammatoire se manifeste généralement par la sécrétion des médiateurs pro-inflammatoires précoces tels que IL-1β et TNF- α. Ces cytokines sont ensuite capables d'induire l'expression d'autres cytokines telles que IL-6, IL-8 et CXCL5. Dans cette étude, nous avons évalué l'expression protéique de la cytokine inflammatoire IL-6, pouvant être quantifié après 48 h d'exposition des cellules, ce qui permet de conserver les mêmes conditions d'expositions utilisées dans cette étude.

5.4.1. Principe du test

L'interleukine-6 (IL-6) est une cytokine multifonctionnelle qui régule le système immunitaire. L'expression d'IL-6 est facilement induite par une variété de cytokines, lipopolysaccharides ou infections virales. Le test est basé sur le principe « ELISA en sandwich » (Figure II-13): l'anticorps de capture d'IL-6 adsorbé sur la surface des puits, se lie avec les protéines IL-6 présents dans les échantillons. Un anticorps de détection est ajouté pour se lier au complexe IL-6/anticorps de capture. La streptavidine-PR est ajoutée pour se lier aux anticorps de détection. Elle est constituée de la protéine de streptavidine, qui est liée par covalence à l'enzyme de peroxydase de raifort (PR). La streptavidine est liée à la biotine de l'anticorps de détection. Un substrat qui réagit avec PR est ensuite ajouté, menant à la formation d'un produit coloré, dont la concentration est proportionnelle à la quantité d'IL-6 présente initialement dans l'échantillon.

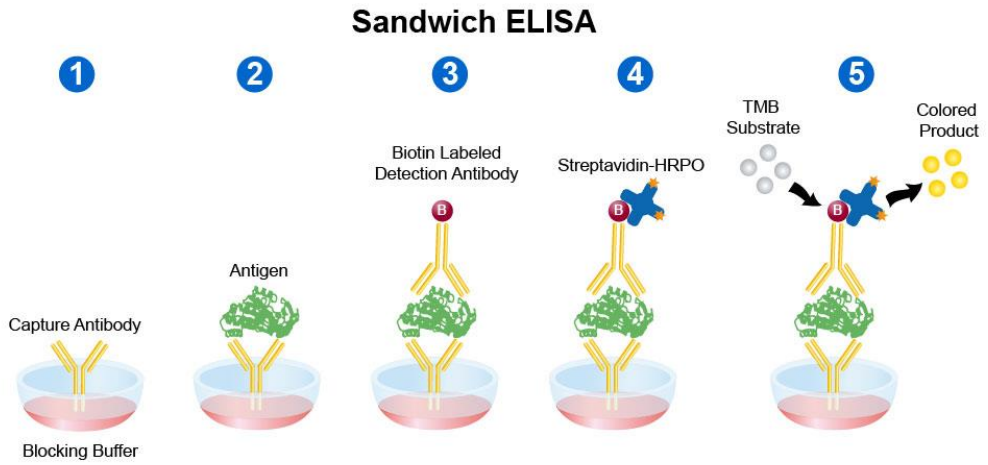


Figure II-13: Principe du test IL-6 ELISA sandwich.

5.4.2. Protocole

Pour le test IL-6, ce test est réalisé dans des plaques 96 puits (Corning™ CellBIND™) en ensemençant 5000 cellules par puits (100 µL). Les tests sont réalisés le jour où le nombre de cellules atteint environ 40 000 cellules/puits.

Les cellules ont été exposées à des suspensions/extraits de particules, aux concentrations 6 et 24 µg/cm^2, en déposant 100 µL de chaque solution dans le puits correspondant. Chaque échantillon est analysé en 4 réplicats de même pour les contrôles positifs (cellules exposées au détergeant : Triton X100) et contrôles négatifs (cellules sans particules).

La veille du test, l'anticorps de capture est déposé dans les puits de la plaque, et cette dernière est incubée à 4 °C durant une nuit. Le lendemain, la plaque est lavée 4 fois à l'aide du tampon de lavage afin d'éliminer les anticorps non adhérent. Ensuite, le diluent A est ajouté à chaque puits, et la plaque est incubée à la température ambiante pendant 1 h afin de bloquer les réactions non spécifiques. De l'Il-6 en concentration connue est introduit dans les puits, de manière à pouvoir réaliser l'étalonnage. La gamme couverte d'étalonnage va de 7,8 à 500 pg d'IL6/mL. Ensuite, la plaque est lavée 4 fois à l'aide du tampon de lavage, les échantillons de surnageant de culture/étalons sont ajoutés, et la plaque est incubée pendant 2h. Après 4 lavages, l'anticorps de détection est ajouté avant une incubation de 1h et un nouveau

lavage (4 fois) est réalisé pour éliminer l'excès d'anticorps. Après cette étape, le conjugué Streptavidin-PR est ajouté, la plaque est incubée pendant 30 minutes, lavée 5 fois afin d'éliminer le conjugué non lié aux anticorps. Enfin, le substrat TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) est ajouté dans chaque puits avant d'incuber la plaque pendant 15 minutes dans le noir. Une coloration bleue apparait due à l'oxydation du TMB. Afin d'arrêter la réaction, le pH est acidifié en ajoutant une solution d'H_2SO_4 2N dans chaque puits, aboutissant à une coloration jaune dont l'absorbance est mesurée à 450 nm.

Le test IL-6 est suivi d'un dosage de protéines totales à l'aide de l'acide bicinchonique (BCA) en utilisant le kit Bicinchoninic Acid Protein (Sigma-Aldrich; USA), afin de rapporter la quantité des protéines IL-6 à la quantité de protéines totales, qui est proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

6. Analyses statistiques

Préalablement à la détermination du coefficient de corrélation entre les variables, le test de Shapiro-Wilk a été réalisé pour évaluer la normalité de la distribution des données. Comme la normalité n'a pas été vérifiée (p <0,001) pour la plupart des variables, le coefficient de corrélation de Spearman a été utilisé. Deux niveaux de signification ont été considérés, p <0,05 et p <0,001, permettant de conclure sur la corrélation avec 95 % et 99,9 % de confiance respectivement. De plus, les données ont également été étudiées en utilisant l'ACP. Les résultats des tests de toxicité sont normalisés par rapport au témoin, et sont présentés sous la forme d'une moyenne des 4 réplicats pour les tests de cytotoxicité et d'inflammation, et sous la forme d'une moyenne des 3 réplicats pour les tests de stress oxydant et de potentiel oxydant, en considérant l'écart-type. Le test non paramétrique U de Mann–Whitney est réalisé pour comparer les valeurs obtenues aux valeurs des témoins. Des différences significatives ont été rapportées avec des valeurs de p <0,05 (*), p <0,01(**) et p < 0,001 (***).

Chapitre 3 : Etude du potentiel oxydant des $PM_{2,5}$: lien avec la composition chimique et les contributions de sources

Chapitre 3 : Etude du potentiel oxydant des $PM_{2,5}$: lien avec la composition chimique et les contributions de sources

Introduction

Ce chapitre porte sur l'étude du potentiel oxydant (OP) de particules atmosphériques $PM_{2.5}$ prélevées dans l'agglomération industrielle de Dunkerque. Pour ce faire, nous avons considéré des échantillons collectés sur filtre en périodes hivernale et printanière des années 2010 et 2011 dans le cadre de la thèse d'Adib Kfoury (Kfoury, 2013).

Dans un premier temps, la sélection des échantillons à considérer parmi les échantillons disponibles a été effectuée en fonction des concentrations de $PM_{2,5}$ et de l'influence de différentes sources sur la composition des particules. Une partie du filtre sur lequel ont été prélevées les $PM_{2,5}$ a été mise au contact d'un fluide pulmonaire synthétique, le Gamble, dans le but d'en extraire la fraction bioaccessible. L'utilisation d'un fluide pulmonaire synthétique est primordiale, afin de se rapprocher des conditions physiologiques. La solution de Gamble a été préparée à partir de plusieurs sels et reprend les caractéristiques publiées par Colombo et al., (2008) ; elle présente un pH ajusté à 7,4 (Wragg and Klinck, 2007; Caboche *et al.*, 2011). La masse des PM et le volume de la solution Gamble ont été choisis de façon à respecter un ratio solide liquide (S/L) compris entre 1/500 et 1/ 50000 (g/mL) (Caboche *et al.*, 2011).

Suite à la préparation des extraits de PM, leur potentiel oxydant (OP) a été évalué en utilisant deux méthodes chimiques : le test à l'acide ascorbique (AA) et le test au dithiothréitol (DTT). Ces méthodes sont basées sur la mesure de la vitesse de consommation des antioxydants, et ont été mises au point pour la première fois au laboratoire durant cette thèse, comme décrit dans le chapitre 2.

Ce chapitre vise alors à étudier le potentiel oxydant des extraits bioaccessibles des $PM_{2,5}$ par les méthodes AA et DTT. Il a pour but d'étudier le lien entre le potentiel oxydant et la composition chimique des PM, mais aussi celui entre le potentiel oxydant et les contributions de sources locales de $PM_{2,5}$ et celles à longue distance.

1. Composition chimique des $PM_{2,5}$

Dans cette étude, 57 échantillons de $PM_{2,5}$ ont été sélectionnés de manière à être représentatif des niveaux de concentration rencontrés lors de l'échantillonnage réalisé entre novembre 2010 et avril 2011, à Dunkerque. Cette sélection contient ainsi des échantillons présentant des concentrations variables de $PM_{2,5}$, incluant des échantillons à concentration de $PM_{2,5}$ élevée (> 50 µg/m^3) et faible (<10 µg/m^3). A partir de connaissances antérieures sur la zone d'étude (Kfoury, 2013), il a également été tenu compte de la composition chimique des échantillons de manière à pouvoir étudier des échantillons où l'on retrouve une influence assez contrastée des différentes sources anthropiques et naturelles influençant le site.

La concentration moyenne des échantillons sélectionnés était de 29,2 µg/m^3, similaire à la concentration moyenne généralement rencontrée pendant la période hiver-printemps dans la zone étudiée (Kfoury *et al.*, 2016). Cette concentration moyenne, relativement élevée pour les $PM_{2,5}$ s'explique notamment par des épisodes de forte concentration survenus en novembre et décembre 2010, puis en mars et avril 2011. Le Tableau III-1 regroupe la composition moyenne des 57 échantillons de $PM_{2,5}$. Parmi les composants des PM, NO_3^- (8,67 µg/m^3), le carbone total TC (5,15 µg/m^3), SO_4^{2-} (2,75 µg/m^3), et NH_4^+ (2,01 µg/m^3), ont montré les concentrations moyennes les plus élevées (> 1 µg/m^3), suivis de Cl^- (0,69 µg/m^3) et Na (0,37 µg/m^3). Au global, ces 6 espèces représentent à elles seules environ 67 % de la masse des $PM_{2,5}$. Des observations comparables ont été faites dans d'autres études menées en Europe, comme à Gand (Belgique) (Viana *et al.*, 2007), à Goteborg (Suède) (Moloi *et al.*, 2002), à Rotterdam, (Pays-Bas) (Mooibroek *et al.*, 2011), où ces 6 espèces ont aussi été identifiées comme les composés majoritaires des $PM_{2,5}$.

L'analyse des éléments métalliques a montré une concentration relativement élevée pour l'élément Fe (155 ng/m^3); d'autres éléments présentent des valeurs supérieures à 10 ng/m^3 tels que Mn (13,7 ng/m^3), Pb (14,8 ng/m^3), Al (26,5 ng/m^3) et Zn (67,6 ng/m^3). Le suivi d'autres éléments traces avec des teneurs inférieures à 10 ng/m^3 a également été réalisé en plus du suivi des autres éléments métalliques. Il s'agit pour certains de traceurs des émissions de sources sidérurgiques (Pb, Rb, Ag, As, Cd et Mn), d'une aciérie électrique (Zn, Pb, Cr et Cu), de la combustion de fuel lourd (Ni et V), ou encore des émissions liées au trafic hors échappement (Zn, Cu et Sb…) (Kfoury *et al.*, 2016). La prise en compte de ces éléments dans

les profils chimiques de sources est essentielle pour évaluer les contributions des différentes sources à la concentration de $PM_{2,5}$.

Tableau III-1: Composition chimique moyenne (ng/m^3) et concentration moyenne des $PM_{2,5}$ (µg/m^3) collectées à Dunkerque entre novembre 2010 et avril 2011.

Espèces	Moyenne	Médiane	Min	Max	SD	1er Quartile	3ème Quartile
Al	26,5	22,5	2,52	112,2	18,7	14,8	30,7
Ca	76,2	62,7	19,4	286	48,2	43,7	88,4
Fe	155	84,0	9,1	1542	231	37,1	195
K	122,7	91,1	29,2	358	83,0	62,0	156
Mg	61,9	39,3	4,35	305	64,1	16,6	72,1
Na	372	225	21,1	2225	419	105	404
Ag	0,07	0,04	0,00	0,42	0,08	0,01	0,09
As	1,09	0,78	0,00	9,45	1,38	0,31	1,45
Ba	0,88	0,74	0,19	5,01	0,67	0,56	1,08
Bi	0,15	0,11	0,00	0,62	0,14	0,04	0,26
Cd	0,46	0,23	0,01	7,98	1,08	0,08	0,44
Co	0,18	0,12	0,02	0,9	0,17	0,07	0,25
Cr	1,36	0,79	0,07	9,88	1,55	0,52	1,61
Cu	3,13	1,63	0,17	31,0	4,46	0,81	4,25
Mn	13,7	4,84	0,12	92,4	20,7	1,59	14,3
Ni	5,36	3,23	0,73	41,55	6,35	1,91	6,29
Pb	14,8	8,26	0,75	118	18,4	3,95	18,8
Rb	0,57	0,43	0,05	4,86	0,73	0,19	0,57
Sb	1,05	0,63	0,00	15,0	2,05	0,37	1,10
Sn	1,03	0,80	0,08	5,43	0,98	0,28	1,33
Sr	0,49	0,40	0,16	1,87	0,32	0,30	0,59
Ti	2,00	1,10	0,00	15,2	2,66	0,29	2,47
V	5,16	3,13	0,49	23,1	5,31	1,84	5,84
Zn	67,6	26,4	1,96	625	113	8,38	88,5
NH_4^+	2010	1380	172	4817	1301	1043	3128
Cl^-	692	576	39,35	1752	409	418	841
NO_3^-	8678	3619	331	49066	10683	1837	11545
SO_4^{2-}	2754	2008	127	9642	2022	1399	3453
TC	5151	3612	805	17547	4246	2008	6881
$PM_{2,5}$ (µg/m^3)	29,2	18,8	3,1	90,8	24,4	11,3	44,3

2. Profils et contribution des sources d'émission des $PM_{2,5}$

Dans l'étude précédente de Kfoury et al., (2016), la factorisation matricielle non négative (CW-NMF) a été appliquée à l'ensemble de données de composition chimique des $PM_{2,5}$ sur filtre (173 échantillons de $PM_{2,5}$) et a conduit à l'identification de 11 profils de sources. Le Tableau III-2 présente les marqueurs chimiques qui ont été utilisés pour identifier ces sources, de même que le résultat de leurs contributions à la concentration des $PM_{2,5}$.

Le premier profil est caractérisé par la forte concentration en ions sodium Na^+ et chlorure Cl^-, ainsi qu'en certains métaux majeurs (Ca, K et Mg) et ion sulfate SO_4^{2-}. Il est attribué aux « sels marins » fraîchement émis (Seinfeld and Pandis, 2006). Le deuxième profil est caractérisé aussi par une forte concentration de Na^+. La concentration en Cl^- est moins importante ici que dans le premier profil, et est compensée par une concentration plus élevée en nitrates et sulfates. Il a été attribué aux « sels marins âgés » ou anthropisés (Seinfeld and Pandis, 2006). Ce profil fait apparaître une contribution d'éléments traces métalliques tels que Cr, Ni et V, qui mettent en évidence une influence des sources anthropiques. Ni et V ont été cités comme marqueurs du transport maritime, et en particulier de la combustion du fioul lourd (Sippula *et al.*, 2007).

Le troisième profil de source est caractérisé par des fortes concentrations en éléments majeurs comme Al, Ca, Fe, K et Mg, avec également une contribution de quelques éléments traces (Ti, Sr, Ba, Cu, Cr et Mn). Il correspond aux particules crustales (Mooibroek *et al.*, 2011).

Le quatrième profil montre une forte contribution de SO_4^{2-} et NH_4^+ et peut être attribué aux sulfates secondaires. Le cinquième profil montre une forte contribution de NO_3^- et NH_4^+ et peut être attribué aux nitrates secondaires. La contribution du TC est mise en évidence dans ce profil, pouvant être attribuée au vieillissement des aérosols inorganiques secondaires et/ou à l'effet du mélange avec des particules provenant de sources de combustion (Cusack *et al.*, 2013; Pey *et al.*, 2013; Koçak *et al.*, 2015). Ces deux profils correspondant aux aérosols inorganiques secondaires (SIA).

Tableau III-2:Caractéristiques des sources identifiées à Dunkerque (Kfoury *et al.*, 2016) et contribution moyenne à la composition des échantillons de $PM_{2,5}$ sélectionnés.

Source	Marqueurs par ordre d'abondance	Contribution moyenne (%) Hiver-Printemps	Contribution (ng/m^3)	
			Moyenne ± écart-type	(min - max)
Sels marins	Cl^-, Na, Mg	2,9 – 2,3	699 ± 605	(0 - 3000)
Sels marins âgés	SO_4^{2-}, Na, NO_3^-, Mg, Cl^-	1,9 – 1,8	566 ± 595	(0 - 2166)
Particules crustales	Ca, Al, Fe, Mg, K	0,2 - 0,3	56 ± 55	(0 - 257)
Sulfates secondaires	SO_4^{2-}, NH_4^+	15 - 12	2645 ± 2313	(0 - 10985)
Nitrates secondaires	NO_3^-, NH_4^+	34 – 62	10294 ± 13601	(0 - 60318)
Combustion de fioul lourd	TC, V, Ni	0,3 – 0,8	145 ± 163	(0 - 620)
Combustion 2	TC, NH_4^+, NO_3^-, K, Ba	44 - 20	5444 ± 4312	(0 - 19352)
Trafic hors échappement	Zn, Fe, Sb, Sn, Cr, Al, Pb, Mn, Cu	0,03 – 0,02	4,7 ± 4,3	(0 - 25)
Site sidérurgique intégrée - émissions diffuses	Fe, Ca, Zn, Al, Mn, Pb, As	0,5 – 0,5	150 ± 204	(0 - 1296)
Site sidérurgique intégrée - cheminée d'agglomération	Cl^-, K, NH_4^+, Fe, Pb, Rb, Cd	1,1 – 0,5	209 ± 271	(0 - 1382)
Aciérie électrique (ESP)	Zn, Fe, Pb, Mg, Pb, Ca, Cr, Mn, Cu	0,3 – 0,2	77 ± 142	(0 - 746)

Le sixième profil de source est caractérisé par une forte contribution de Ni et V, marqueurs de la combustion de fioul lourd. Le septième profil « Combustion 2 » correspond à un mélange entre la combustion liée au trafic routier et la combustion de la biomasse, cette dernière étant caractérisée par des niveaux de concentration de K élevés (Pateraki *et al.*, 2012). Ces deux profils montrent des quantités élevées de TC, mais sont également riches en

NO_3^- et NH_4^+. Ce sont essentiellement les différences entre les éléments trace métalliques qui ont permis de distinguer ces 2 profils (Ni et V dans le profil de combustion de fioul lourd ; K et Ba, dans le profil de combustion trafic et biomasse).

Le huitième profil de source comprend de nombreuses espèces métalliques telles que Fe, Zn, Sn, Sb, Zn, Cr, Al, Pb, Ni, Mn et Cu, sans contribution significative d'espèces ioniques ou carbonées. Il correspond aux émissions liées au trafic hors échappement. Ce profil a pu être identifié notamment grâce à l'élément Zn, présent dans les débris de pneu, de même que les éléments Fe, Cu, Sb, Cr notamment, émis lors de l'usure des plaquettes de frein et autres parties mécaniques mobiles des véhicules. Les caractéristiques du profil identifié sont en accord avec les résultats mentionnés dans d'autres études (Thorpe and Harrison, 2008).

En plus de ces 8 profils de sources, 3 profils supplémentaires liés aux activités sidérurgiques locales ont été identifiés :

Les neuvième et dixième profils sont caractérisés par des taux élevés de Fe, Ca, Al, Zn, Na, Pb et Mn. Leur identification a été rendue possible grâce à leur comparaison avec les caractéristiques d'échantillons de différentes sources prélevés à l'intérieur du complexe sidérurgique intégré (Hleis *et al.*, 2013). Il a pu être conclu que ces deux profils correspondent respectivement aux émissions diffuses du site sidérurgique intégré et à celles de sa cheminée d'agglomération de minerais. En effet, la présence des éléments Fe, Ca, Zn, Al, Mn et des ions nitrates et sulfates a été mise en évidence dans les émissions diffuses, tandis que le profil d'émissions de la cheminée d'agglomération montrait la présence de Fe, K, Pb, Cd, Rb, Cl^- et NH_4^+ (Hleis *et al.*, 2013).

Dans le dernier profil, Zn est un composant majeur, suivi de Fe, Mg, Ca, Mn, Pb, Cr et Cu. Zn a été relié aux émissions de l'aciérie électrique implantée à l'Est de Dunkerque (Ledoux *et al.*, 2006) et ce dernier profil est relatif à cette source.

En plus de l'identification de ces profils, l'application du modèle de factorisation matricielle non négative pondérée (CW-NMF) a permis d'estimer les contributions de ces sources à la concentration de $PM_{2,5}$. Il en est ressorti que 3 sources correspondent à des contributeurs très majoritaires : nitrate secondaire, sulfate secondaire et combustion liée au trafic et à la combustion de biomasse. Il a été remarqué une évolution de leurs contributions au cours de la période considérée. En hiver, la part des émissions liées à la combustion (Combustion 2) représente 44%, suivi des nitrates secondaires (34%) et des sulfates

secondaires (15%). Cette répartition est différente au printemps, avec une contribution des nitrates secondaires qui atteint 62%, suivi de la source combustion (20%) et des sulfates secondaires (12%).

Les 8 autres sources contribuent au global pour 8% en moyenne à la concentration de $PM_{2,5}$ avec peu de différences entre les 2 saisons. Parmi ces sources, les sels marins fraichement émis (2,7%) les sels marins anthropisés (1,8%) présentent des contributions relativement basses malgré la situation côtière de la zone d'étude. Il faut néanmoins rappeler que les sels marins présentent en général une taille de particules prédominante dans la gamme des particules grossières ($PM_{10-2,5}$). Il apparait également que les contributions des sources anthropiques telles que "combustion de fuel lourd" (0,3 à 0,8 %), "trafic hors échappement" (0,03 %), ainsi que les 3 sources industrielles (1,6 à 1,9%) sont relativement faibles. Il faut néanmoins garder à l'esprit que ces sources renferment des éléments métalliques, dont certains sont connus pour leur toxicité même à l'état de traces, et leur implication notamment des réactions redox ou non redox à une échelle cellulaire. Les contributions de ces sources anthropiques à la concentration de $PM_{2,5}$ sont certes faibles, mais sous un autre angle, il est important de signaler qu'elles expliquent une part importante de la concentration en éléments métalliques : Mn (98 %), As (99,4 %), Cr (94,3 %), V (94,6 %), Ni (94,5 %), Zn (91,1 %), Fe (88,3 %), Cd (79, 7 %), Pb(71,6 %) et Cu (62,4 %).

3. Mesure du potentiel oxydant

L'évaluation du potentiel oxydant par la mesure de la vitesse de consommation du dithiothréitol (DTT) et de l'acide ascorbique (AA), a été réalisée sur ces 57 échantillons de $PM_{2,5}$ prélevés à Dunkerque. Les résultats obtenus ont été normalisés par rapport, d'une part, à la masse de particules, et d'autre part, au volume d'air prélevé. Pour cela, la vitesse de consommation (pente de la courbe de la variation de la concentration en DTT/AA en fonction du temps) a été divisée par la masse de PM ou le volume d'air correspondant à la portion de filtre considérée. L'intérêt d'avoir les résultats rapportés à la masse des PM (notés OP-DTTm et OP-AAm) est de pouvoir étudier le potentiel oxydant intrinsèque des PM émises, et donc de faire le lien avec les sources d'émission. L'intérêt des résultats OP rapportés au volume d'air (notés OP-DTTv et OP-AAv) est de disposer d'une information sur le potentiel oxydant d'un m^3 d'air, et de permettre de faire un lien avec le volume d'air inhalé par un individu.

3.1. Valeurs de potentiel oxydant des $PM_{2,5}$ à Dunkerque et comparaison avec celles d'autres études dans le monde.

Les valeurs moyennes de potentiel oxydant normalisés par rapport à la masse des PM et au volume d'air déterminées dans cette étude sont de : OP-DDTv = 0,36 $nmol \cdot min^{-1} \cdot m^{-3}$, OP-DTTm = 17,7 $pmol \cdot min^{-1} \cdot \mu g^{-1}$, OP-AAv = 1,12 $nmol \cdot min^{-1} \cdot m^{-3}$ et OP-AAm = 55 $pmol \cdot min^{-1} \cdot \mu g^{-1}$. Ces résultats ont été comparés avec les valeurs publiées pour d'autres sites dans le monde (Tableau III-3).

Avant de commenter ces résultats, il faut indiquer que les méthodes d'extraction de PM ne sont pas les mêmes d'une étude à l'autre. Dans ces différentes études, on remarque que l'eau ultrapure, l'éthanol, le méthanol, un tampon phosphate ou encore la solution de Gamble ont été utilisés comme solvant d'extraction. Certains auteurs utilisent également les ultrasons ou d'autres moyens d'agitation pour l'extraction. De plus, le temps de traitement par ultrasons varie d'une étude à l'autre (15, 30 minutes ou 1 heure), de même pour l'agitation (2h, 90 minutes ou 24h). Ceci peut avoir des conséquences sur le taux de solubilisation des espèces particulaires dans le solvant. Dans une des études citées, la solution n'a pas été filtrée après l'extraction (Janssen *et al.*, 2014). Le fait d'avoir des particules en suspension dans l'extrait pourrait influer sur les résultats de potentiel oxydant en considérant la contribution des espèces insolubles. Ainsi, la diversité des méthodes utilisées pourrait avoir une répercussion sur les valeurs de potentiel oxydant et rendre délicate et peu fiable la comparaison des résultats de ces différentes études.

Pour autant, Calas *et al.*, (2017) ont comparé les réponses de OP-DTT sur des extraits obtenus en utilisant de l'eau ultrapure et une solution de Gamble. Sur la base de l'analyse de 5 échantillons de particules différents, il a été montré que les valeurs OP observées en utilisant l'eau ultrapure étaient toujours légèrement supérieures à celles obtenues en utilisant la solution de Gamble. Néanmoins, en se concentrant sur les 4 échantillons de PM prélevés dans l'environnement, la différence ne dépassait pas les 13 %, ce qui rend possible la comparaison entre les valeurs obtenues en utilisant de l'eau ultrapure et la solution de Gamble comme solvant d'extraction. Dans la plupart des études comparatives du Tableau III-3, l'eau ultrapure a été utilisée comme solvant d'extraction.

La solubilité dépend également fortement du pH du solvant (Hernández-Pellón *et al.*, 2018). Comme le tampon phosphate possède la même valeur de pH que la solution de Gamble (7,4), nous pouvons supposer que les valeurs de OP obtenues par l'une ou l'autre de ces méthodes peuvent être comparées entre elles.

Dans l'étude réalisée par Jedyńska et al., (2016), les auteurs ont utilisé du méthanol comme solvant d'extraction, et l'extrait obtenu est probablement plus concentré en composés organiques que les extraits obtenus en utilisant la solution de Gamble, de l'eau ultrapure ou du tampon phosphate. Contrairement aux autres études, Janssen et al., (2014) n'ont pas filtré les extraits avant de réaliser la mesure de OP, ce qui conduit à considérer une possible contribution d'espèces insolubles dans les valeurs de OP obtenues. Par conséquent, à l'exception de Jedyńska et al., (2016) qui a utilisé du méthanol et Janssen et al., (2014), nous pouvons être confiants quant à la fiabilité de la comparaison de nos résultats avec les valeurs présentées dans les articles cités.

Le résultat OP-DTTv obtenu pour les échantillons de Dunkerque ($0{,}36 \pm 0{,}24$ nmol·min^{-1}·m^{-3}), est apparu en accord avec les valeurs observées dans des sites de typologie urbaine comme Paris, Atlanta (États-Unis), Lecce (Italie), Athènes (Grèce) (Jedyńska *et al.*, 2016; Chirizzi *et al.*, 2017; Paraskevopoulou *et al.*, 2019; Gao, Godri Pollitt, *et al.*, 2020).

En revanche, la valeur moyenne de OP-DTTv observée dans ce travail est inférieure à celle déterminée sur le site au Pays-Bas, de même qu'à Pékin et Hangzhou (Chine) ou à Patalia (Inde) (Janssen *et al.*, 2014; Patel and Rastogi, 2018; Jingpeng Wang *et al.*, 2019; Yu *et al.*, 2019). À l'exception des Pays-Bas, les concentrations correspondantes de $PM_{2,5}$ sont également beaucoup plus élevées sur ces sites urbains (> 63 µg.m^{-3}) qu'à Dunkerque.

Les valeurs moyennes de OP-DTTm, $17{,}7 \pm 15{,}4$ pmol·min^{-1}·µg^{-1}, OP-AAv, $1{,}12 \pm 1{,}15$ nmol·min^{-1}·m^{-3} et OP-AAm, 55 ± 66 pmol·min^{-1}·µg^{-1} étaient également comparables à celles publiées pour les sites européens, asiatiques et américains.

Tableau III-3 : Valeurs de potentiel oxydant OP-DDT et OP-AA obtenues pour des échantillons de $PM_{2,5}$ prélevés à Dunkerque et comparaison avec les valeurs citées dans la littérature (Condition d'extraction: G: solution de Gamble, H_2O: eau ultrapure, M: Méthanol, E: Ethanol, PBS: tampon phosphate (pH = 7,4), Agt : Agitation, US: traitement aux ultrasons, SF: Sans filtration).

Site	Typologie	Conditions d'extraction	OP-DDTv (nmol·min^{-1}·m^{-3})	OP-DTTm (pmol·min^{-1}·µg^{-1})	OP-AAv (nmol·min^{-1}·m^{-3})	OP-AAm (pmol·min^{-1}·µg^{-1})	$PM_{2.5}$ (µg·m^{-3})	PM_{10} (µg·m^{-3})	Référence
Dunkerque (FR)	urbano-industrielle	G + Agt (24 h)	0,36	17,7	1,12	55	29,2		Ce travail
Paris (FR)	urbaine	E + US (1 h)	0,23						(Jedynska et al., 2017)
Atlanta (USA)	urbaine	H_2O + US (30 min)	0,22	24					(Gao et al., 2020)
Hangzhou city (PRC)	urbaine	H_2O + US (30 min)	0,62	6,39			63,1		(Wang et al., 2019)
Beijing (PRC)	urbaine	H_2O + US (30 min)	12,6	130			113,8		(Yu et al., 2019)
Bologna (IT)	urbaine	PBS + US (15 min)	0,3-1,7		0,2-0,6				(Visentin et al., 2016)
Birmingham (USA)	urbaine	H_2O + US (30 min)			0,75				(Fang et al., 2016)
Grenoble (FR)	urbaine	G + Agt (2 h)	1,00-4,12		0,17-2,46			7,4-22,3	(Calas et al., 2019)
Nice (FR)	urbaine	G + Agt (2 h)	1,81-3,00		0,31-1,91			13,1-21,4	(Calas et al., 2019)
Talence (FR)	urbaine	G + Agt (2 h)	1,08-2,97		0,21-1,59			8,7-26,2	(Calas et al., 2019)
Passy (FR)	urbaine	G + Agt (2 h)	1,91-10,0		0,30-7,20			8,6-59,2	(Calas et al., 2019)
Sarno (IT)	urbaine	H_2O + US (30 min)	0,19	11,67			16,3		(Cesari et al., 2019)
Lecce (IT)	urbaine	H_2O + US (30 min)	0,29	18,4			16,8		(Chirizzi et al., 2017)
Trento (IT)	urbaine	PBS + US (15 min)	0,58	50	0,7	50		19	(Pietrogrande et al., 2018)
Site au Pays-Bas	urbaine	PBS + SF	1,4				17,3		(Janssen et al., 2014)
Athens (GR)	urbaine	H_2O + US (30 min)	0,33	27,98					(Paraskevopoulou et al., 2019)
Salento (IT)	suburbaine	PBS + US (15 min)	0,19-0,29	10-11	0,09-0,21	5-8	20-26		(Perrone et al., 2019)
Patalia (IN)	semi-urbaine	M+H_2O + US (30 min)	3,8	27			150		(Patel and Rastogi, 2018)
Atlanta (USA)	trafic routier	H_2O + US (30 min)	0,78	50			15,6		(Vreeland et al., 2017)
Belgrade (BU)	trafic routier	H_2O + Agt (90 min)	0,37	9,43					(Jovanovic et al., 2019)
Atlanta (USA)	trafic routier	H_2O + US (30 min)	1,08	70			18,3		(Vreeland et al., 2017)
Ala (IT)	industrielle	PBS + US (15 min)	0,61	120	1,4	60		20,3	(Pietrogrande et al., 2018)

3.2. Variation temporelle du potentiel oxydant et relation avec la concentration en $PM_{2,5}$

Afin d'étudier la variation temporelle du potentiel oxydant et la relation avec la concentration en $PM_{2,5}$, deux graphiques comprenant la concentration en $PM_{2,5}$, les réponses OP-AAv et OP-DTTv ont été tracées. Les données sur les concentrations de $PM_{2,5}$ au niveau du site d'étude ont été obtenues à partir du site atmo (www.atmo-npdc.fr). Le premier graphique (Figure III-1) regroupe les échantillons prélevés en hiver, du 19/11/2010 au 31/12/2010. Le second graphique (Figure III-2) regroupe les échantillons prélevés au printemps du 12/03/2011 au 30/04/2011.

Pour la période d'hiver (Figure III-1), nous remarquons que globalement, les tendances des valeurs OP-DTTv et OP-AAv suivent celles des concentrations de $PM_{2,5}$. Par exemple, l'échantillon 25/11/2010 présente une faible concentration de $PM_{2,5}$ (3,1 $\mu g/m^3$), et de basses valeurs de OP-DTTv et OP-AAv (0,1 et 0,4 $nmol \cdot min^{-1} \cdot m^{-3}$ respectivement). A l'inverse, pour la période d'hiver, l'échantillon 3/12/2010 fortement concentré en $PM_{2,5}$ (72,7 $\mu g \cdot m^{-3}$) présente également de fortes réponses en OP-DTTv et OP-AAv (0,4 et 2,8 $nmol \cdot min^{-1} \cdot m^{-3}$, respectivement). OP-AAv semble être plus sensible aux variations de concentration de PM que OP-DTTv. En période hivernale, les jours pour lesquels des concentrations de $PM_{2,5}$ supérieures à 25 $\mu g \cdot m^{-3}$ sont observées sont caractérisés globalement par des températures basses, par l'absence de pluie et par des vents provenant des secteurs nord-est à sud-est. Ces secteurs correspondent principalement au secteur urbain et industriel (aciérie électrique), mais aussi continental. Pour les jours de concentrations les plus élevées, les analyses chimiques ont montré des fortes concentrations en aérosols inorganiques secondaires (SIA) pouvant provenir du transport à longue distance, et de fortes teneurs en carbone total (TC) pouvant provenir du chauffage domestique (Kfoury, 2013). Ceci nous permet d'envisager une relation éventuelle entre les ions inorganiques secondaires (nitrates et sulfates), le TC, espèces majoritaires des $PM_{2,5}$ et les réponses en OP-AA. Toutefois, il a été également montré que lorsque les concentrations en PM augmentent, ce sont tous les constituants des PM y compris les métaux traces qui ont tendance à voir également leur concentration augmenter (Ledoux, 2003; Ledoux *et al.*, 2006); il conviendra ainsi d'explorer plus en détail ces relations avant de tirer une conclusion trop hâtive.

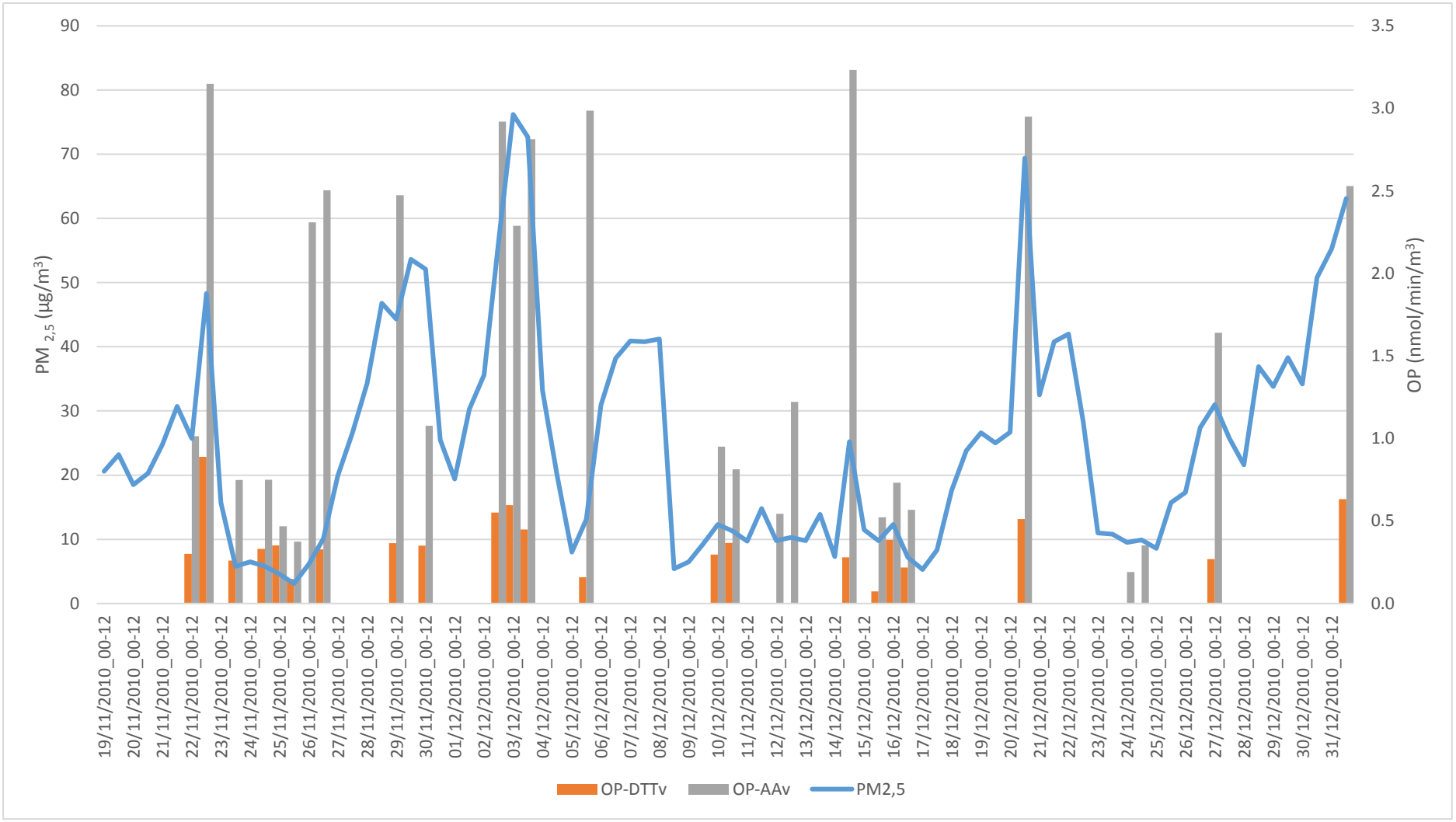


Figure III-1:Evolution temporelle des valeurs OP-DTTv et OP-AAv (nmol/min/m^3) et des concentrations de $PM_{2,5}$ (µg/m^3) des échantillons de $PM_{2,5}$ prélevés à Dunkerque en période hivernale.

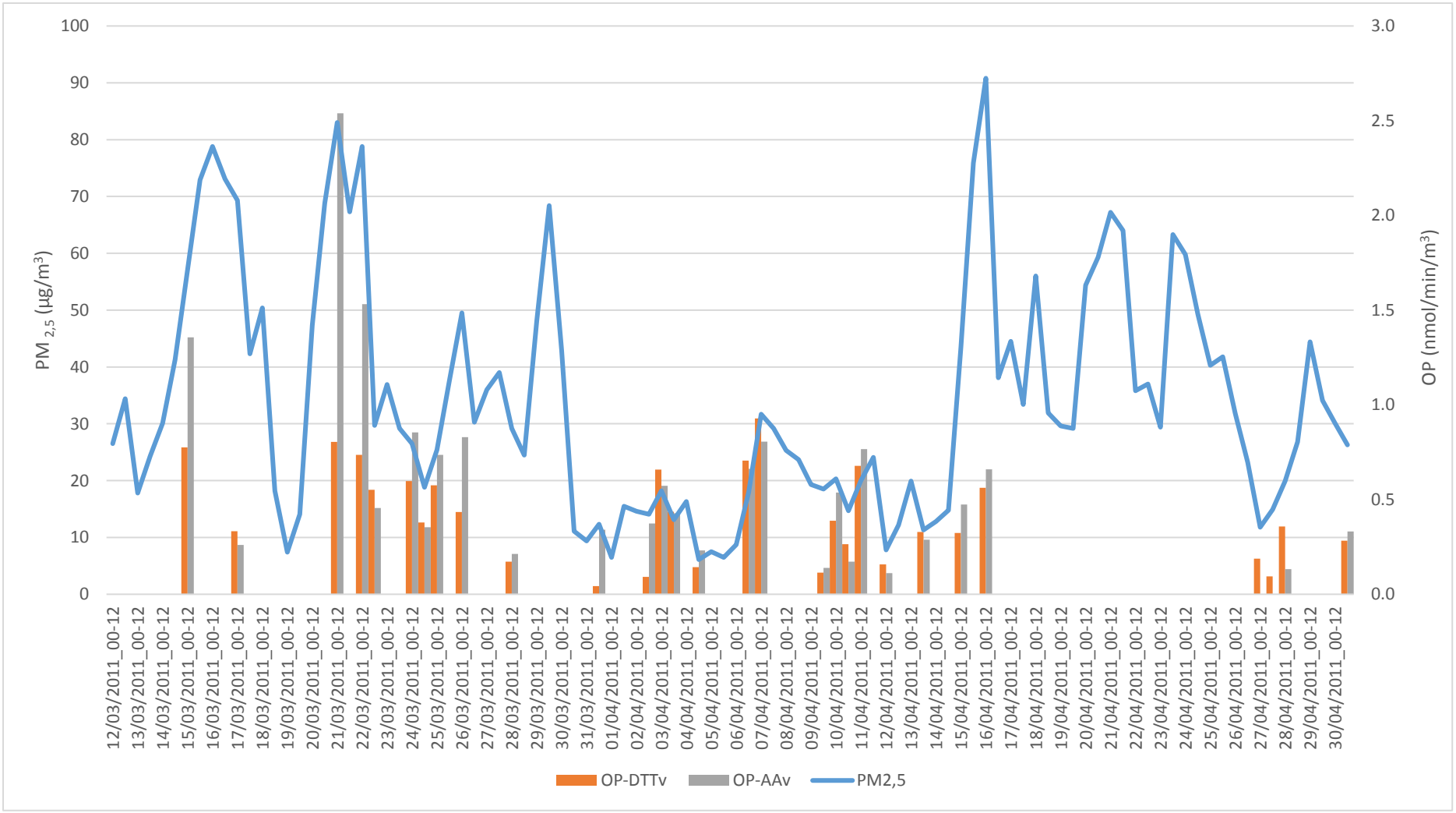


Figure III-2: Evolution temporelle des valeurs OP-DTTv et OP-AAv (nmol/min/m^3) et des concentrations de $PM_{2,5}$ (µg/m^3) des échantillons de $PM_{2,5}$ prélevés à Dunkerque en période printanière.

Pour la période printanière (Figure III-2), les valeurs OP-DTTv sont élevées pour les jours de pic de concentrations de $PM_{2,5}$, mais aussi pour les jours dépassant légèrement la valeur limite. De ce fait, il ne semble pas exister une forte relation entre OP-DTTv et les teneurs en $PM_{2,5}$. Les jours de dépassement correspondent surtout aux vents provenant du secteur nord-est. Sous ce secteur, une forte contribution du nitrate secondaire a été observée ainsi que l'influence des émissions d'une aciérie électrique. Ceci peut permettre de suggérer une relation éventuelle entre les émissions de ces sources et les valeurs OP-DTT. Globalement, les valeurs moyennes de OP-DTTv pour les échantillons sélectionnés était identiques l'hiver et le printemps (0,4 $nmol \cdot min^{-1} \cdot m^{-3}$), tandis que, dans le même temps ces valeurs différaient d'un facteur 2,5 pour OP-AAv (1,6 l'hiver contre 0,6 $nmol \cdot min^{-1} \cdot m^{-3}$) au printemps. Ceci laisse supposer que ces deux paramètres ne sont pas sensibles aux mêmes espèces.

Ces observations nous poussent à étudier plus particulièrement la relation entre le potentiel oxydant OP-AAv et OP-DTTv et la composition chimique des PM et les contributions de sources.

4. Relation entre le potentiel oxydant et la composition chimique des $PM_{2,5}$ et les contributions de sources

Afin d'étudier la contribution des espèces chimiques des PM aux valeurs et variations de potentiel oxydant, la corrélation entre les valeurs de OP-DTTv et OP-AAv et les concentrations des espèces chimiques dans les PM a été étudiée en utilisant les coefficients de corrélation et l'analyse en composantes principales (ACP). Avant la détermination du coefficient de corrélation entre les variables étudiées, le test de Shapiro-Wilk a été réalisé pour évaluer la normalité de la distribution des données. Comme la normalité n'a pas été vérifiée (p<0,001) pour la majorité des variables, le coefficient de corrélation de Spearman a été utilisé. Deux niveaux de significativité ont été considérés, p<0,05 et p<0,001, permettant de conclure sur la corrélation avec 95 % et 99,9 % de confiance, respectivement. De plus, les corrélations plus discrètes ont également été étudiées en utilisant l'ACP.

4.1. Analyse de corrélation

4.1.1. Corrélations avec les espèces chimiques

Les valeurs de potentiel oxydant rapportées au volume, OP-DTTv et OP-AAv, présentent une corrélation statistiquement significative (p <0,05) avec la grande majorité des espèces chimiques (Tableau III-4). Cependant, elles ne sont pas corrélées avec les espèces Ca et Cl^-. Il apparait également que Al, Co, V ne sont corrélés qu'avec OP-DTTv tandis que Sr n'est corrélé qu'avec OP-AAv. Des corrélations plus fortes ont été globalement observées entre les composants des PM et OP-DTTv par rapport à OP-AAv. En particulier, Ag, Al, As, Ba, Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mn, Ni, Pb, Rb, Sb, Sn, Zn, NO_3^- et TC ont montré un coefficient de corrélation supérieur à 0,6 avec OP-DTTv. Un tel niveau de corrélation n'a été observé que pour As, Ba, Cu, Na, Pb, Sb, Sn et TC avec OP-AAv. Une très forte corrélation a été trouvée entre OP-DTTv et Cu (r = 0,85), Cd (r = 0,82) et Sn (r = 0,82). Cette observation est similaire à celle d'autres études (Fang *et al.*, 2016; Calas *et al.*, 2019).

Les constituants majeurs des PM (TC, SO_4^{2-}, NO_3^-, et NH_4^+) semblent être plus corrélés avec OP-DTTv qu'OP-AAv. Ceci est cohérent avec la corrélation plus forte trouvée entre les concentrations des $PM_{2,5}$ avec les valeurs de OP-DTTv en comparaison avec celles de OP-AAv (r = 0,67 contre r = 0,45 respectivement). Nos résultats sont en accord avec d'autres études qui ont trouvé que les composants des aérosols inorganiques secondaires (SIA) étaient corrélés avec OP-DTT (Ma *et al.*, 2018; Jingpeng Wang *et al.*, 2019; Paraskevopoulou *et al.*, 2019).

Au contraire, Mg, Na et Sr ont montré un coefficient de corrélation négatif avec les valeurs OP. Ces éléments sont principalement reliés à l'influence des sels marins sur le site d'étude. Ce point sera discuté dans la sous-partie suivante. Enfin une corrélation modérée (r = 0,46, p<0,001) a été trouvée entre OP-DTTv et OP-AAv, ce qui indique que les deux tests ne répondent pas exactement aux mêmes espèces et indiquent la complémentarité entre les deux tests utilisés (AA et DTT), comme il l'avait été suggéré en comparant les valeurs de OP-AA et OP-DTT pour les deux saisons.

Tableau III-4: Coefficient de corrélation de Spearman (r) entre le potentiel oxydant calculé à partir des vitesses de consommation de AA et DTT (respectivement OP-AAv et OP-DTTv) et les constituants des $PM_{2,5}$, les concentrations de $PM_{2,5}$ et les contributions de source. Seuls les coefficients de corrélation pour lesquels *p* <0,05 sont indiqués (p* <0,001; gras: r> 0,6; italique: r <0,4).**

	OP-DTTv	**OP-AAv**		**OP-DTTv**	**OP-AAv**
Espèces			***Espèces***		
Al	**0,63***		V	0,47*	
Ca			Zn	**0,74***	0,49*
Fe	**0,77***	0,51*	NH_4^+	0,50*	*0,31*
K	0,67*	0,55*	Cl^-		
Mg	*-0,31*	-0,54*	NO_3^-	**0,68***	*0,39*
Na	-0,53*	**-0,62***	SO_4^{2-}	0,56*	*0,28*
Ag	**0,73***	0,52*	TC	**0,72***	**0,68***
As	**0,75***	**0,61***			
Ba	**0,79***	**0,69***	***Contribution de source***		
Bi	**0,79***	*0,39*	Sels marins	-0,40	*-0,39*
Cd	**0,82***	0,47*	Sels marins âgés	-0,55*	**-0,67***
Co	**0,66***		Particules crustales		
Cr	**0,70***	0,56*	Sulfates secondaires	0,58*	*0,38*
Cu	**0,85***	**0,64***	Nitrates secondaires	**0,67***	*0,34*
Mn	**0,72***	*0,33*	Combustion de fioul lourd	0,45*	
Ni	**0,63***	*0,28*	Combustion 2	*0,37*	0,54*
Pb	**0,79***	**0,63***	Trafic hors échappement	**0,80***	**0,66***
Rb	**0,75***	0,54*	Emissions diffuses du site sidérurgique	**0,67***	0,46*
Sb	**0,70***	**0,60***	Cheminée d'agglomération de minerais du site sidérurgique	**0,60***	0,53*
Sn	**0,82***	**0,61***	Aciérie électrique	**0,64***	0,43*
Sr		-0,45*			
Ti	**0,67***	*0,32*	***Potentiel oxydant***		
			OP-DTTv		0,46*
$PM_{2,5}$	**0,67***	0,45*	OP-AAv	0,46*	

Les tests AA et DTT répondent aux espèces oxydantes solubilisées dans la solution de Gamble après extraction des PM. L'extrait comprend non seulement les composés qui ont été identifiés et quantifiés par analyse chimique, mais également des espèces non analysées. Parmi ces espèces, on peut citer les composés organiques hydrosolubles (WSOC), comme les HULIS ou les HAP oxygénés, qui font partie de l'extrait et peuvent contribuer aux valeurs de OP (Ma *et al.*, 2018; Bates *et al.*, 2019; Lin and Yu, 2019; Gao, Godri Pollitt, *et al.*, 2020; H. Jiang *et al.*, 2020). Dans cette étude, la composition inorganique des PM a été étudiée et, sur cette base, le modèle CW-NMF a permis de déterminer les contributions des sources. Par conséquent, l'étude de la corrélation entre les valeurs OP et les contributions des sources permet indirectement de considérer toutes les espèces associées aux émissions de ces sources (y compris les WSOC), qu'elles aient été analysées ou non.

4.1.2. Corrélations avec les sources

De fortes corrélations ($r \geq 0,6$) ont été trouvées entre la contribution des sources « Trafic hors échappement », « Nitrates secondaires », « Emissions diffuses » et « Cheminée d'agglomération » de minerais du site sidérurgique, « Aciérie électrique » et les valeurs OP-DTT. Les trois sources industrielles sont connues pour émettre des métaux ayant des propriétés redox, comme les éléments Fe, Mn, Cr et Cu (E-PRTR, 2011; Hleis *et al.*, 2013; Kfoury *et al.*, 2016), capables de provoquer une surproduction d'ERO. Les contributions des sources «Sulfates secondaires» et «Combustion de fioul lourd» étaient en revanche moyennement corrélées avec OP-DTTv ($0,4 \leq r < 0,6$) et uniquement avec cette variable.

À l'exception des «sels marins âgés» ($r = -0,67$) et "Trafic hors échappement" ($r = 0,66$), OP-AAv n'a montré, au mieux que des corrélations modérées avec les contributions de chacune des 11 sources. Il est intéressant de noter que les sources «Sels marins» et «Sels marins âgés» montrent des corrélations négatives avec les valeurs OP-DTTv et OP-AAv. Cependant, on ne peut pas dire que les émissions liées à ces sources puissent contribuer à une diminution du potentiel oxydant des PM. En effet, sur le site d'étude côtier urbain, les contributions marines élevées sont associées à des vents de vitesse élevée et à des conditions de dispersion favorables (Ledoux *et al.*, 2006). Par conséquent, lorsque l'origine marine est prédominante, la concentration de $PM_{2,5}$ a tendance à être relativement faible, et les valeurs de concentration en métaux également, ce qui pourrait expliquer les faibles valeurs de OP. Enfin,

aucune corrélation significative n'a été trouvée avec la source «Particules crustales» suggérant que cette dernière ne contribue pas significativement aux valeurs de OP.

4.2. Analyse en composantes principales (ACP)

L'analyse en composantes principales (ACP) est une analyse multivariée, permettant de mettre en évidence des relations discrètes entre des variables qui peuvent être regroupées en composantes. Cette approche dans le traitement des résultats est donc complémentaire à l'étude des corrélations entre 2 variables, présentées précédemment. Pour réaliser les ACP, le logiciel R a été utilisé en plus du package FactomineR (Lê, Josse and Husson, 2008). L'ACP a été appliquée aux données de composition chimique des 57 échantillons de $PM_{2,5}$ sélectionnés (29 espèces étudiées).

Les contributions de sources et les valeurs OP ont été considérées comme des variables supplémentaires. Les 5 premiers axes obtenus expliquent 71,7 % de la variabilité des données. Les coefficients de corrélation entre les constituants des $PM_{2,5}$ et les 5 premiers axes sont donnés sur la Figure III-3.

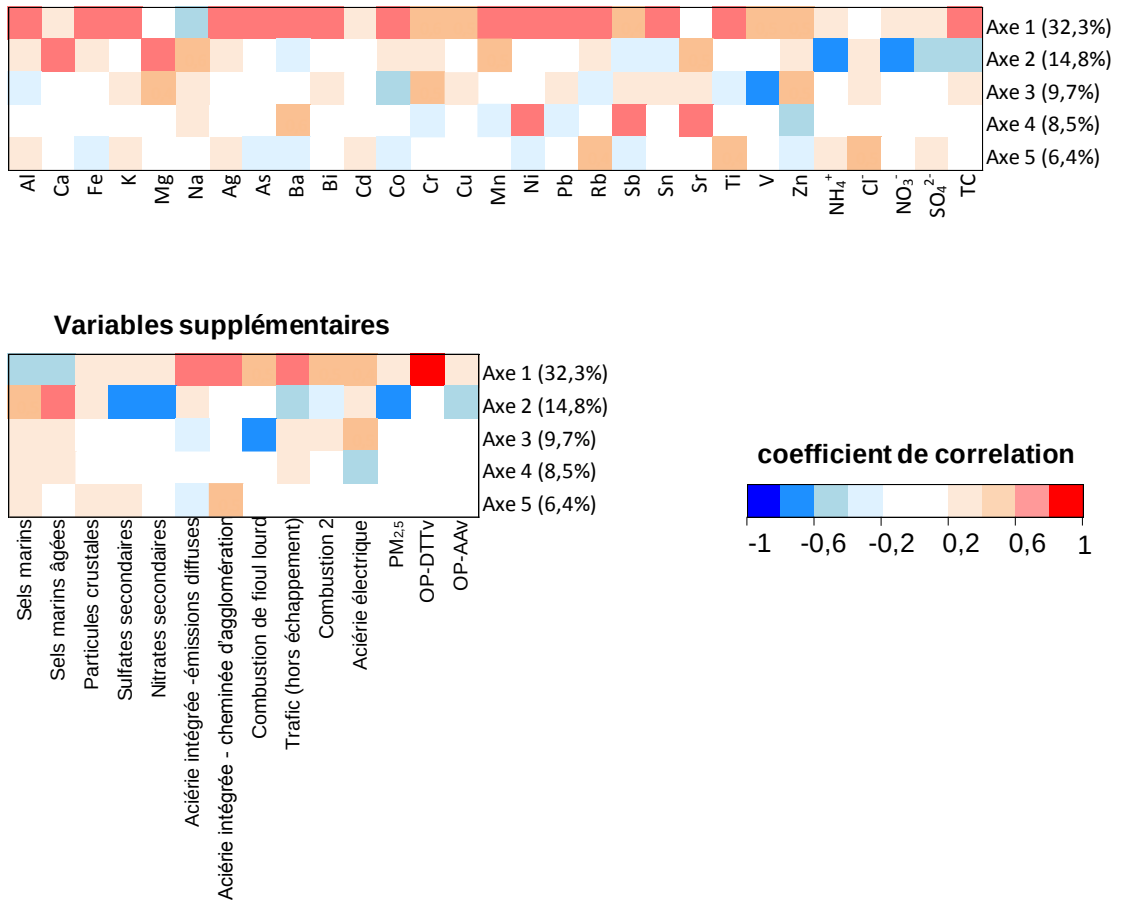


Figure III-3: Résultats de l'Analyse en Composantes Principales (ACP) des 57 échantillons de $PM_{2,5}$ prélevés à Dunkerque. Les coefficients de corrélation entre les cinq premiers axes de l'ACP, et les composantes des $PM_{2,5}$ sont considérés comme variables actives et les contributions de sources et les valeurs de potentiel oxydant (OP-AAv et OP-DTTv) comme variables supplémentaires.

Comme OP-AAv et OP-DTTv montrent des coefficients de corrélation significatifs uniquement avec les deux premières composantes principales, l'accent est mis uniquement sur ces dernières. Les projections des variables sur les deux premiers axes qui représentent ensemble 47,1 % de la variance totale est présentée dans la Figure III-4.

L'axe 1 est fortement associé aux métaux (allant des fortes aux faibles valeurs de r, avec r > 0,6: Bi, K, Rb, Ag, Sn, As, Fe, Al, Ti, Pb, Mn, Ba, Co, TC et Ni, et négativement associé à Na. Le premier axe mets donc en évidence que plusieurs métaux sont corrélés et que lorsqu'une concentration est élevée pour l'un de ces éléments, toutes les concentrations ont tendance à être également élevées pour les autres. L'axe 1 fait apparaître une distinction entre

les constituants des sels marins, et les métaux typiquement émis par les activités anthropiques et industrielles.

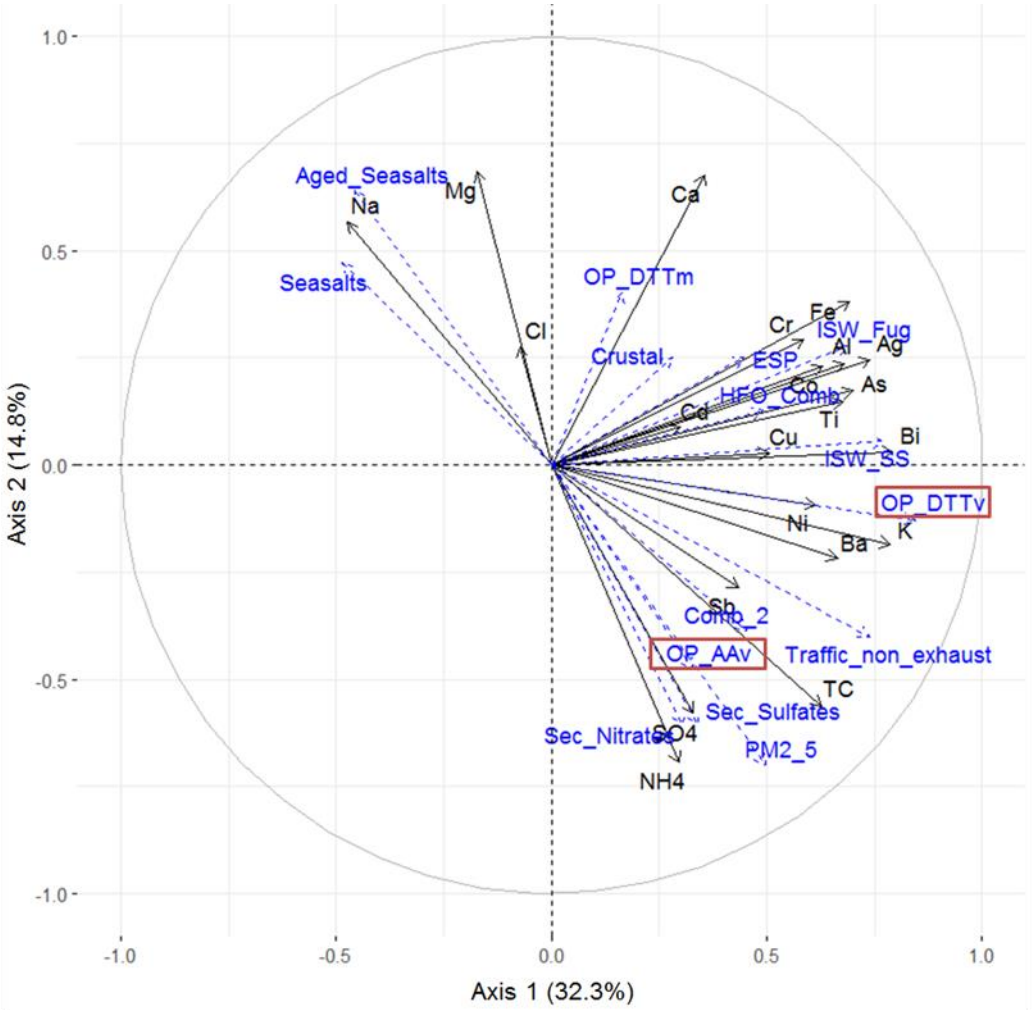


Figure III-4: Analyse en composantes principales des 57 échantillons de $PM_{2,5}$ prélevés dans la région de Dunkerque. Projections des variables dans le plan axe1 - axe2 (en noir: variables actives; en bleu: variables supplémentaires).

NH_4^+, NO_3^-, SO_4^{2-} et TC sont négativement corrélés avec le deuxième axe tandis que Na, Sr, Ca et Mg sont positivement corrélés à ce deuxième axe. Le second axe fait ainsi apparaitre une distinction entre les composés marins (partie positive de l'axe) et les aérosols inorganiques secondaires (sulfates secondaires et nitrates secondaires) (partie négative de l'axe). Dans la zone d'étude, les SIA sont principalement associés aux vents soufflant du continent (vent d'Est) et au transport longue distance, contrairement aux sels marins, pour lesquels les contributions les plus élevées sont observées par des vents de secteur Nord ou

Sud-Ouest, par des vitesses > 5 m/s. En parallèle, il a été remarqué dans cette étude que lorsque les contributions de sels marins sont élevées, celles des aérosols inorganiques secondaires (SIA) étaient faibles (Figure III-5). Ceci explique le fait que les SIA soient à l'opposé des sels marins sur le second axe. NH_4^+, NO_3^-, SO_4^{2-} et TC contribuent le plus à la masse des $PM_{2,5}$ et une forte corrélation (r = -0,70) a été trouvée entre la concentration de $PM_{2,5}$ et le deuxième axe.

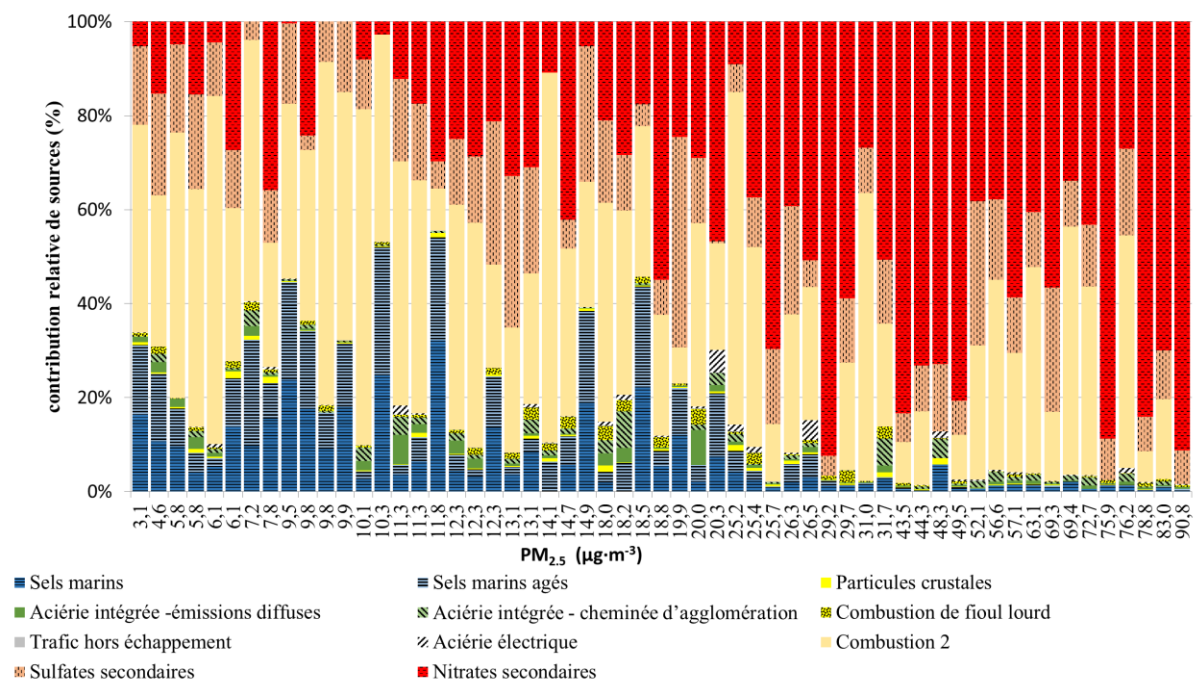


Figure III-5: Contributions relatives des sources de $PM_{2,5}$ en fonction de la concentration en $PM_{2,5}$ sur les 57 échantillons selectionnés sur la période novembre 2010 - avril 2011.

OP-DTTv est très fortement corrélé (r = 0,84) avec le premier axe en raison des relations claires entre les résultats du test DTT et les concentrations de métaux, tandis que OP-AAv n'apparaissait que moyennement anti corrélé (r = -0,48) avec le deuxième axe.

Considérant maintenant les deux dimensions, et donc uniquement 47,1 % de la variabilité des données, OP-AAv apparait lié aux sources « Nitrates secondaires », « Sulfates secondaires » et « Combustion 2 » (trafic routier et combustion de biomasse). OP-AAv est également très fortement anti-corrélé avec les sources de « sels marins » et de « sels marins âgés ». Ce résultat n'était pas aussi bien mis en évidence en étudiant le coefficient de corrélation sur l'ensemble des données.

Ensuite, pour OP-DTTv, les résultats de l'ACP sont mitigés car il est uniquement corrélé avec l'axe 1. En considérant les axes 1 et 2, une seule relation claire est apparue avec la source « cheminée d'agglomération de minerais du site sidérurgique» tandis que plusieurs avaient été mises en évidence par l'étude du coefficient de corrélation. Une discussion plus approfondie de ces résultats sera menée par la suite.

5. Relation entre le potentiel oxydant et les sources de $PM_{2,5}$

5.1. Relation entre le potentiel oxydant et les sources locales de $PM_{2,5}$

Des représentations polaires (polarplots) et des roses de potentiel oxydant et de concentration ont été utilisées pour étudier les relations entre les valeurs de OP et les contributions de source. Les représentations polaires représentent la variation d'un paramètre quantitatif (concentration, valeur de OP, contribution de sources) en fonction de la direction et de la vitesse du vent. Pour chaque échantillon de $PM_{2,5}$, les valeurs des paramètres obtenues pour la période de 12 h ont été attribuées à chacune des 12 données correspondantes de vitesse et direction de vent (moyenne horaire). L'ensemble des données utilisées pour tracer chaque représentation polaire est ainsi composé de 57 échantillons x 12 lignes. Les roses de OP et de concentration, qui donnent la valeur moyenne dans une direction particulière de vent, ont été calculées en utilisant le même jeu de données après avoir fait la moyenne des valeurs à des intervalles de 45°. Le logiciel R a été utilisé en plus du package openair (Carslaw and Ropkins, 2012) pour effectuer ces calculs. Les roses représentant l'OP en fonction de la direction du vent et les représentations polaires considérant OP (par m^3 et par µg de $PM_{2,5}$) en fonction de la direction et de la vitesse de vent sont données sur la Figure III-6.

OP-AA et OP-DTT n'ont pas exactement le même comportement vis-à-vis de la direction du vent. Ces 2 façons de représenter le OP montrent que le maximum pour OP-AAm et OP-DTTm a été obtenu lorsque le vent souffle du secteur nord-ouest (NO), tandis que le maximum pour OP rapporté au volume est observé dans la direction sud-est (SE) pour OP-AAv, et direction SE, ouest (O) et nord-est-est (NE-E) pour OP-DTTv. Les secteurs O-NO et

SE correspondent à la zone industrielle comprenant respectivement le site sidérurgique et le secteur urbain, tandis que dans la direction NE-E se trouve l'aciérie électrique.

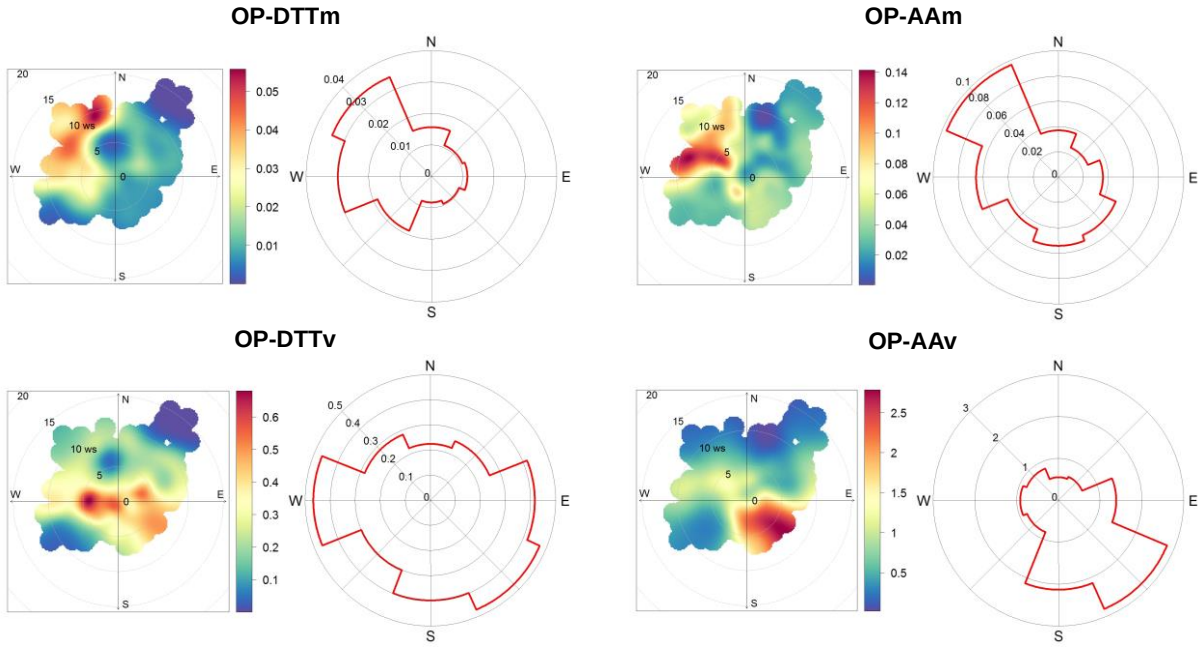


Figure III-6: Roses et représentations polaires de OP-DTT et OP-AA normalisées par rapport au volume d'air (OP-DTTv et OP-AAv) et à la masse (OP-DTTm et OP-AAm) des échantillons de $PM_{2,5}$ à Dunkerque.

Lorsque les valeurs de OP-AAm sont considérées, 1 µg de PM provenant du secteur NO incluant la zone industrielle possède un potentiel oxydant intrinsèque maximal par rapport à une masse équivalente de PM provenant des autres secteurs de vent. En normalisant les valeurs de OP au volume d'air, le secteur NO ne présente plus la valeur la plus élevée de OP. Ceci est un résultat marquant. Ainsi, en considérant 1 m^3 d'air que l'homme peut respirer, lorsque le vent souffle de ce secteur, les émissions de la zone industrielle n'apparaissent pas comme les plus impactantes sur les valeurs de OP. Les valeurs de OP-AAv plus élevées sous des vents de secteur S-E pourraient être expliquées par des influences du secteur urbain sans négliger les apports longue distance (comme on le verra dans la partie suivante). Ces contributions semblent être responsables d'une réponse de potentiel oxydant OP-AAv plus élevée que sous l'influence des sources du secteur NO.

En revanche, les valeurs OP-DTTv montrent non seulement un maximum sous le secteur urbain mais aussi lorsque le vent souffle de la direction ouest, et NE-E dans une moindre

mesure, suggérant la présence d'un émetteur de particules à fort potentiel oxydant OP-DTT dans la zone industrielle.

De manière à mieux discriminer les sources qui pourraient expliquer les fortes valeurs de OP obtenues, les représentations polaires des contributions des 11 sources, exprimées en $\mu g/m^3$ ainsi que de la concentration des $PM_{2,5}$ sont présentées sur la Figure III-7, afin de les comparer avec les mêmes représentations de OP-DTTv et OP-AAv (Figure III-6).

Selon nous, les représentations polaires apportent un critère supplémentaire fort pour valider les relations entre les valeurs OP et la contribution des sources d'émission des PM, mises en évidence avec le coefficient de corrélation de Spearman et l'ACP. En utilisant cet outil, les valeurs de OP et de contributions de source sont distribuées en fonction de la direction et de la vitesse du vent. Lors de l'étude des représentations polaires, la position géographique des sources est directement prise en compte (par la direction de vent). Les caractéristiques de l'émission le sont également. Elles peuvent être déduites à partir du maximum de concentration en lien avec la vitesse de vent. Par exemple, la remise en suspension, la production de particules sous l'effet mécanique du vent (cas des embruns marins) ou le rabattement des émissions de cheminée au sol sous l'effet de la vitesse du vent, peut être mis en évidence avec une concentration élevée pour une vitesse de vent élevée (Carslaw *et al.*, 2006; Ledoux *et al.*, 2018). Ceci permet d'approfondir l'étude et de renforcer les conclusions concernant les relations entre les valeurs de OP et les contributions de sources.

Le tracé de OP-AAv présente clairement des similarités avec celui des $PM_{2,5}$, de la source « combustion liée au trafic routier et à la biomasse » (combustion 2). Les HULIS pourraient être la raison de la relation entre OP et les sources de combustion, car ces dernières émettent ces espèces redox fortement actives connues pour participer aux valeurs OP (Dou *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2018). L'observation est également cohérente avec celle d'une autre étude qui a montré que les émissions des véhicules (émissions d'échappement et hors échappement dans leur ensemble) contribuaient fortement à la production des ERO (Yu *et al.*, 2019).

A partir des observations des Figure III-6 et Figure III-7, la source « trafic hors échappement » pourrait également participer à OP-AAv, mais l'absence de corrélation entre les deux ne va pas dans le sens de cette contribution. Ces premières observations sont en accord avec les conclusions de l'ACP. Cependant, l'ACP suggérait une relation entre OP-AAv et les aérosols inorganiques secondaires pour 47,1% des données. Les données de

représentations polaires montrent peu de similarité entre les tracés correspondants, ce qui semble invalider cette relation. À l'exception des représentations polaires des $PM_{2,5}$, de la combustion 2 et potentiellement de la source « trafic hors échappement », OP-AAv ne montre pas de similarité avec les autres sources. Ceci semble contredire les conclusions partielles tirées de l'étude des coefficients de corrélation. Ceci tend à montrer qu'utiliser uniquement le coefficient de corrélation entre la contribution des sources (ou les concentrations d'espèces) et les valeurs de OP n'est pas suffisant pour conclure sur les relations avec OP.

La représentation polaire de OP-DTTv montre également des similarités et des compatibilités avec plusieurs sources. Parmi ces sources, les émissions de la cheminée d'agglomération de minerais de l'aciérie intégrée semblent être responsables du spot observé dans la direction ouest à une vitesse de vent proche de 5 m/s. Dans cette même direction, les sources « émissions diffuses du site sidérurgique » et « combustion de fioul lourd » sont également des contributeurs possibles. De plus, dans la direction Est - Nord-Est, le spot de concentration OP-DTTv se superpose à celui observé pour l'aciérie électrique, faisant des émissions liées à cette source un autre facteur influençant les valeurs de OP-DDT. Des valeurs relativement élevées observées dans le secteur SE pourraient être dues à la source de combustion 2 et/ou à la source trafic hors échappement. Un article récent publié dans la revue Nature a par ailleurs pointé cette dernière source pour expliquer les variations de OP-DTT (Daellenbach *et al.*, 2020). Ici, les observations correspondent assez bien à celles de l'étude ACP, mais contredisent également à nouveau certaines conclusions faites en utilisant le coefficient de corrélation. Par exemple, une forte corrélation a été trouvée entre les nitrates secondaires et OP-DTTv ($r = 0,67$, $p < 0,001$), mais leurs représentations polaires respectives peut la remettre en question. Enfin, cette approche a permis d'écarter la contribution des sources de sels marins, sels marins âgés, particules crustales et des sulfates secondaires aux valeurs de OP.

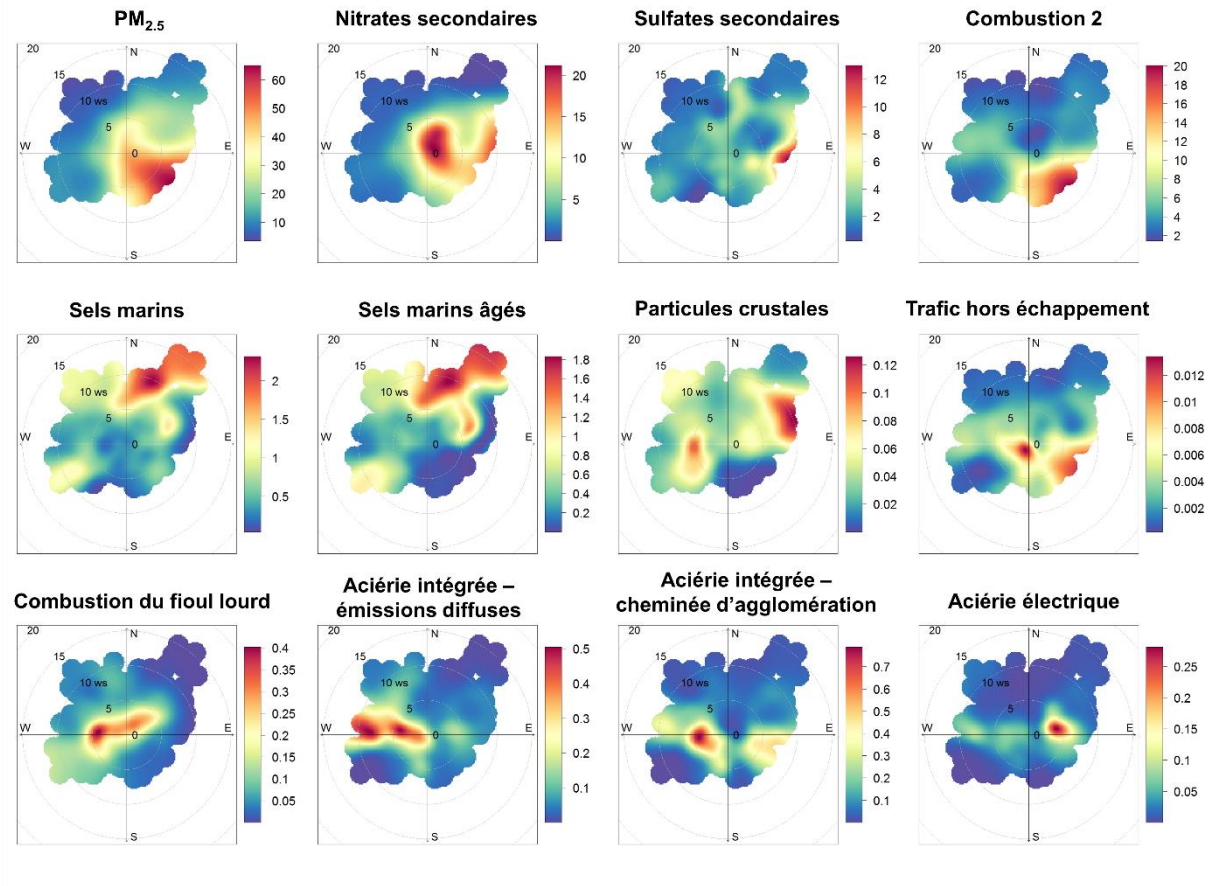


Figure III-7: Représentations polaires de la concentration des $PM_{2,5}$ et des contributions des 11 sources de $PM_{2,5}$ estimées par le modèle CW-NMF à Dunkerque (en µg·m^{-3}).

À notre connaissance, pour la première fois, des représentations polaires de valeurs de OP et des contributions de sources ont été comparées pour étudier et valider l'influence des sources de $PM_{2,5}$ sur les valeurs de OP. A la lumière des relations qu'elles permettent de valider ou d'infirmer, il nous apparaît important de les conseiller dans les futurs travaux visant à relier OP aux contributions de sources ou aux constituants chimiques des PM

5.2. Relation entre le potentiel oxydant et les sources de $PM_{2,5}$ à longue distance

La méthode des concentrations pondérées le long d'une trajectoire (Concentration Weighted Trajectory ou CWT) (Cheng *et al.*, 2013; Dimitriou *et al.*, 2015) a été utilisée pour étudier les relations entre OP et les sources de $PM_{2,5}$ à longue distance et pour identifier les

zones source de particules à fort potentiel oxydant. Les méthodes CWT supposent que lorsqu'une masse d'air traverse une zone où se produisent des émissions de substances dans l'air, celle-ci peut transporter les composés émis tout le long du trajet qu'elle effectue et ceci jusqu'à un site récepteur étudié. En utilisant des rétrotrajectoires de masse d'air et en leur affectant des valeurs de concentration ($PM_{2,5}$, concentration d'espèces chimiques, valeurs de OP) observées sur le site récepteur, il est possible de localiser les zones responsables de valeurs élevées de concentration (Carslaw, 2019). Les rétrotrajectoires ont été calculées à l'aide du modèle « the Hybrid Single Particles Lagrangian Integrated Trajectory (HYSPLIT) » (Stein *et al.*, 2015; Rolph, Stein and Stunder, 2017), en considérant la base de données météorologiques du modèle Global Data Assimilation System (GDAS) à 0,5 degré et une altitude de 100 mètres au niveau du site récepteur. Pour chaque échantillon de $PM_{2,5}$, quatre rétrotrajectoires remontant à 72 h ont été attribuées (une trajectoire toutes les 3 heures) et les valeurs de OP obtenues pour la période de 12 heures ont été associées aux 4 trajectoires correspondantes. L'ensemble de données utilisées pour le calcul CWT est composé de 72 (h) x 57 (nb échantillons) x 4 (nb trajectoires) lignes. Le logiciel R a été utilisé en complément du package openair (Carslaw and Ropkins, 2012) pour effectuer ces calculs. En plus des données de OP, les contributions de sources ont été introduites dans le modèle CWT et ont abouti aux cartographies présentées sur la Figure III-8.

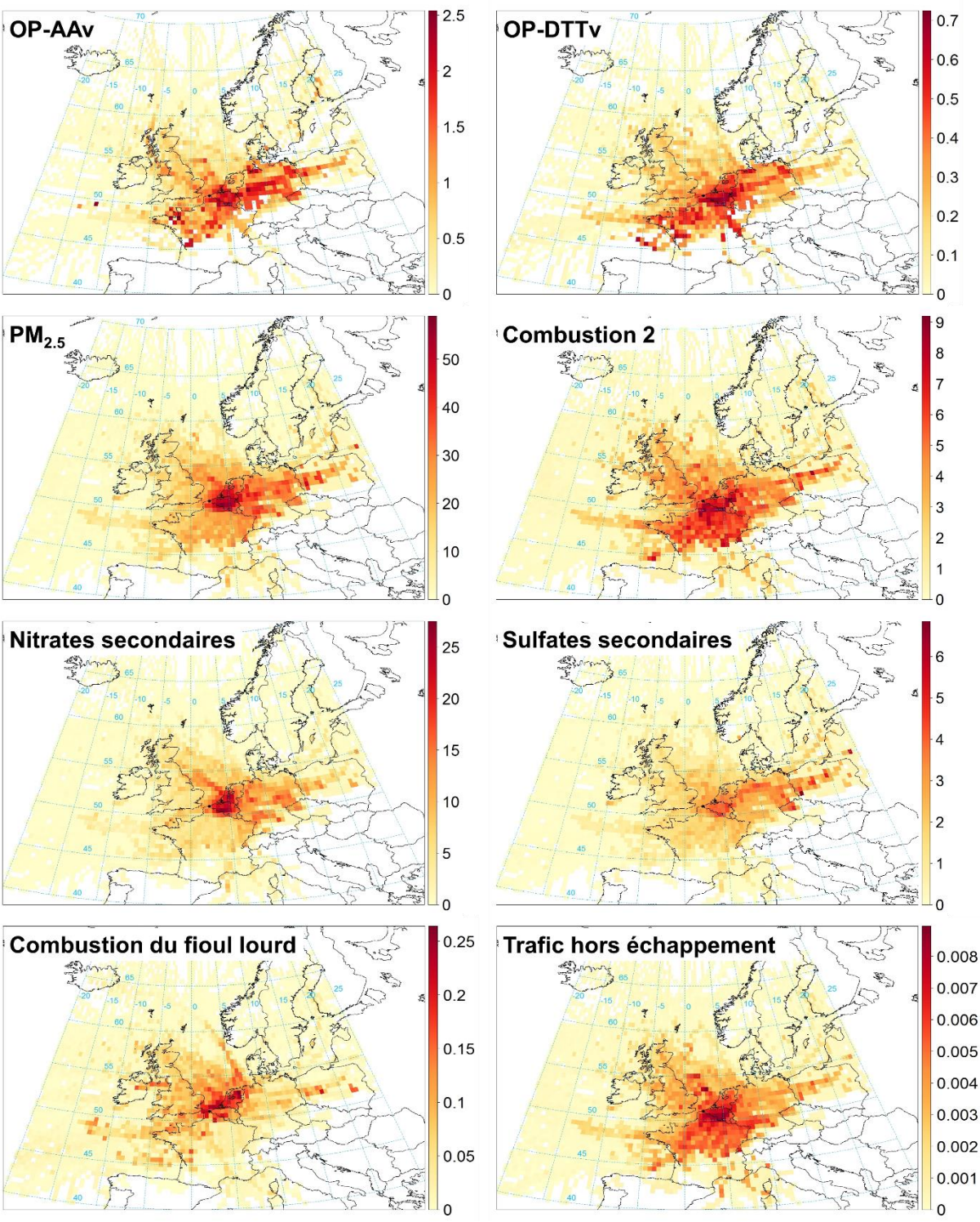


Figure III-8 : Trajectoires pondérées en fonction des données de concentration (CWT) de OP-AAv et OP-DTTv (nmol·min^{-1}·m^{-3}), $PM_{2,5}$ et des contributions des sources estimées par l'analyse CW-NMF (en µg·m^{-3}) (Les sources marines et crustales montrant peu de relation avec OP ainsi que les sources locales industrielles ont été exclues de ce calcul).

Les zones contribuant le plus à OP-DTTv se situent à l'intérieur des terres notamment dans la partie supérieure de l'Europe continentale occidentale avec la France, la Belgique, l'Allemagne et la Pologne.

Pour OP-AAv, la zone source principale est située en Belgique et dans le centre de l'Allemagne. Le transport longue distance venant de ces régions sources situées à l'est de notre site d'étude pourrait également expliquer les valeurs élevées de OP observées par des vents d'Est et de Sud-Est sur les représentations polaires (Figure III-6).

La Mer-du-Nord, la Manche et la partie côtière de l'Océan Atlantique apparaissent également comme des zones sources, notamment pour l'OP-DTTv. Cette observation pourrait être reliée à l'influence des émissions liées à la combustion de fioul lourd, qui est le combustible utilisé pour le transport maritime (Roche, 2016). Cette hypothèse semble être confortée par les relations trouvées d'une part entre l'OP-DTTv et la source de combustion du fioul lourd (Figure III-6, Figure III-7) et d'autre part, par le tracé de CWT obtenu pour cette source (Figure III-8). Nous pouvons rappeler ici que la Manche et la Mer-du-Nord sont parmi les routes de navigation les plus utilisées dans le Monde pour le transport maritime (EEA, 2013b; Ledoux *et al.*, 2018).

Les résultats de tracé CWT pour les nitrates secondaires ont mis en évidence principalement la Belgique et le sud des Pays-Bas comme régions sources. Cette observation rejoint les résultats des travaux de Pay et al., (2012, 2010) qui identifient ces pays comme des émetteurs importants de NOx, qui sont les précurseurs des espèces nitrates. Par ailleurs, les sulfates secondaires semblent avoir comme zone source la Belgique, le nord de l'Allemagne et la Pologne, correspondent aux pays dans lesquels des dépassements de la valeur limite de SO_2 ont été observés durant la période de notre étude en 2010-2011 (EEA, 2012). Dans les deux cas, la similitude avec les CWT de OP-AAv et OP-DTTv est faible, ce qui nous permet d'avancer que le potentiel oxydant ne semble relié avec les sources nitrates secondaires et sulfates secondaires. Ce résultat est en accord avec les observations issues des représentations polaires (Figure III-6, Figure III-7).

Les zones sources de de $PM_{2,5}$ sont identifiées au nord de la France, en Belgique, au Luxembourg, aux Pays-Bas et en Allemagne également. Notre résultat rejoint cette fois ceux de Waked et al., (2018) et Pay et al., (2012) qui ont montré que ces pays étaient une source

importante de particules en relation avec les émissions industrielles et celles liées au transport maritime, en particulier pour la Belgique et les Pays-Bas.

Les tracés CWT de la source combustion 2 et de trafic hors échappement ont montré des concentrations plus élevées sur le continent, ce qui était attendu compte tenu de la localisation de ces sources. Les régions sources de la combustion liée au trafic et à la biomasse et du trafic hors échappement présentent de bonnes correspondances avec les tracés CWT de OP-DTTv et OP-AAv. Ces observations viennent conforter nos résultats obtenus grâce aux représentations polaires (Figure III-6 ; Figure III-7) montrant une influence de ces sources sur les valeurs de OP.

Enfin l'Europe de l'Est, en particulier la Bulgarie, la République tchèque et la Pologne, ont également été identifiés comme une source importante de particules en Europe (EEA, 2013a). Néanmoins, dans ce travail, nous n'avons pas observé leur influence sur les représentations CWT. Ceci peut s'expliquer par le fait que nous n'avons pas rencontré de situations où les masses d'air provenaient de ces régions pendant la période d'échantillonnage.

6. Conclusion

Notre objectif ici était d'étudier le potentiel oxydant des $PM_{2,5}$ par des méthodes chimiques et d'évaluer le lien entre le potentiel oxydant, la composition chimique et les sources des $PM_{2,5}$.

Pour cela, 57 échantillons collectés sur filtre en hiver et au printemps 2010-2011 à Dunkerque (Kfoury, 2013), ont été considérés. La fraction bioaccessible de ces échantillons a été préparée par extraction à l'aide d'un fluide pulmonaire synthétique, le Gamble. Ensuite, le potentiel oxydant de ces extraits a été évalué en utilisant deux méthodes chimiques : le test à l'acide ascorbique (AA) et le test au dithiothréitol (DTT).

L'étude de la variation temporelle des valeurs de OP a montré que les valeurs de OP-AAv varient de manière sensible en fonction des concentrations de $PM_{2,5}$. Les valeurs de OP-DTTv semblent être moins sensibles aux variations de concentration de $PM_{2,5}$.

Les concentrations des $PM_{2,5}$, celles de certains composants des $PM_{2,5}$ et les contributions de sources de $PM_{2,5}$ se sont révélées être corrélées avec les valeurs de OP (AA ou DTT). Les espèces chimiques Ag, Al, As, Ba, Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mn, Ni, Pb, Rb, Sb, Sn, Zn, NO_3^- et TC ont montré une forte corrélation ($r > 0,6$) avec OP-DTTv et les éléments Cu, Cd, et Sn présentent même une très forte corrélation ($r > 0,8$). Par ailleurs, une forte corrélation a été observée également entre As, Ba, Cu, Na, Pb, Sb, Sn et TC et OP-AAv.

Les éléments chimiques n'étant spécifiquement relié à une source, l'étude de la corrélation entre les valeurs OP et les contributions des sources obtenues par le modèle CW-NMF a été menée. De fortes corrélations ont été obtenues entre les valeurs OP-DTTv et la contribution des sources « Trafic hors échappement », « Nitrates secondaires », « Emissions diffuses du site sidérurgique », « Cheminées d'agglomération de minerais du site sidérurgique », et « Aciérie électrique ». OP-AAv est fortement corrélé avec la source « Trafic hors échappement » ($r = 0,66$). Certaines de ces observations ont été validées ou invalidées par l'ACP.

Pour la première fois à notre connaissance, des représentations polaires de potentiel oxydant et des contributions des sources de PM ont été comparées. Cette approche a permis d'aller plus loin dans l'interprétation des données de potentiel oxydant et obtenir des

informations plus fines que celles apportées par les corrélations et l'ACP, sur les paramètres qui l'influencent. En particulier cette approche apporte des critères de validation supplémentaires en introduisant la position des sources et la vitesse des vents comme critère de discrimination.

OP-AAv est apparu clairement lié aux concentrations de $PM_{2,5}$ et aux sources de combustion. Le test au dithiothréitol est apparu clairement lié à des sources émettant des métaux, dans notre cas, les émissions du site sidérurgique intégré, et celles provenant d'une aciérie électrique, la combustion de fioul lourd, sans exclure les autres sources de combustion.

Par ailleurs, nous avons pu montrer que les sels marins, les sels marins âgés, les particules crustales, sulfates secondaires et nitrates secondaires ne semblent pas contribuer aux valeurs OP.

L'utilisation du modèle de concentrations pondérées sur les trajectoires (CWT) a permis d'identifier certaines régions sources de $PM_{2,5}$ (Allemagne, Belgique et Pays-Bas), montrant que le transport à longue distance est également un paramètre à prendre en compte lors de l'interprétation des données de potentiel oxydant.

Enfin, cette étude a ainsi montré que la concentration de $PM_{2,5}$ et en particulier les sources de combustion liée au trafic routier et à la combustion de biomasse avait un effet prédominant sur le potentiel oxydant, évaluée par le test à l'acide ascorbique.

Le test faisant appel au dithiothréitol est apparu davantage sensible à des espèces issues de sources riches en éléments métalliques, et en particulier les émissions diffuses et la cheminée d'agglomération de minerais du site sidérurgique, l'aciérie électrique, le trafic hors échappement et la combustion du fioul lourd (Tableau III-5).

Tableau III-5: Sources et composés ayant un effet prédominant ou non sur les valeurs de potentiel oxydant, obtenues par les tests à l'acide ascorbique et au dithiothtreitol, sur 57 echantillons de $PM_{2,5}$ prélevés à Dunkerque, extraits avec la solution de Gamble. Récapitulatif issu des conclusions relatives aux corrélations, aux représentations polaires et aux CWT.

	OP-AA	**OP-DTT**
Sources avec effet prédominant sur OP	Combustion 2 (trafic routier et biomasse), Trafic hors échappement	Trafic hors échappement, Emissions diffuses Cheminée d'agglomération de minerais du site sidérurgique, Combustion de fioul lourd, Aciérie électrique.
Sources sans effet prédominant sur OP au regard des contributions	Sels marins, Sels marins âgés, Particules crustales, Sulfates secondaires, Nitrates secondaires Emissions diffuses du site sidérurgique, Cheminées d'agglomération de minerais du site sidérurgique, Aciérie électrique.	Sels marins, Sels marins âgés, Particules crustales, Sulfates secondaires, Nitrates secondaires
Espèces corrélées	As, Ba, Cu, Na, Pb, Sb, Sn et TC	Ag, Al, As, Ba, Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mn, Ni, Pb, Rb, Sb, Sn, Zn, NO_3^- et TC
Espèces non corrélées	Mg, Na, Ca, Cl, Al, Co, V	Mg, Na, Ca, Cl, Sr

Chapitre 4 : Etude de l'influence de l'origine et de la composition des particules sur le stress oxydant et relation avec le potentiel oxydant

Chapitre 4 : Etude de l'influence de l'origine et de la composition des particules sur le stress oxydant et relation avec le potentiel oxydant

Introduction

Ce chapitre vise à étudier le lien entre le potentiel oxydant, stress oxydant et les caractéristiques physico-chimiques des particules et de leurs différentes fractions (extrait hydrosoluble, extrait organique, particules débarrassées de leurs fractions hydrosolubles et organiques). Pour cela, nous avons sélectionné des $PM_{2,5-0,3}$ collectées sous différentes influences (urbaine, trafic routier, industrielle) et à différentes saisons (printemps, été, automne, hiver et échantillon annuel) au niveau du site urbain. A partir de ces PM, nous avons préparé les différentes fractions et avons ensuite exposé les cellules BEAS-2B à différentes doses d'équivalent- particules, dans le but de déterminer une relation dose-réponse à l'aide du test de cytotoxicité (WST-1), et ceci afin de pouvoir sélectionner une dose d'intoxication convenable pour étudier le stress oxydant. Ce dernier a été évalué par la capacité des particules à générer des espèces réactives de l'oxygène (ERO), à engendrer des altérations membranaires (par la mesure de la 8-isoprostane), aux protéines (par le dosage des protéines carbonylées) et à l'ADN (par la quantification de la 8-hydroxydéoxyguanosine). Pour mieux comprendre l'effet de la composition chimique sur la réponse cellulaire, des échantillons synthétiques mimant la composition d'émissions industrielles et préparés à partir d'oxydes métalliques et d'un noir de carbone, ont été considérés pour compléter cette étude.

Ce chapitre présentera les résultats suivants :

- La composition chimique des échantillons de $PM_{2,5-0,3}$,
- La cytotoxicité des échantillons de $PM_{2,5-0,3}$ et de leurs différentes fractions,
- L'évaluation de la réponse des cellules exposées aux $PM_{2,5-0,3}$ et à leurs différentes fractions en termes de stress oxydant,
- La mesure du potentiel oxydant des extraits hydrosolubles et organiques des $PM_{2,5-0,3}$.

1. Caractéristiques chimiques des échantillons de $PM_{2,5}$

Les échantillons de $PM_{2,5-0,3}$ considérés dans ce chapitre ont été échantillonnés et caractérisés pour leur composition chimique dans le cadre de précédents projets de recherche menés par le laboratoire UCEiV : projet PACATOX dans le cas des échantillons de typologie urbaine (ANSES, 2014) et projet Tripler pour les échantillons de typologie trafic routier et industries (ANSES, 2016). En complément, l'échantillon certifié (SRM 1648a) de particules a été intégré dans cette série d'échantillons. Pour nous permettre de répondre aux objectifs de ce chapitre, les données de composition chimique des échantillons sont décrites dans cette partie.

1.1. Composition en espèces ioniques hydrosolubles, éléments majeurs et éléments traces

Les teneurs en éléments majeurs et traces ainsi qu'en espèces inorganiques hydrosolubles sont reportées dans le Tableau IV-1. Le Carbone (11,3 – 19,0 %), les espèces hydrosolubles nitrate NO_3^- (8,1 – 14,3 %), sulfate SO_4^{2-} (4,0 – 8,3 %), chlorure Cl^- (0,4 – 8,6 %), calcium Ca^{2+} (3,7 – 5,8 %), sodium Na^+ (0,4 – 5,0 %), ammonium NH_4^+ (1,3 – 2,3%), ainsi que les éléments fer Fe (3,1 – 8,7 %) et aluminium Al (1,2 – 3,4 %) représentent des constituants majoritaires des particules. Dans l'échantillon « Urbain » (U-PM), ces espèces expliquent entre 52,6 % (été) et 58,3 % (hiver) de la masse de l'échantillon, contre 51,7 % dans l'échantillon « Trafic » (T-PM) et 57,5 % dans l'échantillon « Industries » (I-PM). Sur le site urbain, les ions NO_3^-, qui constituent l'espèce prépondérante des ions inorganiques secondaires, sont détectés en quantité plus élevée au printemps qu'aux autres saisons, notamment en raison de conditions propices à leur accumulation dans l'atmosphère à cette saison (Favez *et al.*, 2012; Kfoury *et al.*, 2016). La proportion de NO_3^- la plus élevée est observée dans l'échantillon T-PM (14,3 %), et ceci pourrait être relié aux fortes concentrations de NOx observées sur ce site (données Atmo HdF), et qui sont bien connues pour se transformer dans l'atmosphère en nitrate. Les ions Na^+ et Cl^- sont connus pour être associés aux aérosols marins, dont la contribution peut être significative sur le site d'étude (échantillons urbain et industries) en raison de sa proximité avec l'espace Manche-Mer du Nord. Les données montrent une influence des aérosols marins plus importante en hiver, ce qui est vraisemblablement relié aux conditions météorologiques favorables à la mise en suspension des embruns, notamment lorsque des

vitesses de vent élevées sont enregistrées (Roche, 2016). La teneur en sels marins est la plus faible sur le site Trafic, qui est localisé à l'intérieur des terres, dans la ville de Roubaix. Le carbone élémentaire représente entre 11,3 % et 19,0 % de la masse des particules. Sur le site urbain, les teneurs en C les plus importantes sont mesurées sur les particules prélevées en automne et en hiver, en lien avec les températures plus froides à ces saisons et l'utilisation des moyens de chauffage utilisant des combustibles fossiles. Le ratio C/H est plus élevé pour l'automne (6,1) et l'hiver (5,7) comparé au printemps (4,9) et à l'été (5,2) indiquant que la fraction carbonée de particules collectées l'automne et l'hiver montrent une proportion plus grande de suies, dont la composition prédominante est le carbone élémentaire (Ambrogio *et al.*, 2002). Cette observation est encore plus significative sur les sites trafic et industries, où les ratios C/H atteignent respectivement 6,1 et 7,8. Parmi les éléments métalliques, Al (1,2 – 3,4 %) et Fe (3,1 – 8,7 %) présentent des teneurs les plus élevées. Ces teneurs peuvent être expliquées par des contributions crustales et industrielles, reflétant respectivement l'exposition du site de Dunkerque à des réenvols de particules issues du sol et à des émissions issues des activités sidérurgiques, métallurgiques ou cimentières (Oravisjärvi *et al.*, 2003; Santacatalina *et al.*, 2010; Kfoury *et al.*, 2016). En particulier, il est à noter que les teneurs en Fe et Mn sont respectivement 2,3 et 3,8 fois plus élevées dans l'échantillon I-PM par rapport à l'échantillon U-PM moyen. Comme décrit dans le chapitre 1, les éléments métalliques Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, V et Zn sont très majoritairement associés à des origines anthropiques : Ni, V et Co des traceurs des émissions liées à la combustion de fioul lourd (Mazzei *et al.*, 2008; Roche, 2016) alors que Fe, Zn, Cr et Cu sont davantage associés à l'usure de pièces des véhicules comme les freins et les pneus (Thorpe and Harrison, 2008; Gietl *et al.*, 2010). Par ailleurs, les éléments Fe, Mn, Zn, Pb, Cr et Cd ont pu être également reliés aux émissions de l'activité sidérurgique et métallurgique (Kfoury *et al.*, 2016).

Sur le site de Dunkerque, l'analyse des données de teneurs en éléments métalliques Ni, V et Co a permis de révéler une contribution plus importante de la source liée à la combustion de fioul lourd sur le site urbain, au printemps, et davantage encore, sur le site industriel (Heliot, 2018).

Tableau IV-1: Teneurs en éléments et ions inorganiques hydrosolubles des particules $PM_{2,5-0,3}$ collectées à Dunkerque (U-M-PM, U-P-PM, U-E-PM, U-A-PM, U-H-PM), Grande-Synthe (I-PM) et Roubaix (T-PM) (µg/g), et pour l'echantillon certifié SRM 1648a (SRM-PM).

µg/g	U-M-PM	U-P-PM	U-E-PM	U-A-PM	U-H-PM	T-PM	I-PM	SRM-PM
Al	28 026	21 810	27 136	31 719	34 171	11 869	23 800	34 300
As	14	12	12	17	16	-	-	116
Ba	331	272	343	399	339	932	285	742
Cd	6	7	6	6	6	-	-	74
Co	9	10	8	7	7	13	20	18
Cr	144	136	136	181	152	251	266	402
Cu	639	583	538	803	691	933	276	610
Fe	37 530	41 179	40 666	31 331	43 747	38 078	87 549	39 200
Mn	1 767	1 880	1 984	1 235	1 922	555	6 692	790
Mo	30	24	31	40	31	36	22	18
Ni	116	137	111	105	96	59	467	81
P	1 345	1 303	1 882	1 509	783	979	1 030	11555
Pb	234	226	179	263	271	210	246	6 550
Sn	78	57	62	116	128	270	47	111
Sr	126	149	116	98	120	153	141	215
Ti	369	474	370	269	316	1 631	1 288	4 021
V	108	122	110	76	118	73	134	127
Zn	1 293	1 259	1 117	1 335	1 440	1 257	1 841	4 800
F^-	200	300	200	< LD	< LD	< LD	300	-
Cl^-	60 900	63 200	45 300	51 000	86 700	38 855	54 882	4 543
SO_4^{2-}	75 200	70 600	83 400	72 100	76 600	40 013	53 062	165 000
NO_3^-	100 400	126 100	92 900	80 900	89 900	142 872	116 133	-
Na^+	43 300	49 700	39 600	29 300	50 100	30 620	41 178	4 240
NH_4^+	16 400	16 800	15 000	22 900	21 700	14 944	12 947	-
K^+	4 500	4 300	4 500	4 900	4 700	3 065	3 878	10 560
Mg^{2+}	6 500	6 800	6 200	5 200	6 900	2 751	5 218	8 130
Ca^{2+}	44 600	52 900	46 200	34 600	37 800	39 667	37 106	58 400
C	143 000	113 000	136 000	190 000	143 000	160 000	149 000	127 000
H	25 000	23 000	26 000	31 000	25 000	26 000	19 000	-
N	44 000	51 000	43 000	47 000	43 000	51 000	37 000	-
S	24 000	20 000	25 000	23 000	27 000	24 000	29 000	55 000

Nous observons un impact des émissions sidérurgiques et métallurgiques, caractérisé par les teneurs élevées des éléments Fe, Mn, Zn et Cr pour le site « Industries », et dans une moindre mesure, sur le site urbain à Dunkerque, où les teneurs de ces éléments sont plus élevées au printemps, en été et en hiver par rapport à la moyenne annuelle. En automne, la teneur en Fe et Mn dans les particules est moindre, ce qui indique une exposition plus faible aux émissions de l'industrie sidérurgique, qui a pu être expliquée en tenant compte des conditions météorologiques rencontrées à cette saison (vents de secteur Sud-Ouest qui favorisent la dispersion des émissions industrielles vers la Mer du Nord, plutôt que vers le site d'échantillonnage). Enfin, les teneurs en éléments Cu, Zn et Cr reflètent clairement l'influence des émissions hors-échappement liées au trafic routier. En particulier, le cuivre sur le site T-PM présente une teneur 1,5 fois plus élevée que celle sur le site urbain (U-M-PM), et plus de 3 fois plus élevée que sur le site I-PM. La teneur en Ba témoigne également de l'influence trafic, compte tenu que cet élément constitue un additif des huiles moteur (Monaci and Bargagli, 1997). L'échantillon de particules certifié (SRM 1648a) renferme les mêmes espèces chimiques majoritaires que les échantillons de $PM_{2,5\text{-}0,3}$ échantillonnés à Dunkerque et Roubaix. Plusieurs éléments (Fe, Al, Mg, Mn, Cu, Ni, V et Co) présentent également des teneurs comparables entre le SRM 1648a et les échantillons de $PM_{2,5\text{-}0,3}$. En revanche, il apparait que cet échantillon est particulièrement enrichi en Pb, Ti, Zn, K, Sr, Cr, As et Cd. L'exemple le plus remarquable se situe au niveau de la teneur en plomb (6550 µg/g, soit 0,6%), qui est près de 30 fois plus élevée dans le SRM 1648a que dans les échantillons de $PM_{2,5\text{-}0,3}$. Dans le même sens, on peut remarquer des teneurs en Zn (x3), Cr(x2), As(x8) et Cd (x11) nettement plus grandes dans cet échantillon certifié.

1.1. Composition en hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)

La Figure IV-1 présente les teneurs en HAP (µg/g) dans les échantillons de $PM_{2,5\text{-}0,3}$ prélevés sur les sites urbain (U-M-PM, U-P-PM, U-E-PM, U-H-PM, U-A-PM) à Dunkerque, trafic (T-PM) à Roubaix, industries (I-PM) à Grande-Synthe et dans l'échantillon de particules certifié SRM 1648a. A titre de comparaison pour les besoins d'étude des effets toxiques, la composition de l'échantillon de noir de carbone est également renseignée.

Parmi les 16 HAP prioritaires listés par l'United States Environmental Protection Agency (USEPA), les composés majoritairement détectés dans l'échantillon urbain sont le dibenz[a,h]anthracène (5,9 – 11,6 µg/g), devant l'indéno[1,2,3-c,d]pyrène (3,2 – 12,2 µg/g), le chrysène (2,2 – 13,2 µg/g), le benzo[b]fluoranthène (1,9 – 11,8 µg/g), le benzo[g,h,i]pérylène (2,1 – 9,6 µg/g) et le benzo[a]pyrène (2,0 – 9,4 µg/g). Les autres composés (fluoranthène, pyrène, benzo[a]anthracène et le benzo[k]fluoranthène) montrent des teneurs inférieures à 5 µg/g, et les 6 HAP les plus légers (composés à 2 et à 3 cycles) sous 1 µg/g.

Pour le site de Dunkerque, la comparaison des données relatives à chaque saison montre de manière globale des teneurs en HAP 3 à 4 fois supérieures en automne et en hiver par rapport au printemps et à l'été (Tableau IV-2 ; Figure IV-1).Cette observation avait également été faite dans d'autres travaux menés sur le Dunkerquois ou en région Hauts-de-France (Crenn *et al.*, 2017; Landkocz *et al.*, 2017). Entre ces deux périodes, le profil de HAP diffère surtout par la teneur en chrysène (contribution combustion bois et distillation du charbon) et benzo[b]fluoranthène (émissions véhicules diesel).

Des valeurs de teneurs très différentes sont observées pour les sites « Industries » et « trafic ». En effet, les teneurs les plus élevées en HAP sont obtenues pour le site « Industries » avec une teneur totale de 136,4 µg/g, qui correspond à une valeur entre 2 et 8 fois plus élevée que celle des autres sites. A l'inverse, c'est au niveau du site « trafic » que la teneur en HAPs dans les particules est la plus faible (17,8 µg/g).

Le ratio de concentration de HAP liés à la combustion (Tableau IV-2) par rapport à celle totale en HAP (CPAH/TPAH) présente, sur le site urbain, une valeur comprise entre 0,66 en été et 0,83 en hiver. Cette différence entre les 2 saisons est un indicateur d'une contribution plus importante des sources de combustion en saison froide. Ceci est en accord avec l'évolution de la valeur du ratio C/H évoquée précédemment.

La gamme de valeurs du ratio CPAH/TPAH est assez caractéristique d'un environnement urbain. La littérature donne, en effet, les valeurs de référence suivantes : 0,7 pour une zone urbaine et 0,96 pour une zone hautement industrialisée (Gogou *et al.*, 1996; Yue and Fraser, 2004). Dans notre cas, l'échantillon I-PM est caractérisé par un ratio (CPAH/TPAH) = 0,84, peu différent de celui obtenu à Dunkerque, en automne et hiver (U-A-PM et U-H-PM). On ne peut donc pas exclure une influence des émissions du site industriel sur les concentrations de HAPs observées au niveau du site urbain.

Enfin, ce rapport atteint 0,94 pour le site trafic (T-PM), ce qui illustre l'influence des émissions particulaires à l'échappement sur les concentrations de HAPs.

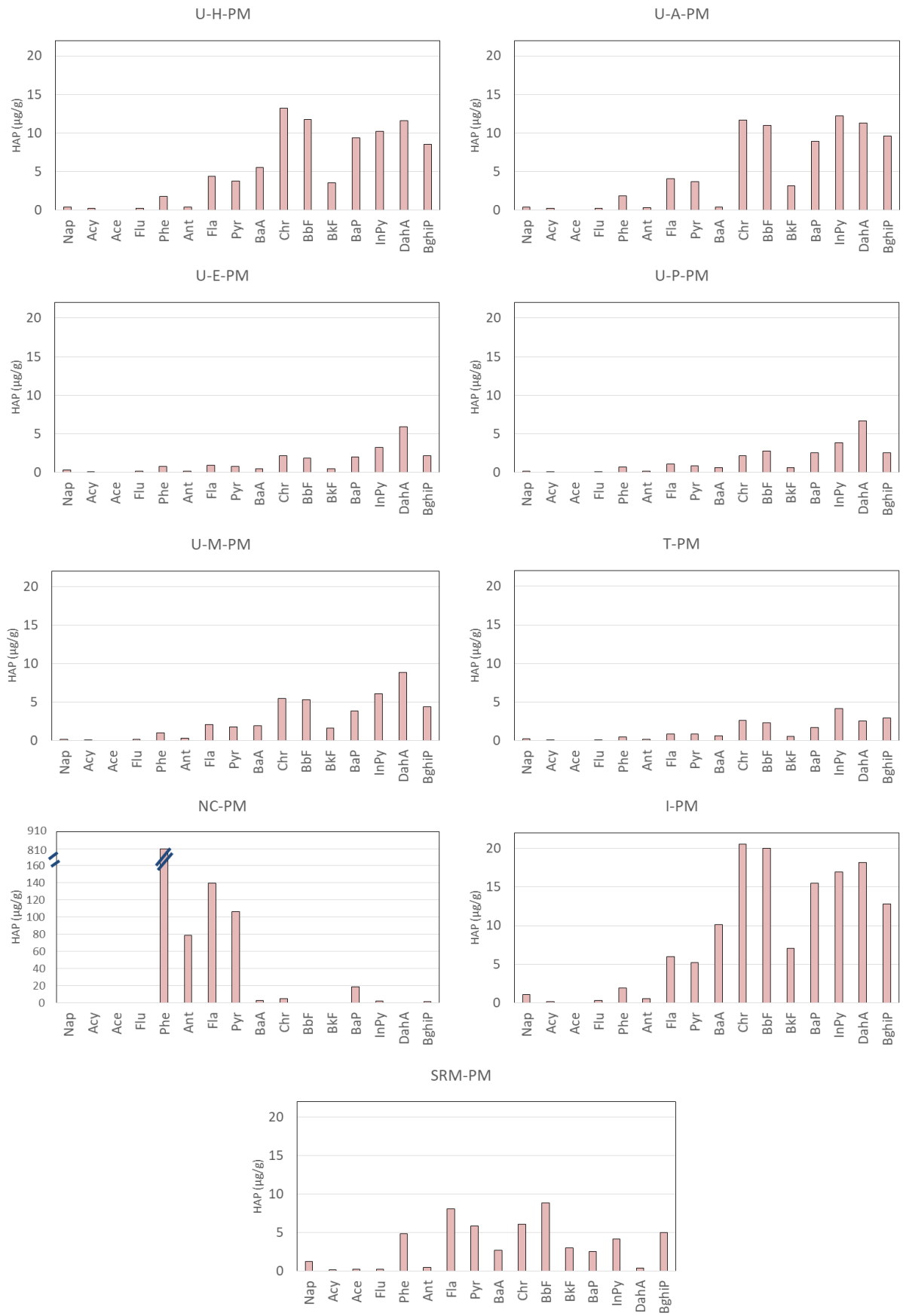


Figure IV-1: Teneurs en HAP (µg/g) pour les particules $PM_{2,5-0,3}$ collectées à Dunkerque (U-M-PM, U-P-PM, U-E-PM, U-A-PM, U-H-PM), Grande-Synthe (I-PM) et Roubaix (T-PM) (µg/g), pour l'echantillon certifié SRM 1648a (SRM-PM) et le noir de carbone (NC-PM).

Tableau IV-2: Teneurs moyennes en HAP totaux (TPAH), HAP liés à la combustion (CPAH) et ratio CPAH/TPAH des particules $PM_{2,5-0,3}$ collectées à Dunkerque (U-M-PM, U-P-PM, U-E-PM, U-A-PM, U-H-PM), Grande-Synthe (I-PM) et Roubaix (T-PM) (µg/g), et pour l'echantillon certifié SRM 1648a (SRM-PM).

	U-M-PM	U-P-PM	U-E-PM	U-A-PM	U-H-PM	T-PM	I-PM	SRM-PM
TPAH (µg/g)	43,2	25,1	21,5	79,3	85,2	17,8	136,4	54,1
CPAH (µg/g)	32,5	17,2	14,1	64,8	70,4	16,7	114,2	46,4
CPAH/TPAH	0,75	0,68	0,66	0,82	0,83	0,94	0,84	0,86

L'analyse de l'échantillon de référence de noir de carbone a montré que celui-ci était fortement concentré en HAP, avec une teneur totale de 1164,1 µg/g. Les composés majoritaires sont le phénanthrène (810 µg/g), l'anthracène (79 µg/g), le fluoranthène (140 µg/g) et le pyrène (106 µg/g). Le phénanthrène et l'anthracène sont en moyenne, respectivement près de 100 et 250 fois plus concentrés que dans les échantillons de $PM_{2,5-0,3}$. Le fluoranthène et le pyrène sont quant à eux 35 fois plus concentrés dans le noir de carbone en comparaison avec les teneurs dans les échantillons de $PM_{2,5-0,3}$.

Enfin, l'échantillon de référence SRM 1648a présente une teneur en HAP (54,1 µg/g) proche de celle observée dans l'échantillon moyen annuel du site urbain de Dunkerque, mais un rapport CPAH/TPAH (0,86) quasiment identique à celui obtenu en période froide sur le site urbain. Cette observation semble être en accord avec la typologie urbaine des 2 sites.

2. Evaluation de l'impact du stress oxydant sur les cellules BEAS-2B

Dans le but d'étudier les différents paramètres de stress oxydant, le test de cytotoxicité WST-1 a été réalisé au préalable afin de choisir la dose d'exposition adaptée. Cette dernière doit permettre l'observation d'effets cellulaires de toxicité avec une mortalité relativement faible. Suite au choix de la dose, les différents paramètres de stress oxydant ont ainsi été évalués.

2.1.Evaluation de la cytotoxicité des échantillons de particules

L'activité mitochondriale a été évaluée suite à l'exposition pendant 48 h des cellules BEAS-2B à l'ensemble fractions des différents échantillons aux doses 6, 12, 24, 48 et 96 µg/cm^2, en comparaison avec des cellules non exposées (témoin). Le Tableau IV-3 présente un résumé des résultats de l'activité mitochondriale (sous forme de pourcentage d'atténuation) des cellules BEAS-2B exposées aux doses 24 et 96 µg/cm^2.

Tableau IV-3: Pourcentage d'atténuation de l'activité mitochondriale dans les cellules BEAS-2B exposées aux différentes fractions des échantillons $PM_{2,5-0,3}$ collectées à Dunkerque (U-M, U-P, U-E, U-A, U-H), Grande-Synthe (I) et Roubaix (T), et de l'echantillon SRM 1648a, aux doses 24 et 96 µg/cm^2, représenté par les moyennes et écarts-types sur 4 réplicats biologiques ; Mann–Whitney U-test par rapport témoin; *= $p < 0,05$.

Echantillon / µg/cm^2	Fractions							
	dPM		EO		Hyd		PM	
	24	96	24	96	24	96	24	96
U-A	-12*±5	-7±7	-7±6	**69*±2**	-1±4	5±3	0±4	**95*±1**
U-E	-7±4	6±8	-14*±4	-23*±6	**14*±6**	**33*±4**	**11*±24**	**27*±6**
U-H	-23*±13	-14*±7	-25*±8	**33*±6**	-6±6	**22*±3**	**11*±7**	**87*±3**
U-P	2±8	**31*±7**	-23*±8	-45*±10	5±6	**19*±6**	-11*±12	**17*±5**
U-M	-15*±7	**8*±5**	-14*±7	-30*±6	**10*±3**	**36*±3**	-13*±5	**24*±7**
I	-1±6	**33*±4**	-24*±9	-50*±13	**14*±9**	**44*±4**	**9*±4**	**38*±5**
T	3±5	**48*±21**	-20*±5	-36*±5	-18*±12	-13*±1	-17*±7	**59*±6**
SRM 1648a	-25*±13	**25*±5**	-4±6	**69*±2**	-9±5	2±3	**17*±7**	**94*±1**

La concentration 96 µg/cm^2 provoque des diminutions de l'activité mitochondriale importante allant de 17% (U-P-PM) à plus de 80% (U-H-PM 87%, SRM-PM 94%, U-A-PM 95%) témoignant d'une très forte mortalité. La dose 24 µg/cm^2 permet quant à elle l'observation d'une réponse cellulaire pour une grande partie des échantillons, avec une réponse plus modérée (quelques % uniquement) que la dose 96 µg/cm^2 concernant l'activité mitochondriale, évitant ainsi une mortalité cellulaire trop importante qui nous pénaliserait dans la collecte de matériel biologique pour l'évaluation des paramètres du stress oxydant. Compte tenu du grand nombre d'échantillons/fractions, et pour pouvoir comparer leurs effets respectifs, nous avons cherché à exposer les échantillons à une seule et unique dose permettant de mettre en évidence des différences entre échantillons avec une mort cellulaire

modérée. La dose 24 µg/cm^2 a alors été choisie pour réaliser les différents tests de stress oxydant.

2.2.Evaluation de la réponse inflammatoire

La réponse pro-inflammatoire a été largement décrite dans la littérature comme étant intimement liée au déclenchement d'un stress oxydant cellulaire. Ainsi plusieurs études ont mis en évidence un lien étroit entre la sécrétion d'interleukines pro-inflammatoires et l'accumulation d'ERO (Dergham *et al.*, 2015; F. Xu *et al.*, 2018; N. Jiang *et al.*, 2020; Symon *et al.*, 2020), l'induction d'enzymes impliquées dans la réponse antioxydante (Cachon *et al.*, 2014; Crobeddu *et al.*, 2020), ou encore l'apparition de dommages oxydatifs aux macromolécules biologiques (Xiang *et al.*, 2016).

2.2.1. Echantillons $PM_{2,5-0,3}$

Le Tableau IV-4 présente les résultats de la réponse inflammatoire par la mesure de la quantité d'IL-6 dans le milieu de culture, suite à 48 h d'exposition des cellules BEAS-2B aux différentes fractions des différents échantillons $PM_{2,5-0,3}$ à la dose 24 µg/cm^2. Ces valeurs ont été rapportées à la quantité de protéines et normalisées par rapport au témoin. Une augmentation significative de la concentration en IL-6 est observée pour les fractions PM et dPM. Pour la fraction hydrosoluble (Hyd), aucun échantillon n'a entraîné d'augmentation significative de la sécrétion d'IL-6. Pour la fraction organique (EO), 5 échantillons sur 8 ont provoqué des augmentations significatives d'IL-6. L'échantillon SRM semble être celui stimulant le moins la sécrétion d'IL-6. Ces résultats sont en adéquation avec de nombreux travaux qui ont déjà mis en évidence l'apparition d'une réponse inflammatoire après exposition de cellules pulmonaires à des particules atmosphériques prélevées sous différentes influences et en différents lieux (Dieme *et al.*, 2012; Cachon *et al.*, 2014; C. Xu *et al.*, 2018; Dong *et al.*, 2019).

Si l'on regarde en moyenne l'effet des différentes fractions des PM sur la réponse inflammatoire (Figure IV-2), les fractions PM et dPM induisent une augmentation de la sécrétion d'IL-6, significativement supérieure à celle de la fraction EO, la fraction Hyd

n'ayant aucun effet. Dans la littérature, il a déjà été mis en évidence une plus grande capacité des échantillons particulaires à induire le déclenchement d'une réponse inflammatoire en comparaison à leurs extraits hydrosolubles (Shang *et al.*, 2018) ou organiques (Verdin *et al.*, 2017; Badran, Verdin, *et al.*, 2020). D'autres études avaient aussi mis en évidence l'absence de réponse inflammatoire suite à l'exposition des BEAS-2B à des extraits hydrosolubles et/ou organiques (Chowdhury *et al.*, 2018). Une étude récente a montré que les particules débarrassées de leurs fractions organiques ou hydrosolubles étaient capables d'induire l'inflammation (TNF-α) plus que les fractions organiques et hydrosolubles (Gali *et al.*, 2019), ce qui est similaire aux observations faites dans cette étude.

Tableau IV-4: Concentration d'IL-6 rapportée aux protéines totales et au témoin, dans les cellules BEAS-2B exposées aux différentes fractions des échantillons $PM_{2,5-0,3}$ collectées à Dunkerque (U-M, U-P, U-E, U-A, U-H), Grande-Synthe (I) et Roubaix (T), et de l'echantillon SRM 1648a, à la dose 24 µg/cm^2, représentée par les moyennes et écarts-types sur 3 réplicats biologiques ; Mann–Whitney U-test vs. témoins; *= $p < 0,05$.

	Fraction			
Echantillon	**PM**	**Hyd**	**EO**	**dPM**
I	**1,8*±0,1**	0,5*±0,1	0,9*±0	**3,2*±0,3**
SRM 1648a	**1,2*±0,2**	1±0,5	1±0,1	**1,3*±0,1**
T	**1,6*±0,3**	0,5*±0,1	**1,3*±0**	**4,9*±0,2**
U-A	**2*±0,8**	0,8*±0	**1,1*±0,1**	**1,9*±0,4**
U-E	**1,9*±0,2**	0,9±0,2	**1,4*±0**	**1,4*±0,1**
U-H	**2,5*±0,5**	0,9±0,1	**1,2*±0,2**	**1,5*±0,2**
U-M	**1,8*±0,4**	0,5*±0,1	0,9*±0,1	**3,6*±0,4**
U-P	**1,8*±0,2**	0,9*±0,1	**1,2*±0**	**3,1*±0,5**

2.2.2. Echantillons synthétiques

Le Tableau IV-5 et la Figure IV-2 présente les résultats de la concentration en IL-6 rapportée à la quantité des protéines et normalisée par rapport au témoin, après 48h d'exposition des cellules BEAS-2B aux différentes fractions des échantillons synthétiques. Les échantillons synthétiques Fe2, Fe3, Mn, Fe2/Fe3 sous leur forme particulaire, et toutes les fractions du noir

de carbone sauf la fraction Hyd ont provoqué une augmentation significative du taux d'IL-6. Les mélanges Fe2/Fe3/Zn, Fe2/Fe3/Mn/Zn, Fe2/Fe3/Mn/Zn/NC, et Fe2/Fe3/Mn/Zn/NC (dEO-PM), et Zn sous toutes leurs fractions, n'ont pas induit d'augmentation significative de la sécrétion d'IL-6. Tout comme pour les échantillons de $PM_{2,5-0,3}$, aucune augmentation significative de IL-6 n'a été observée pour les extraits hydrosolubles. L'échantillon particulaire Zn induit une diminution significative de la réponse inflammatoire, lorsqu'il est seul, ou encore, lorsqu'il est introduit dans n'importe quel mélange de métaux et/ou NC. Dans la littérature, il a été démontré que le ZnO possède des propriétés anti-inflammatoires (Kim, 2016; Meizarini *et al.*, 2018; Yao *et al.*, 2018).

Tableau IV-5: Concentration d'IL-6 rapportée aux protéines totales et au témoin, dans les cellules BEAS-2B exposées aux différentes fractions des échantillons synthétiques de particules à la dose 24 µg/cm², représentée par les moyennes et écarts-types sur 3 réplicats biologiques ; Mann–Whitney U-test vs. témoins; *= $p < 0,05$.

	Fraction			
Echantillon	**PM**	**Hyd**	**EO**	**dPM**
Fe2/Fe3/Mn/Zn/NC-PM	0,5*±0,2	0,7*±0,2		
Fe2/Fe3/Mn/Zn-PM	0,4*±0,1	0,6*±0,1		
Fe2/Fe3/Mn-PM	1,4±0,6	0,7*±0,2		
Fe2/Fe3/Zn-PM	0,4*±0,1	0,6*±0,1		
Fe2/Fe3-PM	**1,7*±0,1**	0,5*±0,1		
Fe2-PM	**1,3*±0,2**	0,9±0,1		
Fe3-PM	**1,2*±0**	1±0,1		
Mn-PM	**1,2*±0,2**	0,9±0,2		
Zn-PM	0,4*±0,1	1,2±0,3		
NC-PM	**1,6*±0,1**	0,9±0,1	**1,2*±0,1**	**1,2*±0,1**

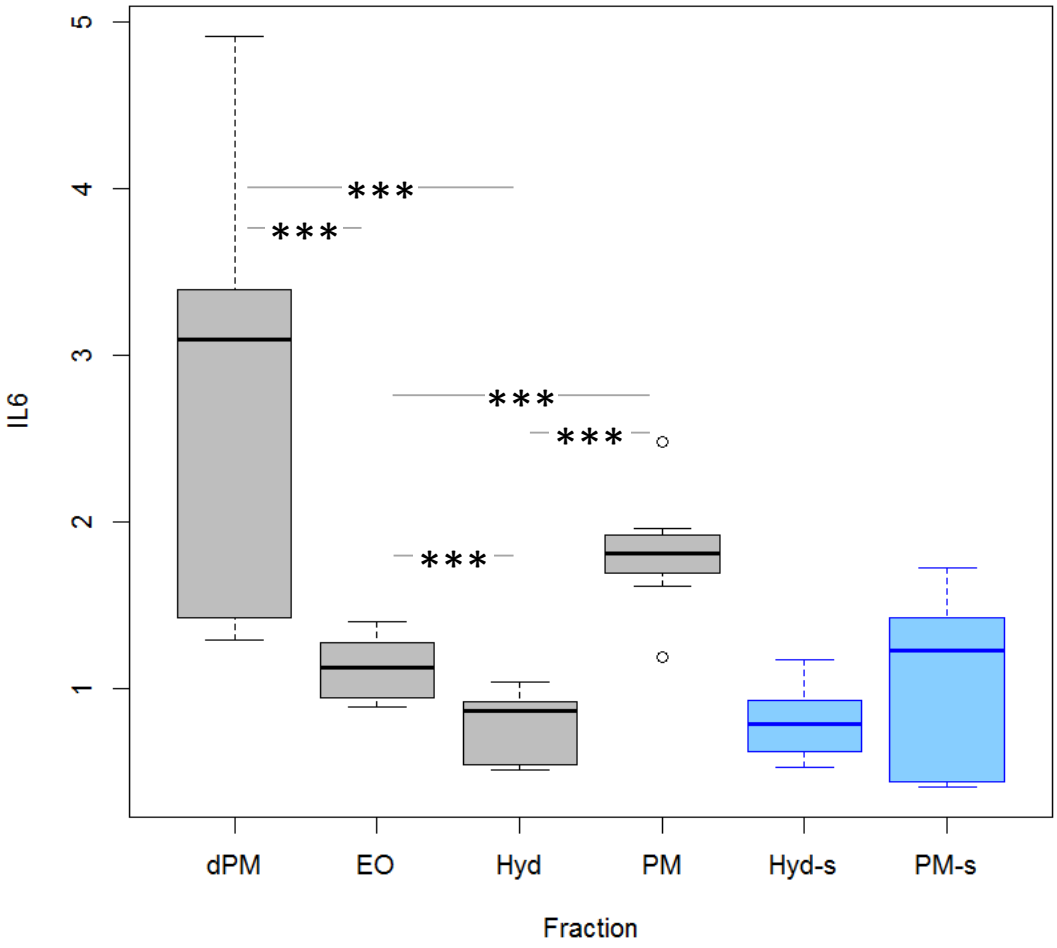


Figure IV-2: Concentration d'IL-6 rapportée aux protéines totales et au témoin, dans des cellules BEAS-2B exposées aux différentes fractions des échantillons de PM (gris ; dPM, EO, Hyd, PM) et de particules synthétiques (bleu ; Hyd-s, PM-s) à la dose 24 µg/cm^2. Les résultats sont représentés par la médiane et les écarts interquartiles (n=21 pour les particules $PM_{2,5-0,3}$ et n=33 pour les échantillons synthétiques) ; test de Mann-Whitney : *p <0,05 ; **p <0,01 ; ***p <0,001.

2.3.Evaluation du stress oxydant

Suite à l'exposition des cellules BEAS-2B à l'ensemble des fractions des différents échantillons de particules atmosphériques et échantillons synthétiques à la dose 24 µg/cm^2, quatre paramètres de stress oxydant ont été étudiés. Tout d'abord, les espèces réactives de l'oxygène (ERO, i.e. radicaux superoxyde et peroxyde d'hydrogène) produites dans les cellules ont été quantifiées par le test «DHE dihydroethydium ». L'altération des membranes cellulaires a été évaluée par la mesure de la 8-isoprostane, l'atteinte oxydative aux protéines par le dosage des protéines carbonylées, et les dommages oxydatifs de l'ADN par dosage de la 8-hydroxydésoxyguanosine (8-OHdG).

2.3.1. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Les Figure IV-3, Figure IV-4 et Figure IV-5 présentent les quantités d'ERO (anion superoxyde et peroxyde d'hydrogène) mesurées dans les cellules, rapportées à la quantité de protéines et normalisées par rapport au témoin, pour les échantillons $PM_{2,5-0,3}$ et synthétiques, respectivement.

2.3.1.1. Échantillons $PM_{2,5-0,3}$

La génération d'ERO a significativement augmenté (p <0,05) lors de l'exposition des cellules BEAS-2B à toutes les fractions des échantillons $PM_{2,5-0,3}$, hormis pour quelques extraits hydrosolubles (U-A, U-M et U-P). La fraction hydrosoluble semble ainsi être légèrement moins inductrice que les autres. En moyenne, les particules dans leur entièreté ont provoqué une surproduction d'ERO significativement supérieure à celle des fractions dPM, EO puis Hyd (Figure IV-5). Plus précisément, la fraction PM a provoqué des augmentations significatives allant de 60 à 200 %, avec un maximum pour les échantillons Urbain-Mixte (U-M), SRM 1648a, Trafic (T) et Urbain-Hiver (U-H) (Figure IV-3). Les extraits organiques (EO) des échantillons Urbain-Automne (U-A-EO) et Urbain-Hiver (U-H-EO) présentent des augmentations également proches de 200%. Ces deux échantillons sont chargés en HAP avec des teneurs de 79 et 85 µg/g PM pour U-A-EO et U-H-EO respectivement. L'ensemble des valeurs obtenues sont significativement plus élevées par rapport au témoin à l'exception du seul échantillon T-dPM.

Pour conclure, la quasi-totalité des échantillons a provoqué une augmentation significative de la production d'ERO avec cependant un effet plus prononcé pour les PM collectées sous l'influence urbaine et du trafic routier, et pour la fraction organique des échantillons urbains qui correspondent aux saisons froides et sont chargés en HAP. La génération excessive et l'accumulation intracellulaire d'ERO semble donc être liée aussi bien à la fraction particulaire dans son ensemble qu'aux composés présents dans les particules, qu'il s'agisse des éléments organiques (HAP notamment) ou inorganiques (éléments traces voire même espèces majeures).

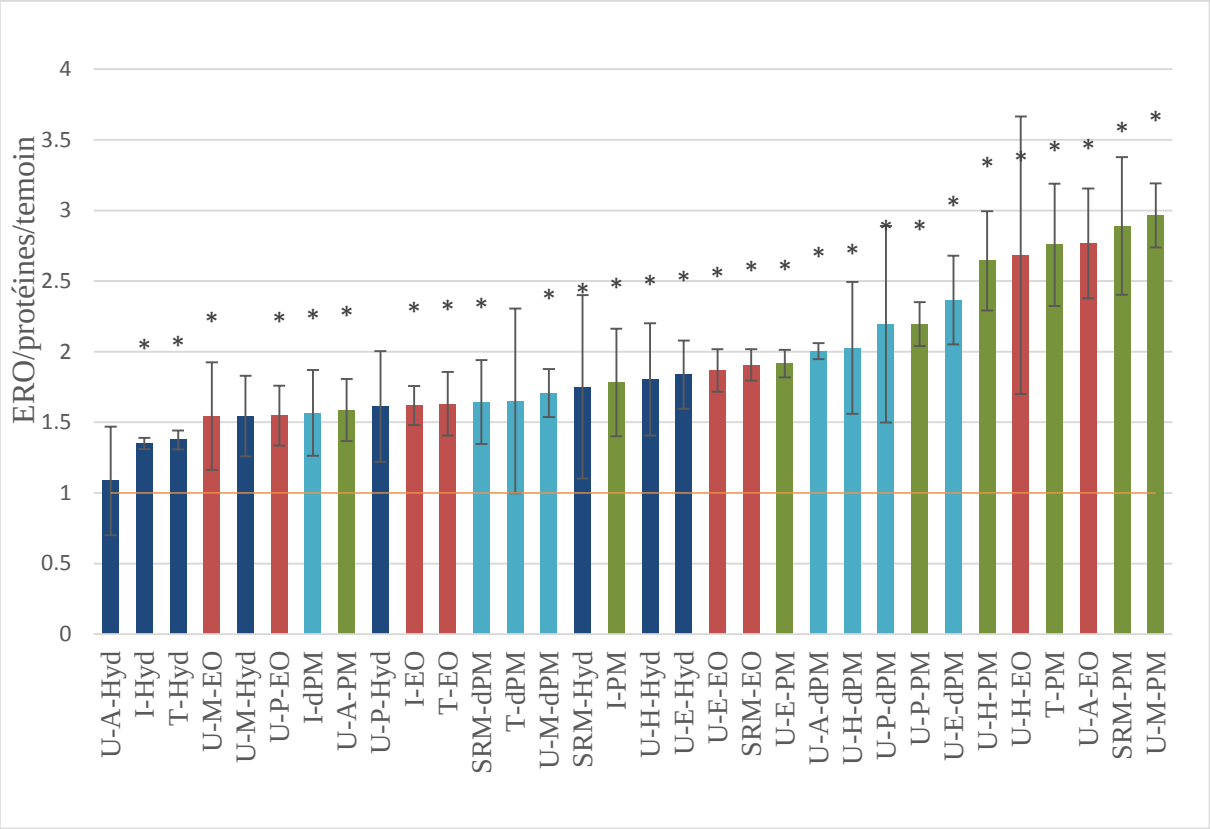


Figure IV-3: Quantité d'ERO rapportée aux protéines totales et au témoin, dans les cellules BEAS-2B exposées aux différentes fractions des échantillons $PM_{2,5-0,3}$ collectées à Dunkerque (U-M, U-P, U-E, U-A, U-H), Grande-Synthe (I) et Roubaix (T), et de l'echantillon SRM, à la dose 24 µg/cm², représentée par les moyennes et écarts-types sur trois réplicats biologiques. Mann–Whitney U-test vs. témoins; *= $p < 0,05$. Vert =PM ; rouge=EO ; bleu clair=dPM, bleu foncé=Hyd.

Dans la littérature, de nombreux travaux menés *in vitro* ont fait également état d'une hyper-accumulation d'ERO dans les cellules pulmonaires suite à une exposition aux PM (Dergham *et al.*, 2012; C. Xu *et al.*, 2018; Cui, Chen and Yang, 2020; X. Liu *et al.*, 2020; Das *et al.*, 2021). De même, plusieurs études ont déjà démontré la capacité des extraits de particules atmosphériques à générer une accumulation d'ERO dans les cellules, que ce soit après exposition à leur extrait organique (Rodríguez-Cotto, Ortiz-Martínez and Jiménez-Vélez, 2015; Yan *et al.*, 2017; F. Xu *et al.*, 2018; Libalova *et al.*, 2018) ou hydrosoluble (Shuster-Meiseles *et al.*, 2016; Yan *et al.*, 2017; F. Xu *et al.*, 2018; X. Liu *et al.*, 2020). Crobeddu et al., (2020) ont mis en évidence que des PM collectées sur un site urbain influencé par le trafic routier du périphérique parisien, et plutôt riche en composés organiques et en métaux, augmentait significativement la concentration intracellulaire d'ERO. Shuster-

Meiseles et al., (2016) ont suggéré que la fraction hydrosoluble des éléments métalliques était la plus impliquée dans la génération d'ERO. Plusieurs études récentes ont mis en évidence la contribution importante des métaux dans la génération d'ERO, surtout les éléments As, Bi, Ce, Cd, Cr, Co, Cu, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, Sn, V et Zn (Crobeddu *et al.*, 2020; Fang *et al.*, 2020, p. 202; Das *et al.*, 2021). Ceci pourrait expliquer le comportement très réactif de l'échantillon certifié SRM 1648a, ce dernier étant particulièrement riche en Al, As, Co, Cd, Cr, Pb, V et Zn (avec des concentrations de 2 à 40 fois supérieures à celles dans les échantillons de $PM_{2,5-0,3}$ en fonction de l'élément considéré), et en HAP (54 µg/g). Dans une moindre mesure, les teneurs relativement élevées en Cr, Co, Cu, Sn, NO_3^-, Al, Cu, Pb, Sn et V des échantillons "Trafic" et "Urbain" (moyen et saisonniers), et en HAP (85, 79 et 43 µg/g pour U-H, U-A et U-M respectivement) pourrait également expliquer leur forte capacité à générer ces ERO. Ceci est également vrai pour l'échantillon (I) prélevé sous influence industrielle, particulièrement riche en HAP (136 µg/g) et en Co, Cr, Mn, Ni et V.

2.3.1.2. Echantillons synthétiques

La surproduction des ERO est significative (p <0,05) lors de l'exposition des cellules BEAS-2B à la majorité des échantillons synthétiques particulaires. Tout comme pour les échantillons de PM, la surproduction d'ERO est significativement supérieure (p <0,001) pour la fraction particulaire comparée à la fraction hydrosoluble (Figure IV-5). Aucune augmentation significative de la quantité d'ERO n'a été observée pour la fraction Hyd de l'ensemble des échantillons synthétiques à l'exception du noir de carbone (NC-Hyd). Les échantillons qui semblent induire la plus grande quantité d'ERO sont les fractions PM de Mn et Zn, et tous les mélanges particulaires contenant ces deux oxydes. NC déclenche également une surproduction significative d'ERO de 50 à 100 % pour les fractions EO, PM et dPM.

Nos résultats sont en accord avec la littérature qui a mis en évidence la capacité du manganèse (Sun *et al.*, 2013; Ognik *et al.*, 2019), du zinc (Huang *et al.*, 2010; X. Zhang *et al.*, 2020) et du noir de carbone (N. Jiang *et al.*, 2020) à déclencher une accumulation intracellulaire d'ERO après exposition à ces différents composés. Il est donc logique de constater que, d'une part, la fraction particulaire est la plus impliquée dans la génération d'ERO dans les échantillons synthétiques, et d'autre part, que ces composés (i.e. Mn, Zn et NC), seuls ou en mélange, sont aussi les plus impliqués.

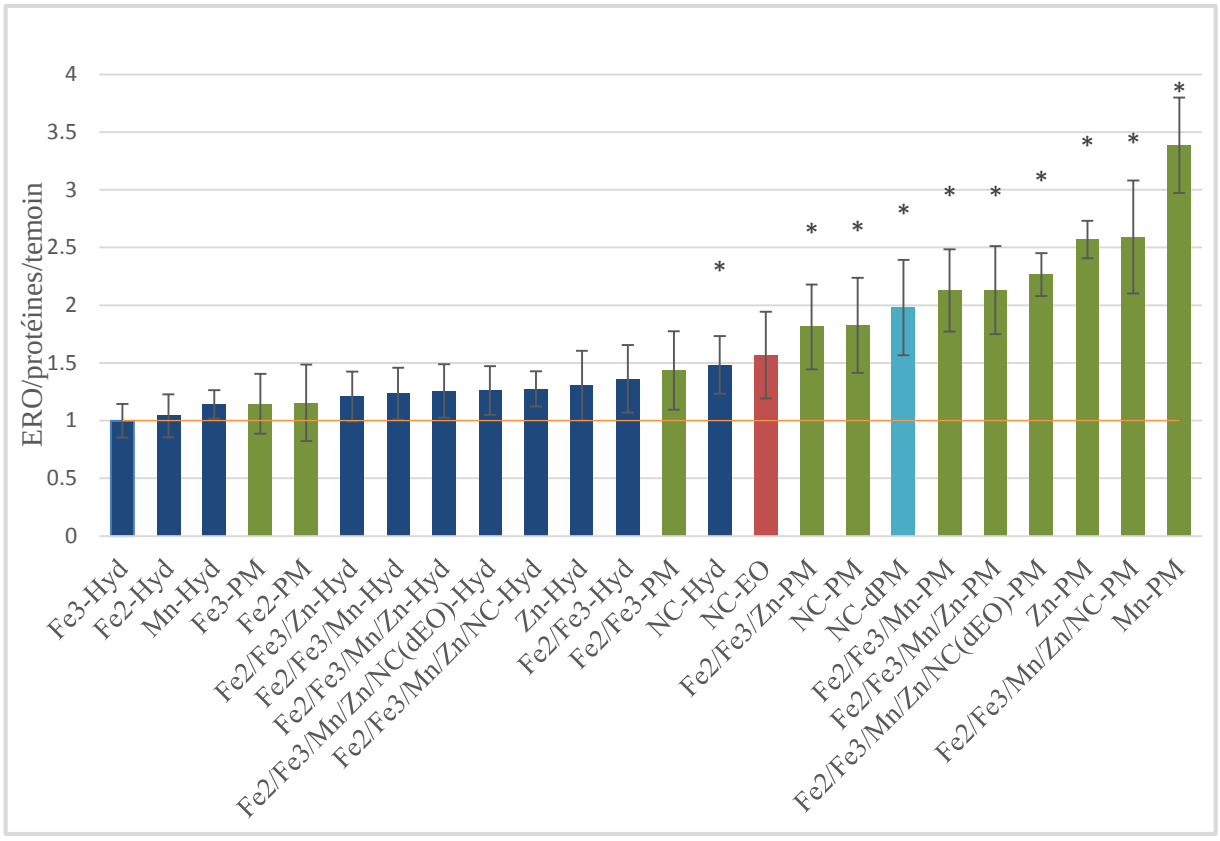


Figure IV-4: Quantité d'ERO rapportée aux protéines totales et au témoin, dans les cellules BEAS-2B exposées aux différentes fractions des échantillons synthétiques de particules à la dose 24 µg/cm^2, représentée par les moyennes et écarts-types sur trois réplicats biologiques. Mann–Whitney U-test vs. témoins; *= $p < 0,05$. Vert =PM ; rouge=EO ; bleu clair=dPM, bleu foncé=Hyd.

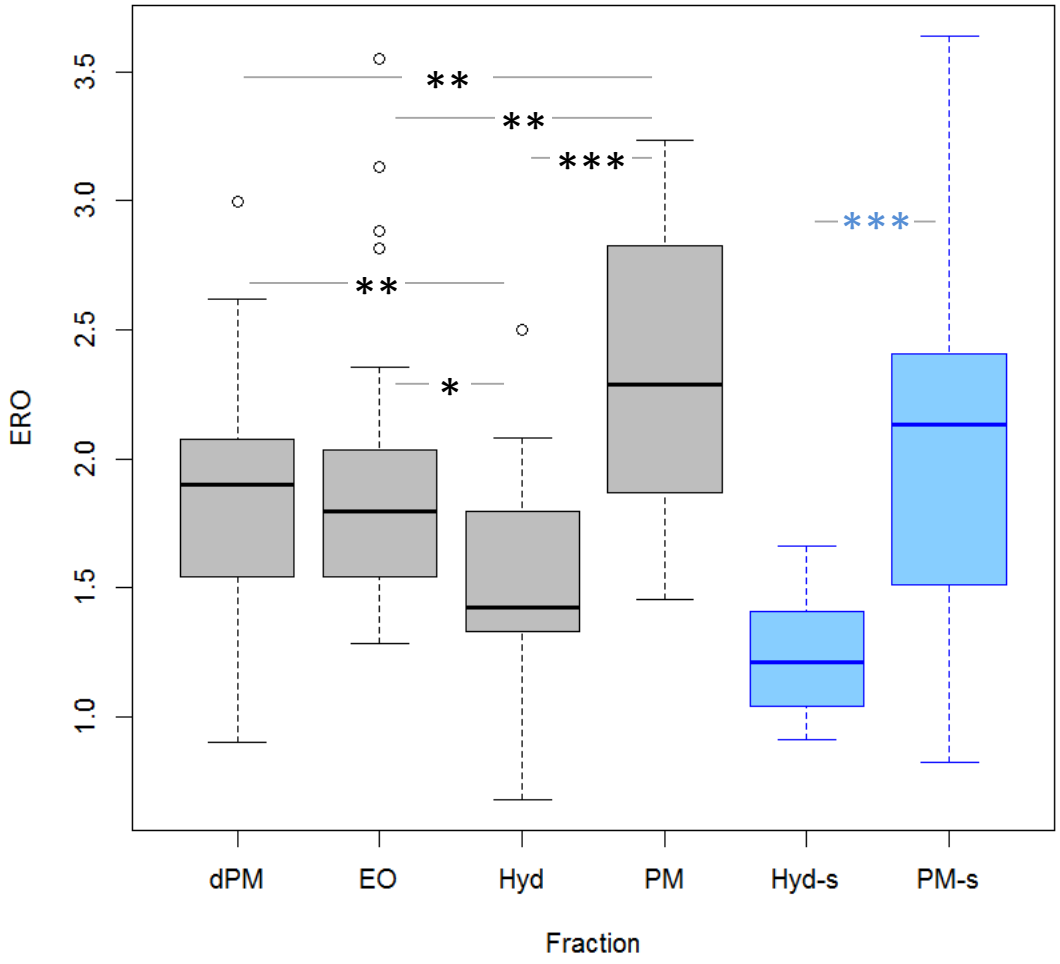


Figure IV-5: Concentration d'ERO rapportée aux protéines totales et au témoin, dans des cellules BEAS-2B exposées aux différentes fractions des échantillons de PM (gris ; dPM, EO, Hyd, PM) et de particules synthétiques (bleu ; Hyd-s, PM-s) à la dose 24 µg/cm^2. Les résultats sont représentés par la médiane et les écarts interquartiles (n=21 pour les particules $PM_{2,5\text{-}0,3}$ et n=33 pour les échantillons synthétiques) ; test de Mann-Whitney : *p <0,05 ; **p <0,01 ; ***p <0,001.

2.3.2. 8-isoprostane

Figure IV-6, Figure IV-7 et Figure IV-8 présentent les résultats de mesure de la concentration en 8-isoprostane dans le lysat cellulaire, rapportée à la quantité de protéines et

normalisée par rapport au témoin, pour les échantillons $PM_{2,5-0,3}$ et synthétiques respectivement.

2.3.2.1. Echantillons $PM_{2,5-0,3}$

Parmi les 32 échantillons de $PM_{2,5-0,3}$, seuls 10 ont induit des augmentations significatives de la formation de 8-isoprostane par rapport au témoin. L'échantillon SRM 1648a, et ce pour toutes les fractions considérées (PM, Hyd, EO et dPM), semble provoquer le plus d'altération de la membrane plasmique avec des concentrations de 8-isoprostane 30 fois plus élevées pour la fraction particulaire, 18 fois supérieures pour l'extrait hydrosoluble, 5 et 2,8 fois pour dPM et EO respectivement. L'échantillon U-M, avec des augmentations de 50 à 100% pour ses 4 fractions, est dans une moindre mesure le second échantillon générant le plus de 8-isoprostane. Cet échantillon est suivi de l'échantillon Trafic pour les conditions particules totales (T-PM) et fraction hydrosoluble (T-Hyd). De manière générale, la fraction particulaire semble encore une fois être la fraction plus impliquée dans l'augmentation de la concentration en 8-isoprostane, fraction représentant 6 des 10 échantillons significativement augmentés par rapport au témoin. L'échantillon industriel (I-PM) malgré sa forte concentration en éléments métalliques et HAP ne semble pas avoir d'effet sur l'augmentation de la concentration en 8-isoprostane.

En conclusion, hormis l'échantillon SRM de référence, l'augmentation de la concentration en 8-isoprostane semble surtout être induite par la fraction particulaire, et surtout par les échantillons provenant du site urbain ou celui de typologie «trafic», alors qu'aucune des fractions de l'échantillon provenant du site industriel n'a montré d'effet significatif. En moyenne, il n'est pas possible de dire si une fraction est plus impliquée dans la réponse en 8-isoprostane (Figure IV-8).

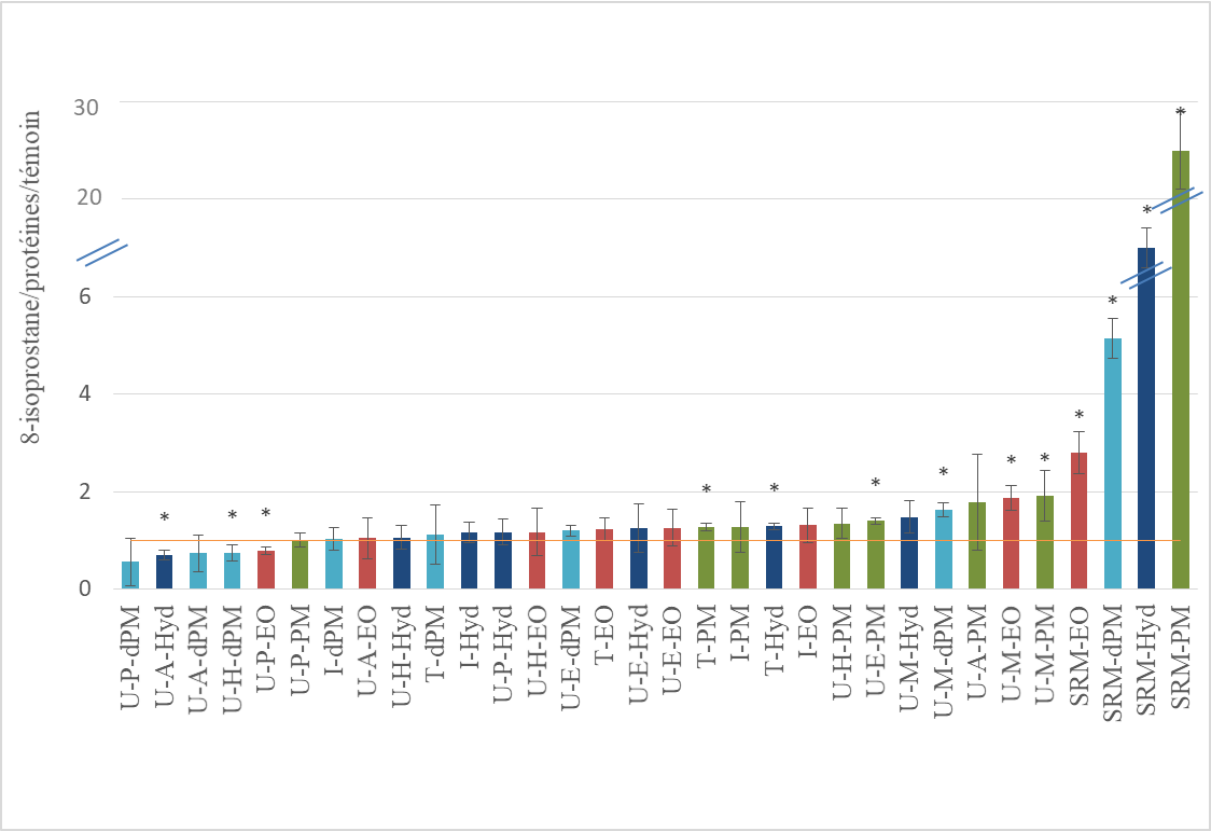


Figure IV-6: Concentration en 8-isoprostane rapportée aux protéines totales et au témoin, dans les cellules BEAS-2B exposées aux différentes fractions des échantillons $PM_{2,5-0,3}$ collectées à Dunkerque (U-M, U-P, U-E, U-A, U-H), Grande-Synthe (I) et Roubaix (T), et de l'echantillon SRM, à la dose 24 µg/cm^2, représentée par les moyennes et écarts-types sur trois réplicats biologiques. Mann–Whitney U-test vs. témoins; *= $p < 0,05$. Vert =PM ; rouge=EO ; bleu clair=dPM, bleu foncé=Hyd.

Cependant, des études récentes ont mis en évidence, sur la lignée cellulaire BEAS-2B, la capacité de particules atmosphériques à altérer la membrane cellulaire par l'intermédiaire du dosage de la 8-isoprostane (Leclercq *et al.*, 2018; Badran, Verdin, *et al.*, 2020) ou du malondialdhéhyde (Dergham *et al.*, 2012, 2015; Cachon *et al.*, 2014; J. Liu *et al.*, 2020), tous deux étant des produits de la peroxydation lipidique. Les travaux de Badran et al., (2020) ont montré que les échantillons particulaires induisaient plus de dommages membranaires que leurs extraits organiques, ce qui semble aussi la tendance ici, bien que la différence ne soit pas significative.

2.3.2.2. Echantillons synthétiques

La concentration en 8-isoprostane a significativement augmenté (p <0,05) lors de l'exposition des cellules BEAS-2B à une majorité des échantillons synthétiques. Concernant les composés seuls, hormis l'échantillon Fe3-PM, tous les échantillons particulaires ont occasionné des augmentations importantes allant de 100 % pour l'échantillon Fe2/Fe3/Mn-PM jusqu'à 4 fois pour l'échantillon Zn-PM et même une concentration augmentée de 16 fois pour Fe2-PM. Toutes les fractions issues du noir de carbone (NC) ont occasionné des augmentations significatives de la concentration en 8-isoprostane, allant de 50 à 150 %. De même, tous les échantillons particulaires de mélanges contenant le Fe2, Zn, NC et Mn sont responsables d'une forte augmentation de la concentration en 8-isoprostane à l'exception du mélange Fe2/Fe3.

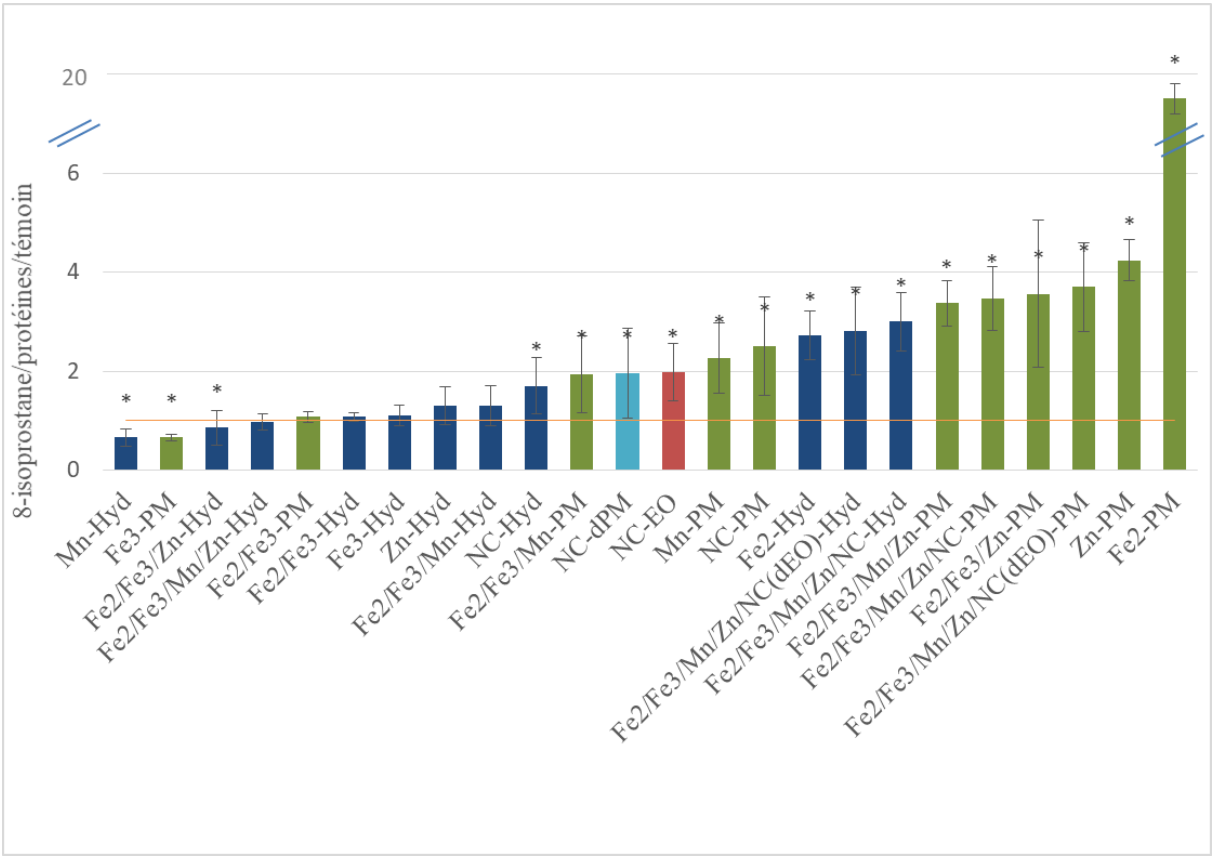


Figure IV-7: Concentration en 8-isoprostane rapportée aux protéines totales et au témoin, dans les cellules BEAS-2B exposées aux différentes fractions des échantillons synthétiques de particules à la dose 24 µg/cm^2, représentée par les moyennes et écarts-types sur trois réplicats biologiques. Mann–Whitney U-test vs. témoins; *= p < 0,05 . Vert =PM ; rouge=EO ; bleu clair=dPM, bleu foncé=Hyd.

Il apparaît important de s'attarder sur le comportement de ce composé. En effet, Fe_3O_4, considéré seul n'induit pas d'augmentation significative de la concentration en 8-isoprostane. ZnO et surtout Fe_2O_3 quant à eux ont un effet marqué. Lorsque Fe_3O_4 est ajouté à l'un ou l'autre des deux oxydes, ceci a pour effet d'atténuer très fortement la quantité de 8-isoprostane formée. Le constat est le même pour tous les mélanges considérés faisant intervenir Fe_3O_4. Il semblerait ainsi que le fer présent sous cette forme contribue à atténuer la réponse observée.

Alors que les échantillons particulaires engendrent une forte production de 8-isoprostane, inversement, la fraction hydrosoluble semble être la moins impliquée dans l'altération de la membrane lipidique (Figure IV-8).

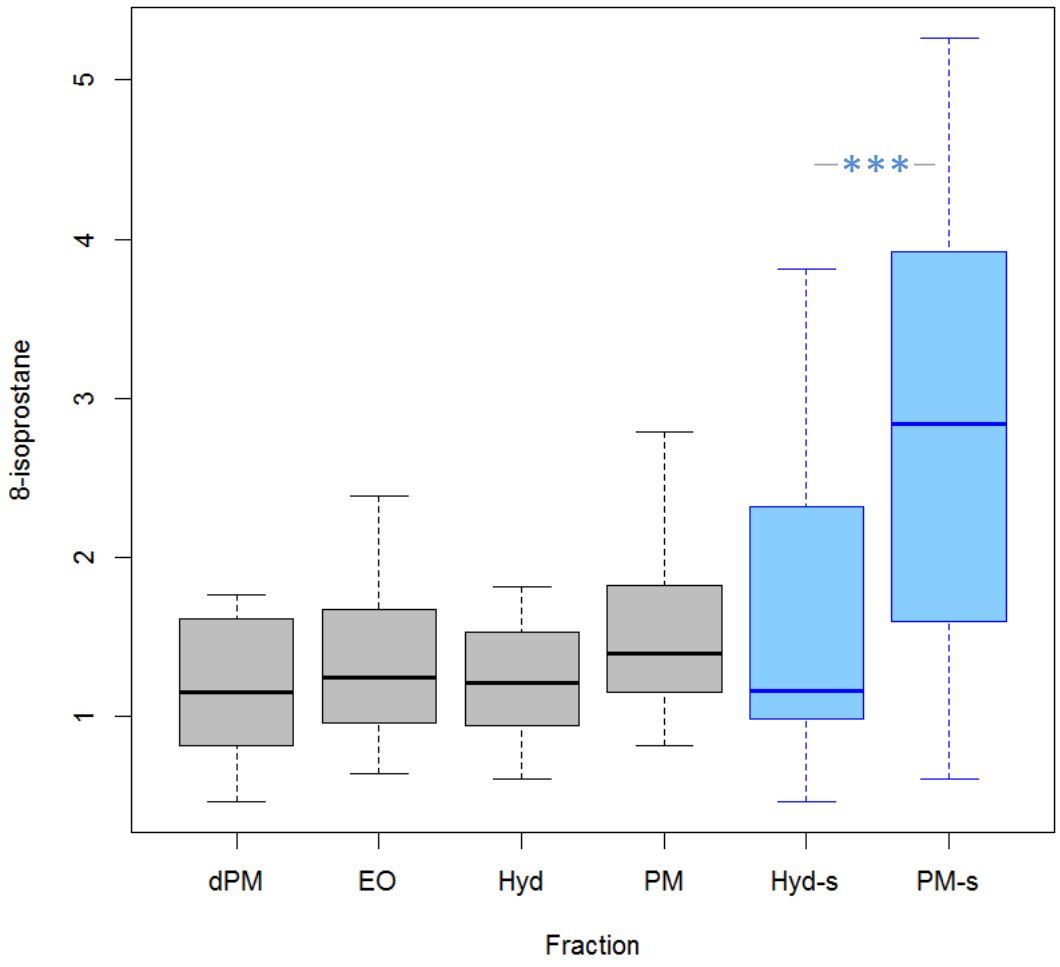


Figure IV-8: Concentration en 8-isoprostane rapportée aux protéines totales et au témoin, dans des cellules BEAS-2B exposées aux différentes fractions des échantillons de PM (gris ; dPM, EO, Hyd, PM) et de particules synthétiques (bleu ; Hyd-s, PM-s) à la dose 24 µg/cm^2. Les résultats sont représentés par la médiane et les écarts interquartiles (n=21 pour les particules $PM_{2,5\text{-}0,3}$ et n=33 pour les échantillons synthétiques) ; test de Mann-Whitney : *p <0,05 ; **p <0,01 ; ***p <0,001.

2.3.3. Protéines carbonylées

Les Figure IV-9, Figure IV-10 et Figure IV-11 présentent le résultat des concentrations en protéines carbonylées dans les lysats cellulaires, après exposition des BEAS-2B aux échantillons $PM_{2,5-0,3}$ et synthétiques.

2.3.3.1. Echantillons $PM_{2,5-0,3}$

La concentration en protéines carbonylées a significativement augmenté (p <0,05) après exposition des cellules BEAS-2B à la majorité des fractions des échantillons de $PM_{2,5-0,3}$, seuls 4 échantillons n'ont pas induit d'augmentation significative (U-A-Hyd, U-M-EO, I-dPM et U-H-EO). En moyenne, les fractions PM et dPM ont un effet supérieur aux fractions EO et Hyd (Figure IV-11).

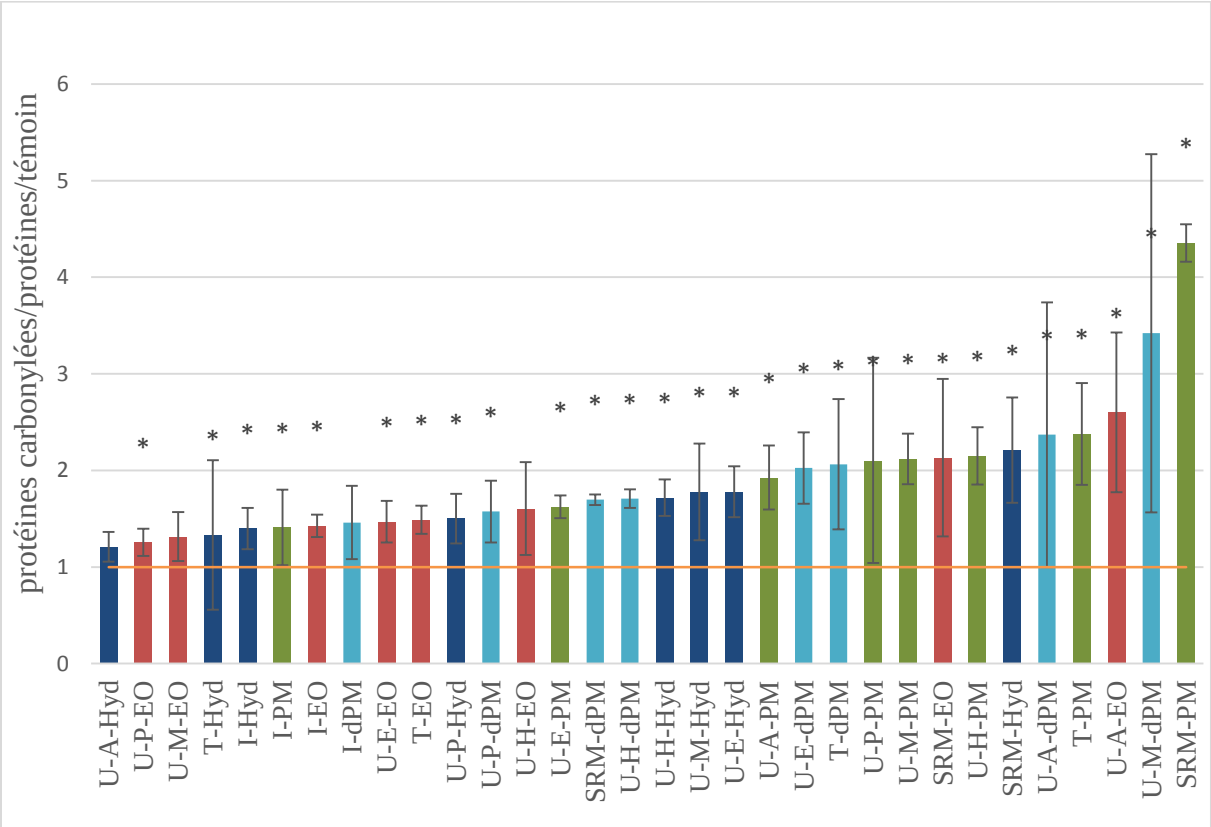


Figure IV-9: Concentration en protéines carbonylées rapportée aux protéines totales et au témoin, dans les cellules BEAS-2B exposées aux différentes fractions des échantillons $PM_{2,5-0,3}$ collectées à Dunkerque (U-M, U-P, U-E, U-A, U-H), Grande-Synthe (I) et Roubaix (T), et de l'echantillon SRM, à la dose 24 µg/cm², représentée par les moyennes et écarts-types sur trois réplicats biologiques. Mann–Whitney U-test vs. témoins; *= p < 0,05 . Vert =PM ; rouge=EO ; bleu clair=dPM, bleu foncé=Hyd.

Une fois encore, l'échantillon SRM pour toutes les fractions considérées est celui qui provoque le plus l'oxydation des protéines. Il est suivi principalement par les échantillons trafic routier (T-PM) et urbain (U-M-PM et U-PM des différentes saisons) sous leur forme particulaire.

Nos observations sont en accord avec Ndong Ba et al., (2019) qui ont mis en évidence, sur la lignée cellulaire BEAS-2B, la capacité de particules atmosphériques à déclencher une oxydation des protéines cellulaires, et avec les travaux de Badran et al., (2020) qui ont montré que les échantillons particulaires induisaient plus de dommages oxydatifs aux protéines que leurs extraits organiques.

2.3.3.2. Echantillons synthétiques

La concentration en protéines carbonylées a significativement augmenté (p <0,05) lors de l'exposition des cellules BEAS-2B à une grande partie des échantillons synthétiques, seuls 6 sur 24 échantillons testés ne causant pas d'augmentation significative. Tout comme pour les échantillons de $PM_{2,5-0,3}$, la fraction PM provoque une augmentation de la concentration en protéines carbonylées significativement supérieure à la fraction Hyd (Figure IV-11).

Les échantillons qui semblent déclencher le plus l'augmentation de la concentration en protéines carbonylées sont les fractions particulaires contenant ZnO, avec 200 à 300 % d'augmentation (Fe2/Fe3/Mn/Zn/NC(dEO)-PM, Fe2/Fe3/Zn-PM, Zn-PM, Fe2/Fe3/Mn/Zn-PM, et Fe2/Fe3/Mn/Zn/NC-PM) (Figure IV-10). Une fois encore, le NC et tous les mélanges contenant du NC, qu'importe la fraction PM, Hyd, EO ou dPM, ont entrainé des augmentations significatives de la concentration en protéines carbonylées. Les fractions Hyd ont quant à elles beaucoup moins d'impact, seule la moitié d'entre elles entrainant une augmentation significative de la concentration des protéines carbonylées.

Une fois encore, Fe_3O_4 semble être le composé provoquant le moins d'altération, aucune augmentation significative de la teneur en protéines carbonylées n'étant observée pour les échantillons Fe3-PM, Fe3-Hyd et Fe2/Fe3-Hyd. Enfin, les échantillons Fe2-Hyd, Mn-Hyd, et Zn-Hyd n'ont pas induit d'augmentation significative de la concentration en protéines carbonylées.

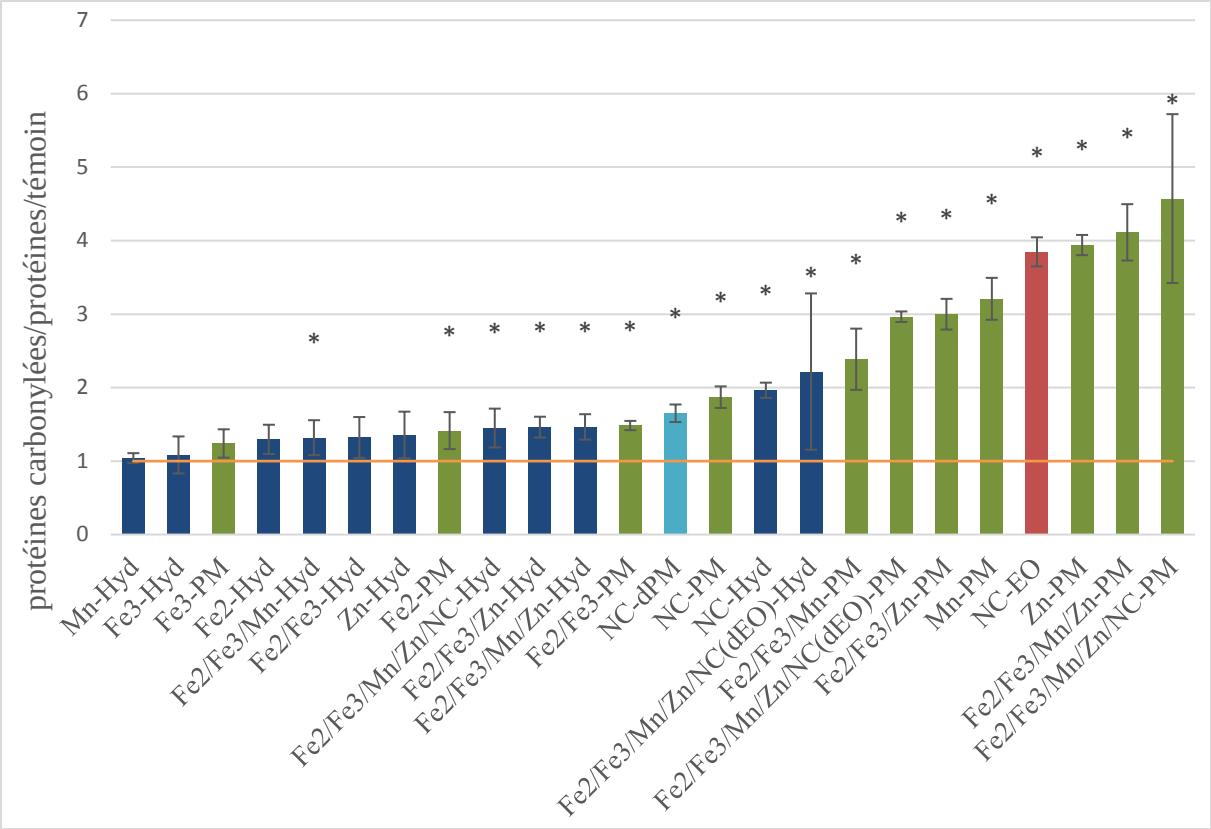


Figure IV-10:Concentration en protéines carbonylées rapportée aux protéines totales et au témoin, dans les cellules BEAS-2B exposées aux différentes fractions des échantillons synthétiques de particules à la dose 24 µg/cm^2, représentée par les moyennes et écarts-types sur trois réplicats biologiques. Mann–Whitney U-test vs. témoins; *= p < 0,05. Vert =PM ; rouge=EO ; bleu clair=dPM, bleu foncé=Hyd.

En conclusion, l'altération des protéines semble surtout être induite par les échantillons particulaires de façon globale, et en particulier les échantillons de particules contenant et du ZnO et Mn_2O_3, seuls ou en mélange, et le NC.

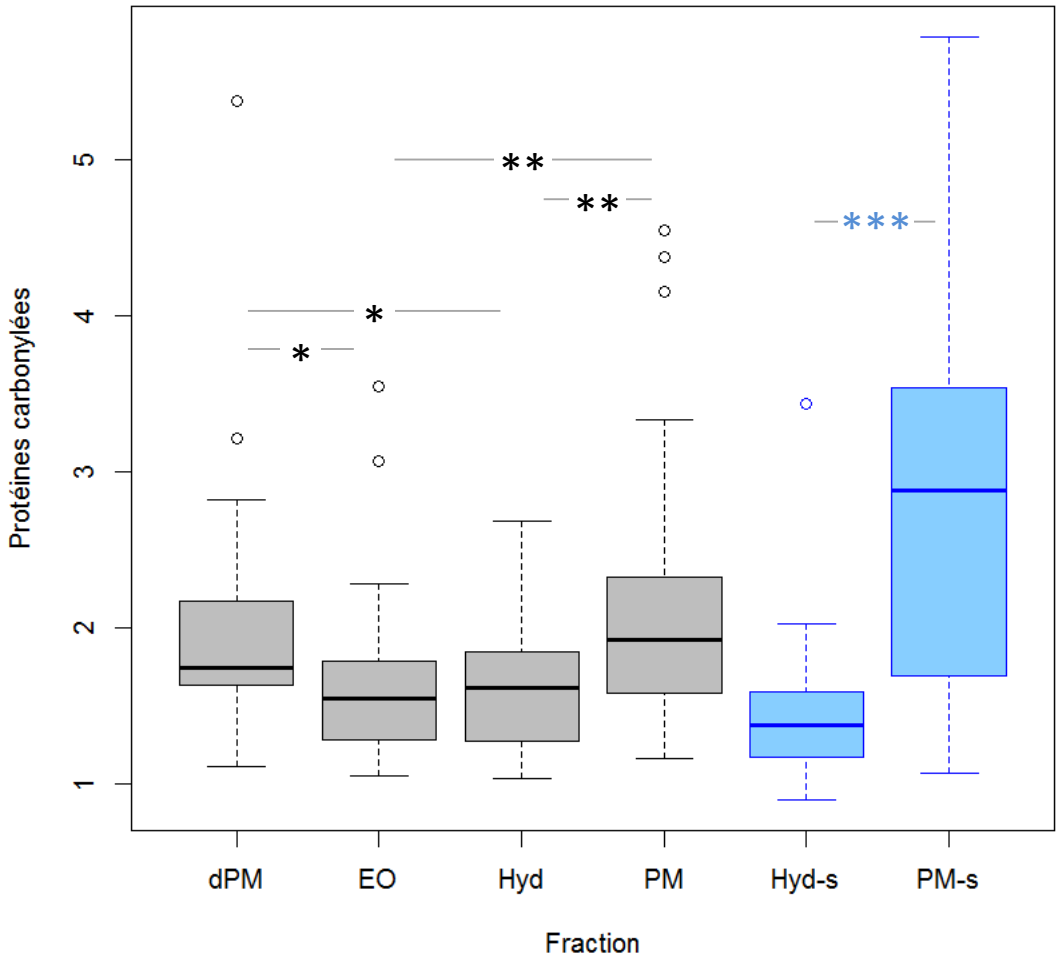


Figure IV-11: Concentration en protéines carbonylées rapportée aux protéines totales et au témoin, dans des cellules BEAS-2B exposées aux différentes fractions des échantillons de PM (gris ; dPM, EO, Hyd, PM) et de particules synthétiques (bleu ; Hyd-s, PM-s) à la dose 24 µg/cm^2. Les résultats sont représentés par la médiane et les écarts interquartiles (n=21 pour les particules $PM_{2,5\text{-}0,3}$ et n=33 pour les échantillons synthétiques) ; test de Mann-Whitney : *p <0,05 ; **p <0,01 ; ***p <0,001.

2.3.4. 8-OHdG

Les Figure IV-12, Figure IV-13 et Figure IV-14 présentent les résultats de mesure de concentration en 8-OHdG dans les lysats cellulaires, rapportée à la quantité d'ADN et normalisée par rapport au témoin, pour les échantillons de $PM_{2,5\text{-}0,3}$ et synthétiques respectivement.

2.3.4.1. Echantillons $PM_{2,5-0,3}$

Les résultats montrent que seuls 9 des 32 échantillons de $PM_{2,5-0,3}$ ont entrainé une augmentation significative (p <0,05) de la concentration en 8-OHdG. Une nouvelle fois, le SRM 1648a est l'échantillon provoquant la plus importante formation d'adduits oxydatifs à l'ADN, la fraction PM étant responsable d'une augmentation de 400 %. Les fractions Hyd et EO du SRM 1648a ont provoqué quant à elles des augmentations d'environ 200 %.

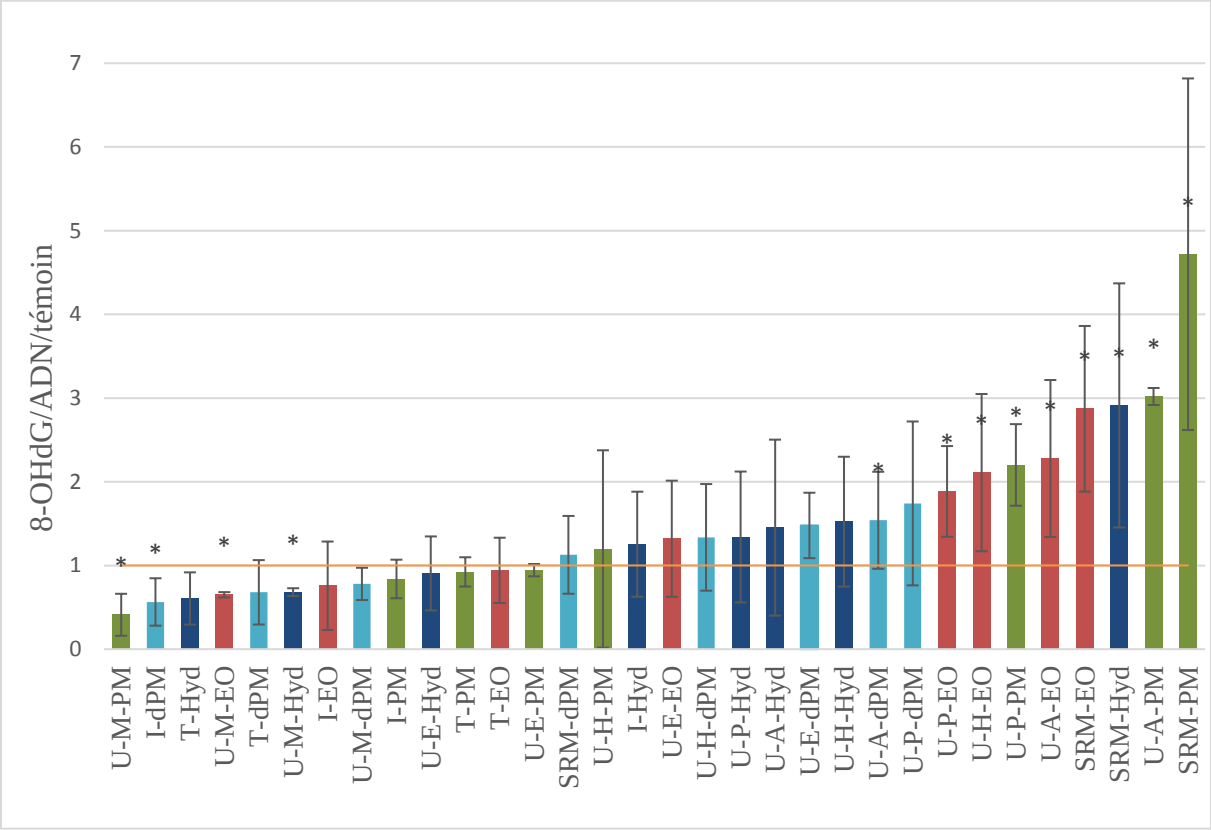


Figure IV-12: Concentration en 8-OHdG rapportée aux protéines totales et au témoin, dans les cellules BEAS-2B exposées aux différentes fractions des échantillons $PM_{2,5-0,3}$ collectées à Dunkerque (U-M, U-P, U-E, U-A, U-H), Grande-Synthe (I) et Roubaix (T), et de l'echantillon SRM, à la dose 24 µg/cm², représentée par les moyennes et écarts-types sur trois réplicats biologiques. Mann–Whitney U-test vs. témoins; *= p < 0,05 . Vert =PM ; rouge=EO ; bleu clair=dPM, bleu foncé=Hyd.

Les échantillons U-A-PM, U-P-PM et U-A-EO, U-H-EO et U-P-EO représentent les seuls autres échantillons ayant provoqué une augmentation significative de la formation de 8-OHdG. Les fractions PM et EO sembleraient les plus impliquées dans l'altération de l'ADN :

7 des 9 augmentations significatives concernent ces fractions. Cependant, il est impossible de généraliser ce résultat puisqu'en moyenne aucune différence significative n'est observée entre les différentes fractions (Figure IV-14). Les échantillons collectés sous l'influence du trafic routier et des émissions industrielles n'ont pas entrainé de réponse quelle que soit la fraction considérée, constat identique pour les échantillons urbains collectés au printemps et en été, d'où l'importance de considérer l'influence des sources sur la composition chimique des particules, selon les saisons.

En conclusion, la formation d'adduits à l'ADN 8-OHdG est fortement induite par l'échantillon SRM 1648a et les échantillons urbains collectés l'automne.

Les résultats observés sur certains échantillons sont en accord avec des travaux ayant démontré la capacité des particules elles-mêmes (Dergham *et al.*, 2012, 2015; Leclercq *et al.*, 2018) ou de leur extrait organique (Billet *et al.*, 2018; Abbas *et al.*, 2019; Badran, Verdin, *et al.*, 2020) à induire des dommages oxydatifs à l'ADN, par le dosage de la 8-OHdG. De même, d'autres auteurs, par le dosage de la phospho-H2AX (Borgie *et al.*, 2015), et l'évaluation des lésions à l'ADN via le test des comètes (Gualtieri *et al.*, 2011). Platel et al., (2020) ont également mis en évidence le caractère génotoxique des particules fines atmosphériques.

2.3.4.2. Echantillons synthétiques

La formation d'adduits 8-OHdG a significativement augmenté (p <0,05) lors de l'exposition des cellules BEAS-2B à la majorité des échantillons synthétiques. De manière générale, la fraction hydrosoluble a un effet supérieur à la fraction particulaire (Figure IV-14). Cette fraction provoque des augmentations allant jusqu'à 450 % pour le mélange Fe2/Fe3/Zn. Les échantillons qui causent le plus d'effet sont ceux contenant du Fe et du ZnO, avec des augmentations de 200 à 450 % pour les fractions hydrosolubles des échantillons Fe2, Fe2/Fe3, ZnO, Fe2/Fe3/Mn/Zn/NC(dEO), Fe2/Fe3/Mn/Zn, Fe2/Fe3/Mn, Fe3, Fe2/Fe3/Mn/Zn/NC, Fe2/Fe3/Zn et les fractions particulaires du Fe2, Fe2/Fe3/Zn, Fe2/Fe3/Mn, Fe2/Fe3 et Zn. Aucune augmentation significative de la formation d'adduits n'a été observée pour la fraction PM des échantillons Fe3, NC, Fe2/Fe3/Mn, et la fraction Hyd du NC et du mélange Fe2/Fe3.

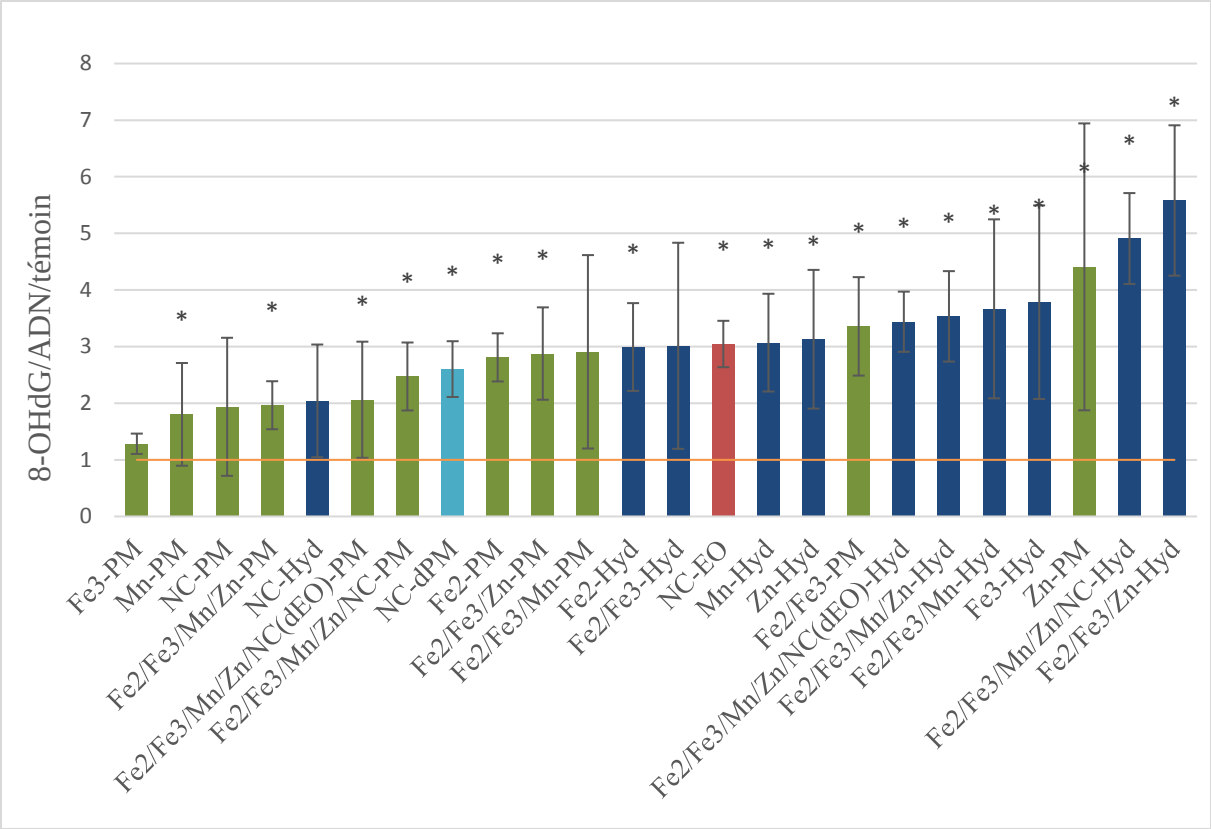
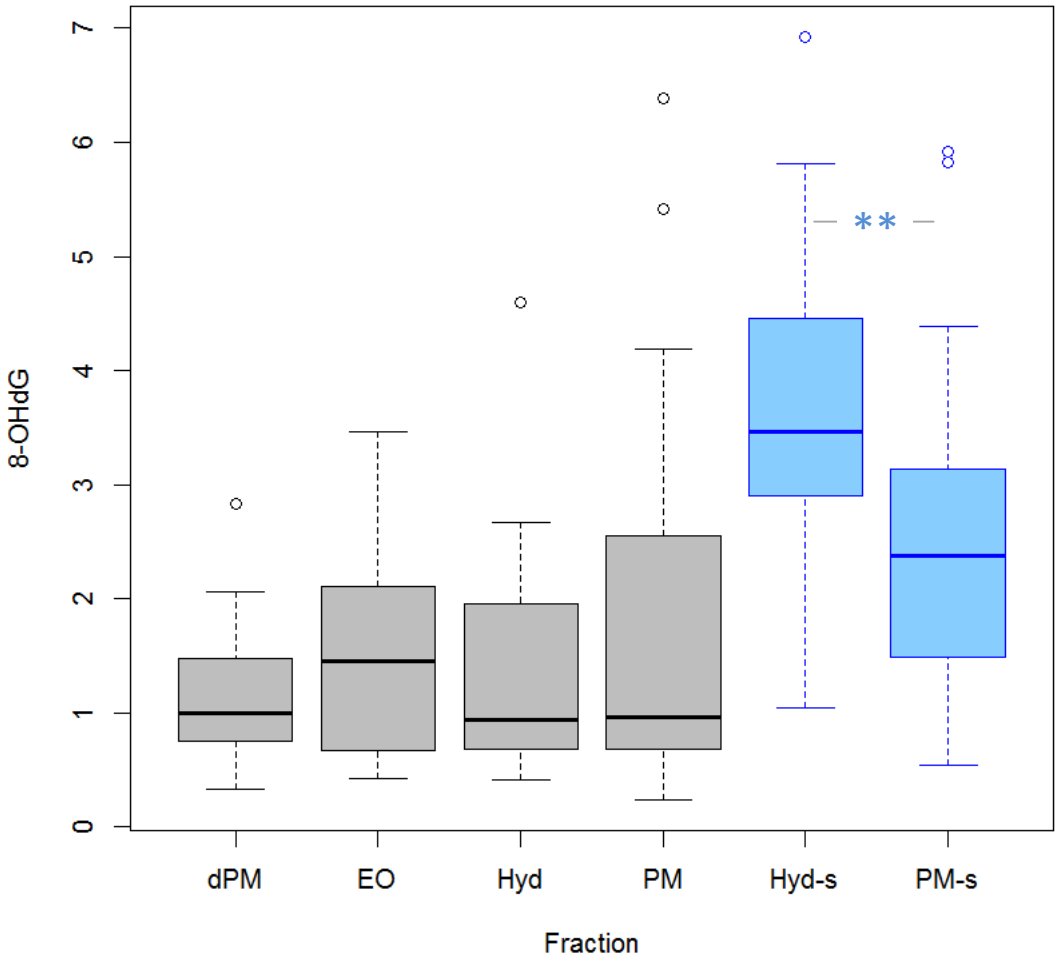


Figure IV-13: Concentration en 8-OHdG rapportée aux protéines totales et au témoin, dans les cellules BEAS-2B exposées aux différentes fractions des échantillons synthétiques de particules à la dose 24 µg/cm^2, représentée par les moyennes et écarts-types sur trois réplicats biologiques. Mann–Whitney U-test vs. témoins; *= $p < 0,05$. Vert =PM ; rouge=EO ; bleu clair=dPM, bleu foncé=Hyd.

En conclusion, pour les échantillons synthétiques, l'augmentation de la concentration en 8-OHdG semble être surtout induite par la fraction hydrosoluble, surtout les mélanges issus de composés à base d'oxyde de fer.



,

Figure IV-14: Concentration en 8-OHdG rapportée aux protéines totales et au témoin, dans des cellules BEAS-2B exposées aux différentes fractions des échantillons de PM (gris ; dPM, EO, Hyd, PM) et de particules synthétiques (bleu ; Hyd-s, PM-s) à la dose 24 µg/cm^2. Les résultats sont représentés par la médiane et les écarts interquartiles (n=21 pour les particules $PM_{2,5-0,3}$ et n=33 pour les échantillons synthétiques) ; test de Mann-Whitney : *p <0,05 ; **p <0,01 ; ***p <0,001.

2.4.Evaluation du potentiel oxydant

2.4.1. Test au dithiothréitol

L'évaluation du potentiel oxydant par le test au dithiothréitol (DTT) a été réalisée sur les extraits hydrosolubles et organiques des différents échantillons de PM et de particules synthétiques à des concentrations finales comprises entre 0,8 et 4 µg éq PM/µL. Les Figure

IV-15 et Figure IV-16 présentent les résultats de OP-DTTm pour les échantillons de PM et synthétiques, respectivement.

2.4.1.1. Echantillons $PM_{2,5-0,3}$

Les valeurs en OP-DTTm des fractions hydrosolubles et organiques sont souvent proches pour les deux fractions d'une même influence. Parmi les fractions organiques, les échantillons U-H et U-A sont responsables des valeurs OP-DTTm les plus élevées. L'échantillon U-A-EO est responsable de la valeur la plus élevée, avec OP-DTTm égal à 0,35 pmol/min/µg d'équivalent PM. Il est suivi par la fraction hydrosoluble des échantillons U-P, U-M et I avec des valeurs de OP-DTTm proches de 0,31 pmol/min/µg d'équivalent PM.

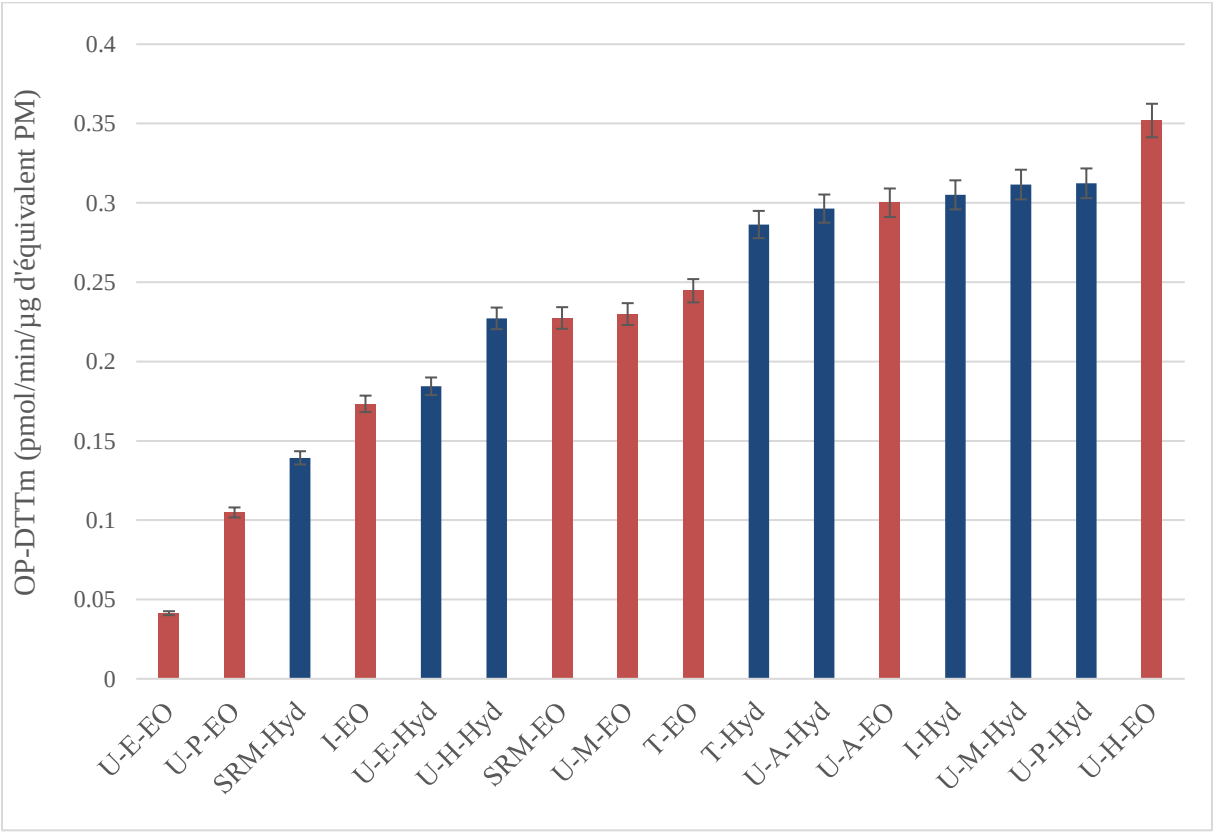


Figure IV-15: OP-DTTm (pmol/min/µg d'équivalent PM) des fractions hydrosolubles et organiques des échantillons de $PM_{2,5-0,3}$ collectées à Dunkerque (U-M, U-P, U-E, U-A, U-H), Grande-Synthe (I) et Roubaix (T), et de l'echantillon SRM, représenté par les moyennes et écarts-types sur trois réplicats. Rouge=EO, bleu foncé=Hyd.

En conclusion, il ne semble pas y avoir de de tendance marquée entre les réponses des fractions hydrosolubles et organiques au test au Dithiothréitol pour une même influence ; seules les valeurs de l'échantillon U-E semblent toutefois en retrait par rapport à celles obtenues pour les autres influences.

2.4.1.2. Echantillons synthétiques

L'analyse des résultats obtenus pour les fractions hydrosolubles des échantillons synthétiques constitués montre la réponse la plus élevée pour l'échantillon Fe2/Fe3/Mn/Zn/NC(dEO), avec un OP-DTTm égal à 0,068 pmol/min/µg d'équivalent PM. Deux oxydes métalliques répondent à ce test: Mn et Fe2 et avec des valeurs de OP-DTTm égales à 0,056 et 0,055 pmol/min/µg éq PM, respectivement.

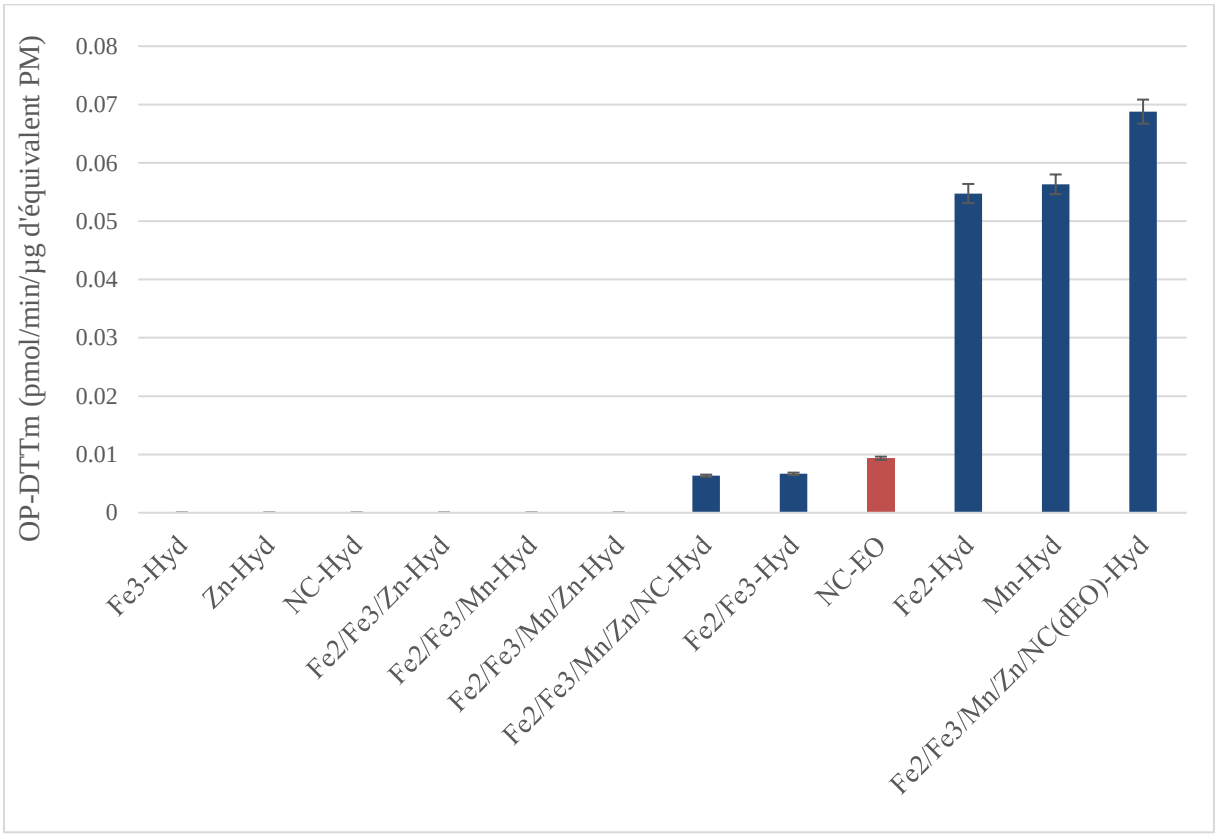


Figure IV-16: OP-DTTm (pmol/min/µg d'équivalent PM) des fractions hydrosolubles et organiques des échantillons synthétiques de particules, représenté par les moyennes et écarts-types sur trois réplicats. Rouge=EO, bleu foncé=Hyd.

Les échantillons Fe2/Fe3, Fe2/Fe3/Mn/Zn/NC et la fraction organique du noir de carbone répondent aussi à ce test mais avec des valeurs 7 à 10 fois plus faibles en comparaison avec la valeur la plus élevée. Les six autres échantillons synthétiques testés n'ont pas montré la capacité d'oxyder le DTT. Notons que les valeurs déterminées pour les échantillons synthétiques sont environ 10 fois plus faibles que celles des PM prélevées dans l'environnement.

En conclusion, le test DTT ne répond pas à tous les oxydes métalliques de la même manière. Les différentes réponses des oxydes métalliques et de leurs mélanges nous poussent à regarder par la suite s'il existe des effets synergiques et antagonistes, pouvant expliquer les résultats. De plus, les faibles valeurs de OP pour les oxydes métalliques nous permettent d'émettre l'hypothèse que l'effet de la fraction hydrosoluble des échantillons $PM_{2,5\text{-}0,3}$ n'est pas dû qu'aux métaux.

2.4.2. Test à l'Acide Ascorbique

L'évaluation du potentiel oxydant à l'aide du test à l'acide ascorbique (AA) a été réalisée sur les extraits hydrosolubles et organiques des différents échantillons de PM et synthétiques à des concentrations finales comprises entre 0,7 et 4,8 µg/µL dans les puits (Figure IV-17 et Figure IV-18).

2.4.2.1. Echantillons $PM_{2,5\text{-}0,3}$

L'ensemble des fractions hydrosolubles des échantillons de PM montre des réponses élevées en OP-AAm avec des valeurs comprises entre 0,54 à 2,84 pmol/min/µg, comparées aux extraits organiques de ces derniers, ayant des réponses allants de 0,072 à 0,59 pmol/min/µg. Ceci est en accord avec les résultats obtenus dans la littérature, tel que l'étude de Yang et al., (2014) qui a relié OP-AA aux métaux, donc aux composantes de la fraction hydrosoluble. Les échantillons urbains et trafic (SRM-Hyd, T-Hyd et U-A-Hyd) sont responsables des valeurs les plus élevées, avec OP-AAm égal à 2,84, 2,07 et 1,45 pmol/min/µg respectivement.

En conclusion, une tendance marquée se dégage de ce test : les extraits hydrosolubles présentent des résultats 2 à 10 fois plus élevés que les extraits organiques, pour chaque

échantillon. Ceci implique que le test AA parait davantage sensible aux espèces hydrosolubles des PM.

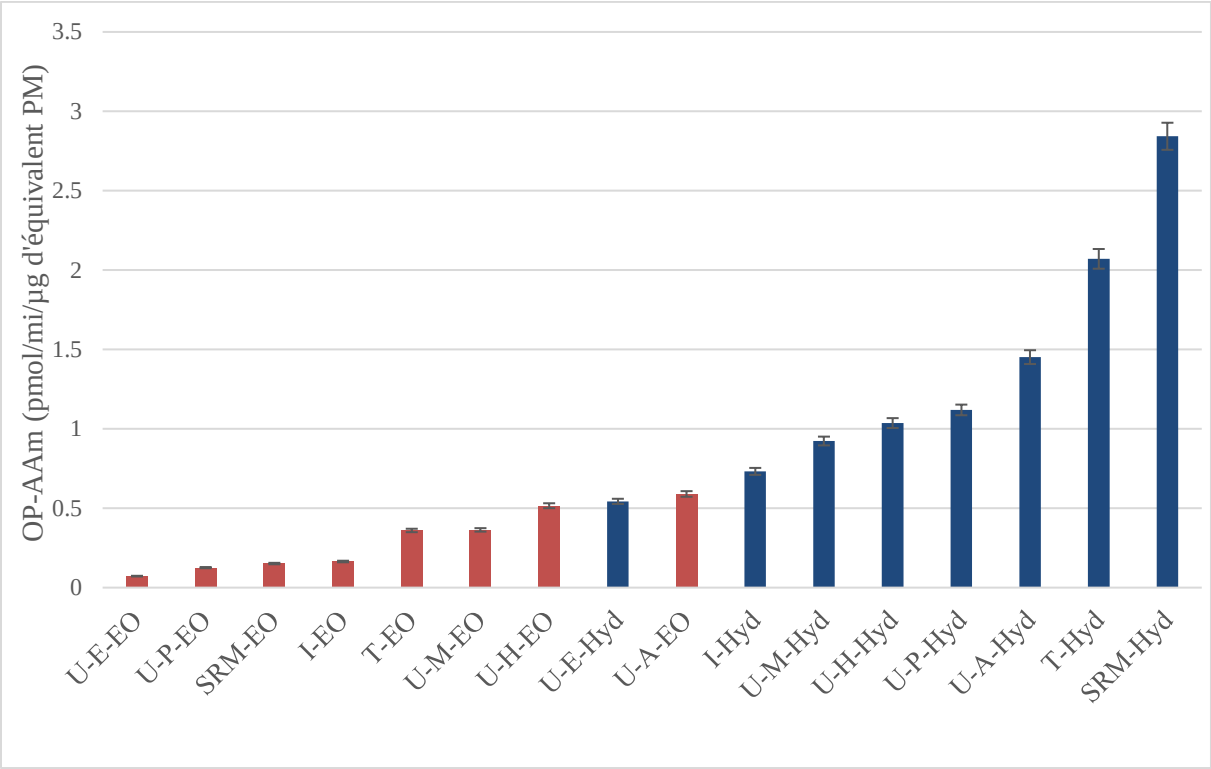


Figure IV-17: OP-AAm (pmol/min/µg d'équivalent PM) des fractions hydrosolubles et organiques des échantillons de $PM_{2,5-0,3}$ collectées à Dunkerque (U-M, U-P, U-E, U-A, U-H), Grande-Synthe (I) et Roubaix (T), et de l'echantillon SRM, représenté par les moyennes et écarts-types sur trois réplicats. Rouge=EO, bleu foncé=Hyd.

2.4.2.2. Echantillons synthétiques

La fraction organique du NC répond le plus au test AA, avec un OP-AAm égal à 0,12 pmol/min/µg d'équivalent PM. Parmi les autres échantillons synthétiques, le seul oxyde métallique qui réponde à ce test est le Fe2 avec OP-AAm égal à 0,066 pmol/min/µg d'équivalent PM. Perrone et al., (2019) ont également trouvé que OP-AA était relié au Fer. Lorsque d'autres oxydes métalliques sont ajoutés au Fe2, la réponse diminue avec OP-AAm égal à 0,018 et 0,003 pour les mélanges Fe2/Fe3 et Fe2/Fe3/Zn respectivement. A l'exception de ces 4 échantillons, tous les autres échantillons synthétiques ne provoquent pas une oxydation de l'acide ascorbique. Visentin et al., (2016) ont trouvé que OP-AA est relié à surtout à Cu^{2+}, Cr, Fe, et aux quinones (1,2NPQ, 1,4NPQ et 9,10PNQ), et un manque de corrélation avec les HAP, dans des échantillons synthétiques.

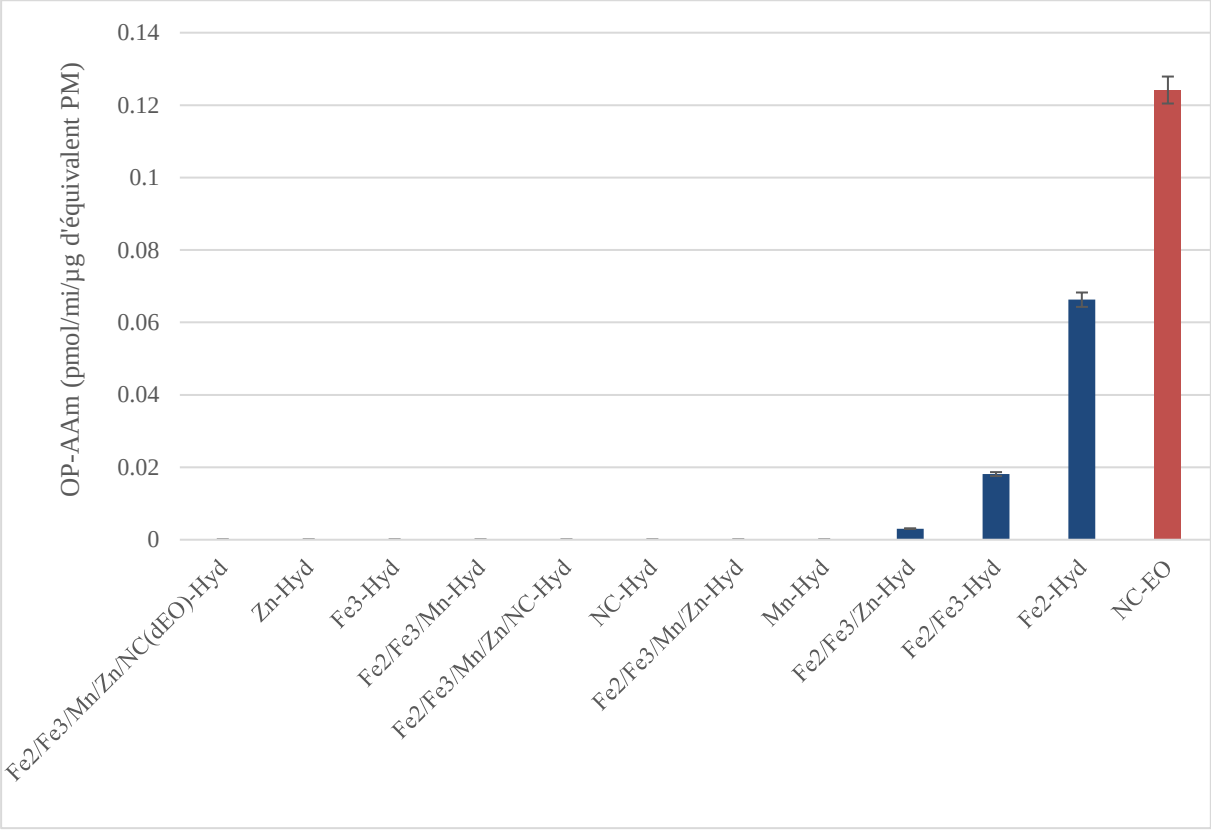


Figure IV-18: OP-AAm (pmol/min/µg d'équivalent PM) des fractions hydrosolubles et organiques des échantillons synthétiques de particules, représenté par les moyennes et écarts-types sur trois réplicats. Rouge=EO, bleu foncé=Hyd.

Notons aussi ici que les réponses des échantillons synthétiques sont 10 à 100 fois plus faibles que celles des échantillons de PM.

En conclusion, le test AA parait peu sensible aux oxydes métalliques. Les différentes réponses du Fe_2O_3 et les mélanges qui le contiennent, nous poussent à regarder par la suite s'il existe des effets antagonistes pouvant expliquer ces résultats. De plus, les faibles valeurs OP-AA des oxydes métalliques nous permettent d'emmètre une hypothèse que les métaux ne sont pas les seuls responsables des fortes valeurs OP-AA des extraits hydrosolubles de $PM_{2,5\text{-}0,3}$.

2.5. Analyse de corrélation

Dans le but d'étudier la relation entre les différents paramètres de stress oxydant, d'inflammation et de cytotoxicité, le coefficient de corrélation de Spearman a été calculé entre

ces derniers (Tableau IV-6). Ce critère a été choisi après avoir constaté que la distribution de ces données ne suivait pas une loi normale. Les concentrations d'ERO ont montré des corrélations faibles avec les données de concentration de 8-OHdG (r=0,28), de 8-isoprostane (r=0,26), d'IL-6 (r=0,33) et avec celle relative à la mesure de cytotoxicité (r=0,31). En revanche, les concentrations d'ERO sont fortement corrélées aux concentrations de protéines carbonylées (r=0,67). Les protéines carbonylées quant à elles ont montré également des corrélations faibles avec la 8-OHdG (r=0,30) et l'IL-6 (r=0,29) mais moyennes avec la 8-isoprostane (r=0,44) et WST-1 (r=0,40).

Tableau IV-6: Coefficient de corrélation (Spearman) entre les paramètres cellulaires (n=96). Seules les corrélations avec *p* <0,05 sont reportées (p* <0,01 ; ** *p* <0,001).**

	IL-6	WST-1 (24 µg/cm²)	WST-1 (96 µg/cm²)	ERO	Protéines carbonylées	8-OHdG	8-isoprostane
IL-6			0,22	0,33*	0,29*		
WST-1 (24 µg/cm²)			**0,63****				
WST-1 (96 µg/cm²)	0,22	**0,63****		0,31	0,40**		0,21
ERO	0,33*		0,31*		**0,67****	0,28*	0,26
Protéines carbonylées	0,29*		0,40**	**0,67****		0,30*	0,44**
8-OHdG				0,28*	0,30*		
8-isoprostane			0,21	0,26	0,44**		

Parmi les paramètres de stress oxydant, la mesure de protéines carbonylées semble être la plus reliée aux autres paramètres de stress oxydant. Afin d'étudier les relations entre les paramètres de stress oxydant, d'inflammation et de cytotoxicité aux composantes des PM, le coefficient de corrélation de Spearman a été calculé. Le Tableau IV-7 montre que WST-1 (96 µg/cm^2) est significativement au plus moyennement corrélé (0,4<r< 0,6) avec 12 HAP, Zn, Cu, C et As, et significativement fortement corrélé (r>0,6) avec Al, Cr, Pb et K. Le test IL-6 ne semble pas être associé aux HAP, mais présente des corrélations significatives avec Ba, Mn, Na, P, Sn, Mo, Cl, SO_4^{2-} et NH_4^+.

Tableau IV-7: Coefficient de corrélation (Spearman) entre les teneurs en HAP (n=48), et en métaux (n=24). Seules les corrélations avec p<0,05 sont reportées (*p<0,01 ; ** p<0,001) ; THAP : Somme des concentrations des 16 HAP prioritaires USEPA ; T_Mtx1 : somme des concentrations en Co, Cr, Cu, Mo, Ni, Ti, V ; T_Mtx2 : idem T_Mtx1 + Mn ; T_Mtx3 : idem T_Mtx1 + Mn, Fe ; T_Mtx4 : idem T_Mtx1 + Mn, Fe, Ba, Pb, Sn, Sr, Zn)

	IL-6	WST-1 (24 µg/cm²)	WST-1 (96 µg/cm²)	ERO	Protéines carbonylées	8-OHdG	8-isoprostane
THAP			0,32				
T_Mtx1							
T_Mtx2							
T_Mtx3		**0,60***					
T_Mtx4		**0,62***					
Corrélations par rapport aux HAP		Nap : 0,36	Nap : 0,50**		Acy : 0,33	Nap : 0,37	Ace : 0,56**
		Ace : 0,41*	Acy : 0,59**		Ace : 0,38*	Ace : 0,46*	Phe : 0,42**
		Phe : 0,44*	Ace : 0,41*				Ant : 0,37*
		Ant : 0,31	Flu : 0,38*				Fla : 0,36
		Fla : 0,36	Phe : 0,49**				Pyr : 0,35
		Pyr : 0,29	Ant : 0,40*				
			Fla : 0,43*				
			Pyr : 0,43*				
			Chr : 0,36				
			BbF : 0,33				
			BkF : 0,33				
			BghiP : 0,40*				
Corrélations par rapport aux éléments et ions	Ba : 0,43	As : 0,50	**Al : 0,60***	Ca : 0,44	Al : 0,42		Al : 0,54*
	Mn : 0,48	Ba : 0,43	As : 0,54*	Cd : 0,43	As : 0,50		As : 0,48
	Mo : 0,57*	**Mg : 0,62***	**Cr : 0,67****	Sr : 0,55*	Cu : 0,45		
	Na : 0,43	**Pb : 0,60***	Cu : 0,50		K : 0,42		
	P : 0,45	**V : 0,62***	**K : 0,73****		Pb : 0,43		
	Sn : 0,45	Zn : 0,57*	**Pb : 0,67****				
	Cl^- : 0,57*		Zn : 0,52*				
	SO_4^{2-} : 0,86**		C : 0,50				
	NH_4^+ : 0,76**						

Quant aux paramètres de stress oxydant, ces derniers présentent des corrélations significatives seulement avec quelques constituants des PM. Le test ERO apparait moyennement corrélé au Sr (p <0,01 ; r=0,55), Ca (p <0,05 ; r=0,44) et Cd (p <0,05 ; r=0,43). Les concentrations de protéines carbonylés semblent être corrélées à l'acénaphtène (p <0,01 ; r=0,38) et aux composés Al, As, Cu, K, Pb, et Acy (p <0,05). La 8-OHdG semble être moyennement corrélée à l'acénaphtène (p <0,01 ; r=0,46) et à la naphtalène (p <0,05 ; r=0,37). Enfin, la 8-isoprostane est significativement corrélée à 5 HAP (Ace : r=0,56 ; Phe : r=0,42 ; Ant: r=0,37 ; Fla : r=0,36 et Pyr : r=0,35), et aux éléments As (r=0,54) et Al (r=0,48). Ces résultats contrastés sont le reflet de la complexité des particules et de l'existence potentielles d'effets additifs, synergiques et antagonistes entre les différents composés chimiques des PM.

L'analyse de corrélation de Spearman entre les tests de potentiel oxydant et les paramètres de stress oxydant a également été menée (Annexe 1). Les résultats de corrélation ne montrent aucune relation significative entre les tests de potentiel oxydant (AA et DTT) et les paramètres de stress oxydant.

2.6. Analyse en composantes principales

L'Analyse en Composantes Principales a été réalisée en considérant n=84 échantillons incluant les triplicats. Les fractions de l'échantillon de SRM n'ont pas été considérées dans cette ACP (échantillons supplémentaires), celles-ci ayant montré des résultats parfois très différents de ceux de l'ensemble des autres échantillons en particulier pour la 8-isoprostane (Figure IV-6). Les projections de ces échantillons supplémentaires dans le plan principal, présentées en Annexe 2, confirment la nécessité de ne pas inclure les résultats de ces fractions dans l'ACP.

Les 84 échantillons considérés ici correspondent aux influences Trafic (T), Urbaine (U-P, U-E, U-A, U-H et U-M, désignant respectivement les échantillons représentatifs des saisons Printemps, Eté, Automne, Hiver et un échantillon moyen annuel), industrielle (I) analysées en triplicats. Pour chacune de ces influences, 4 fractions ont été considérées : PM, dPM, EO et Hyd.

Le 1er axe obtenu explique environ 44 % de la variabilité des données, les axes suivants environ 22 % de cette variabilité. En analysant les résultats obtenus dans le plan des deux premiers axes (Figure IV-19-a), il apparait que l'axe 1 est fortement lié à la quantité d'ERO détectées ainsi qu'aux paramètres de la 8-isoprostane et des protéines carbonylées. Cet axe est donc clairement en lien avec la capacité des échantillons à induire des dommages à la membrane cellulaire et aux protéines. L'axe 2 apparaît quant-à-lui en relation aux dommages à l'ADN. Notons que la variable 8-OHdG apparaît ici totalement décorrélée des autres paramètres de dommages liés au stress oxydant. De même, les variables supplémentaires IL6, et WST-1 montrent peu de relation avec les paramètres de dommages oxydatifs dans ce plan (1,2) expliquant 66 % de la variabilité des données. Précédemment, une corrélation avait pu être observée globalement, tout en présentant un coefficient faible (r<0,30).

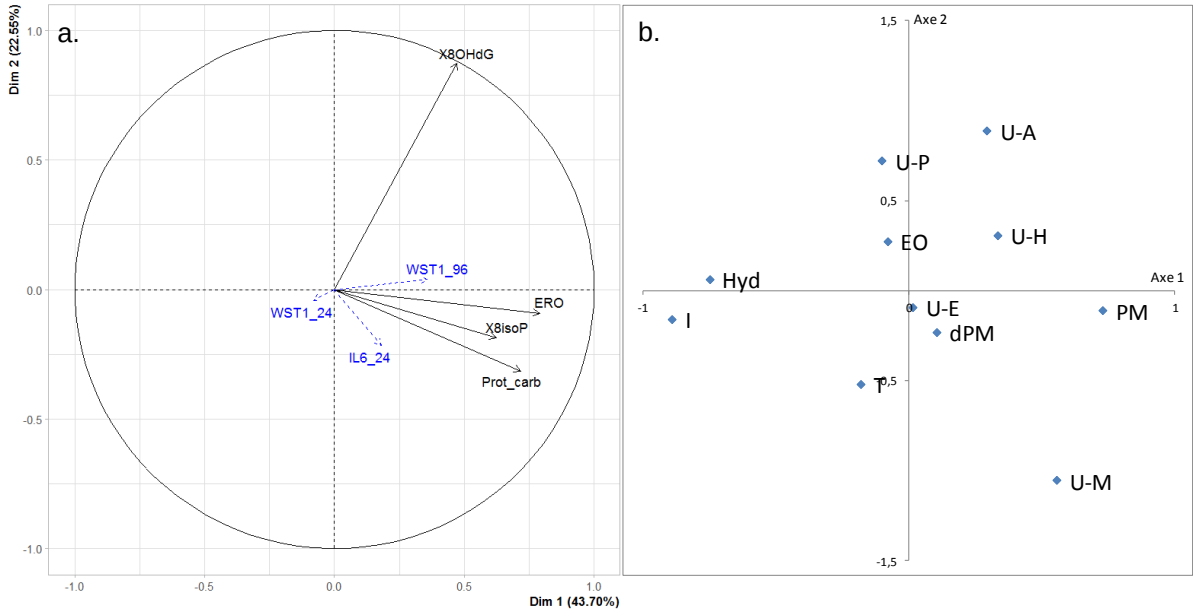


Figure IV-19: (a) ACP réalisée considérant les 4 paramètres ERO, 8-OHdG, 8-isoprostane, Protéines carbonylées sur n=84 échantillons – (b) Représentation des barycentres des différentes fractions ou influences dans le plan (1,2).

Les 84 échantillons ont été catégorisés selon leur influence et les fractions qu'ils représentent. Les barycentres relatifs aux 4 fractions d'une même influence (T, I, U-P U-E, U-A U-H et U-M) et ceux relatifs à l'ensemble des influences d'une même fraction (PM, dPM, EO et Hyd) ont été projetés dans le plan (1,2) afin de mettre en évidence des liens entre ces dernières et les 4 paramètres de stress oxydant étudiés (Figure IV-19-b). Notons que le nuage de points apparaît peu éclaté, ce qui pourrait rendre l'interprétation et les conclusions délicates.

Néanmoins sur l'axe 1 traduisant une échelle de dommages à la membrane et aux protéines, un classement Hyd < EO et dPM < PM apparaît, ce qui traduit la capacité de ces dernières à induire le plus de dommages. Ceci confirme les observations précédentes réalisées sur chacun des paramètres.

Si on adopte le même raisonnement en se focalisant maintenant sur les influences, il ressort surtout que l'influence industrielle apparaît reliée au minimum de dommages et d'ERO en comparaison aux autres influences. Ce résultat, obtenu considérant l'ensemble des paramètres mesurés est quelque peu inattendu. Il conforte néanmoins nos premières observations.

Une autre observation intéressante peut être faite. Dans ce travail, nous avons considéré 4 échantillons saisonniers et un échantillon moyen annuel (constitué de 25% de chacun des saisonniers). Il apparait que la projection des caractéristiques de cet échantillon moyen (U-M) ne se situe absolument pas au milieu de celles des échantillons saisonniers. Ceci tend à montrer et prouver que des interactions complexes s'opèrent entre les constituants de ces échantillons, et que celles-ci seraient capables de moduler (exacerber ou diminuer) les réponses cellulaires au regard d'un stress oxydant, et des dommages qui en résultent.

Pour aller plus loin, suite à l'ACP, nous avons réalisé une classification hiérarchique sur les composantes principales obtenues de manière à mettre en évidence statistiquement des groupes d'échantillons et à les relier à des caractéristiques particulières. Les résultats de cette classification et les caractéristiques remarquables des classes obtenues apparaissent sur la Figure IV-20 et dans le Tableau IV-8.

Trois groupes sont mis en évidence (les associations mentionnées ci-après sont statistiquement significatives à p <0,05) :

- Le premier (n=28) est surtout relié à l'influence industrielle (p <0,01) et à la fraction hydrosoluble. Il est aussi caractérisé par de faibles valeurs pour les paramètres ERO, protéines carbonylées 8-isoprostane (p <0,001 pour ces trois paramètres). Des faibles valeurs de paramètres 8-OHdG (p=0,06), IL-6 (p=0,01) et WST-1 (p=0,01) sont aussi associées à ce groupe avec un poids statistique plus faible.
- Le deuxième groupe (n=45) est caractérisé, par des valeurs plus élevées en ERO (p <0,01) et 8-isoprostane (p <0,01) et de faibles valeurs pour la 8-OHdG. Cette classe est fortement représentée par l'influence urbaine, en particulier U-E (p <0,01), et peu par l'influence industrielle (p <0,05).

- Le troisième et dernier groupe (n=11) est lui caractérisé par de fortes valeurs en ERO (p <0,001) et de paramètres de dommages (8-isoprostane et surtout 8-OHdG (p <0,001)) et une altération de la prolifération cellulaire (paramètre WST-1, p <0,001). Les échantillons associés à cette catégorie sont responsables de davantage de dommages comparés aux autres échantillons et occasionnent une perturbation plus marquée du fonctionnement de la cellule. En particulier, l'influence U-A ressort. La fraction Hyd est statistiquement moins associée à ce 3e groupe (p <0,05). La valeur test relative à la fraction PM semble aussi montrer que ce 3e groupe serait relié à la fraction PM (p = 0,13). L'étude des barycentres des fractions (Figure IV-19-b) et la position du nuage de points relatifs à ce 3e groupe (Figure IV-20) apporte du crédit à cette hypothèse.

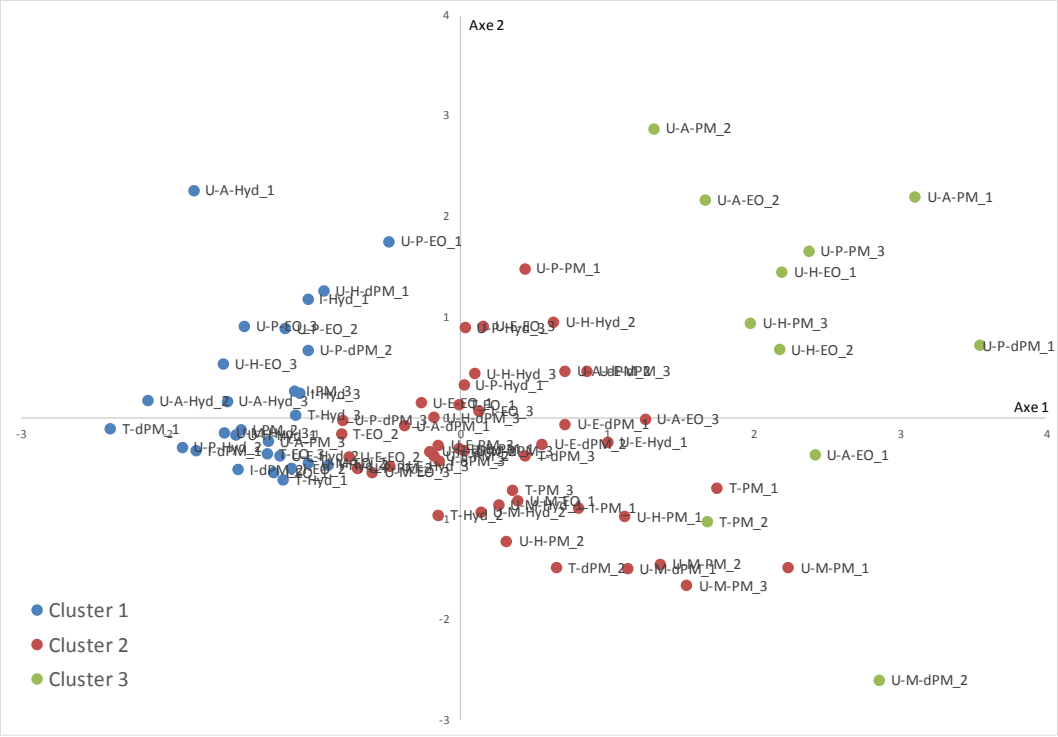


Figure IV-20: ACP réalisée considérant les 4 paramètres ERO, 8-OHdG, 8-isoprostane, Protéines carbonylées sur n=84 échantillons - Représentation des échantillons dans le plan (1,2) après classification.

Les relations avec le potentiel oxydant ont été explorées en considérant OP-AAm et OP-DDTm en variables supplémentaires et les fractions EO et Hyd des différentes influences hors SRM (n=36). Aucun lien n'a pu être mis en évidence entre OP-AAm, OP-DTTm et les

paramètres cellulaires mesurés. Ceci est en accord avec les conclusions de l'analyse de corrélation.

Tableau IV-8:Valeurs test obtenues pour les catégories "Fraction" et "Influence" et pour les variables quantitatives de chacune des classes. La valeur test permet de mettre en évidence les caractéristiques différant sensiblement dans la classe par rapport à l'ensemble des échantillons. Seules les valeurs test les plus remarquables ont été rapportées avec leur seuil de significativité (*p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001).

	Classe 1	Classe 2	Classe 3
Fraction=Hyd	**2,50***		-2,15*
Fraction=PM	-2,18*		1,51 (p=0,13)
Influence = I	**3,05****	-2,02*	
Influence = U-A		-1,75 (p=0,08)	2,05*
Influence = U-E	-2,02*	**2,92****	
Influence = U-M		1,59 (p=0,11)	
ERO	-6,04***	**2,93****	**4,11*****
Prot. carbonylées	-4,70***		**4,82*****
8-isoprostane	-4,34***	**2,62****	**2,20***
8-OHdG	-1,89 (p=0,06)	-2,08*	**5,71*****
IL-6	-1,66 (p=0,10)		
WST-1	-1,65 (p=0,10)		**3,44*****

3. Discussion

De nombreuses études *in vitro* ont été menées ces dernières années pour démontrer la toxicité des particules atmosphériques sur la santé humaine et surtout tenter d'expliquer les mécanismes mis en jeu (Gualtieri *et al.*, 2011; Dergham *et al.*, 2012, 2015; Dieme *et al.*, 2012; Cachon *et al.*, 2014; Leclercq *et al.*, 2018; Al Hanai *et al.*, 2019; Ndong Ba *et al.*, 2019; Badran, Verdin, *et al.*, 2020; Crobeddu *et al.*, 2020; Cui, Chen and Yang, 2020; Das *et al.*, 2021). Parmi les multiples impacts toxicologiques intracellulaires souvent observés, le stress oxydant apparaît comme un mécanisme clé. Il intervient en effet par exemple dans la survenue de la réponse inflammatoire, la mise en place des phénomènes de mort cellulaire programmée ou non (autophagie, apoptose et nécrose) mais également le déclenchement du processus de cancérogénèse suite aux propriétés mutagènes et génotoxiques des particules ou de leurs constituants. Cependant, nombreuses sont les études relatives à la toxicité des PM, abordée sous l'angle du stress oxydant, ayant conclu à la complexité d'établir un « schéma directeur de toxicité ». Il a notamment été soulevé le besoin d'améliorer la caractérisation physico-chimique des particules et la nécessité de tenir compte des nombreux constituants des particules et de leurs caractéristiques (taille, source, influence saisonnière…) (Dergham *et al.*, 2015; Van Den Heuvel *et al.*, 2016; Crobeddu *et al.*, 2020; Leni, Künzi and Geiser, 2020; Das *et al.*, 2021). En effet, un manque de connaissances persiste concernant l'implication des différentes fractions des particules, et particulièrement sur les constituants qui pourraient être les plus impliqués dans la toxicité observée, et notamment dans l'induction du stress oxydant. Ainsi, le but principal de ce travail est de rechercher un éventuel lien entre les réponses du potentiel oxydant des particules et le stress oxydant cellulaire généré et de mettre en évidence l'éventuelle implication préférentielle d'une fraction, source ou caractéristique physico-chimique sur la base des différents échantillons de particules sélectionnés. Ainsi, 8 échantillons de $PM_{2,5\text{-}0,3}$ collectées sur des sites de typologie différente, et durant différentes saisons, ainsi que leurs différentes fractions (particules totales, fractions hydrosolubles et organiques et fraction particulaire dépourvue des composés hydrosolubles et organiques), ont été retenus pour cette étude. Ces différents échantillons ont fait l'objet de 2 tests d'évaluation de OP et ont été mis au contact de cellules BEAS-2B. Les atteintes potentiellement engendrées au niveau de ces cellules pulmonaires en termes de production intracellulaire d'ERO, d'induction d'une réponse pro-inflammatoire et de dommages oxydatifs aux

macromolécules biologiques que sont la membrane cellulaire, les protéines et l'ADN ont été évalués. La comparaison de l'ensemble des résultats obtenus visait à étudier si la mesure de OP peut être reliée aux dommages oxydatifs observés sur les cellules.

De plus, des échantillons synthétiques contenant différents oxydes métalliques et du noir de carbone, considérés seuls ou en mélange, ont été choisis, afin de tenter de mieux comprendre les effets de la composition chimique sur les réponses cellulaires après exposition aux différentes fractions de particules.

3.1. Caractéristiques physicochimiques des $PM_{2,5-0,3}$

Les données de caractérisation physico-chimique ont montré que les différents échantillons de $PM_{2,5-0,3}$ présentaient certaines spécificités de composition en lien avec la typologie des sites considérés (urbain, industriel, trafic routier) et en fonction de la saison pour le site urbain.
Ces spécificités sont mises en évidence essentiellement grâce aux teneurs en éléments métalliques. Nous avons mentionné l'influence des émissions liées à l'activité sidérurgique et métallurgique, au travers des teneurs en Fe, Mn, Zn, Pb, Cr et Cd ; l'influence de sources liées à la combustion de fuel lourd pour expliquer les teneurs en Ni, V et Co, et enfin, l'influence des émissions hors-échappement du trafic routier, révélée par les teneurs en Fe, Zn, Cr, Cu (Tableau IV-1) (Gietl *et al.*, 2010; Hleis *et al.*, 2013; Kfoury *et al.*, 2016). De manière attendue, l'échantillon prélevé sous influence industrielle (I-PM) est caractérisé par des proportions élevées de Fe et Mn. Nous avons également observé dans cet échantillon la contribution relativement importante des émissions liées à la combustion de fuel lourd (Ni, V, Co). L'échantillon « Trafic » (T-PM) se distingue lui par les teneurs importantes en Cu, Cr, Ba et Zn dans une moindre proportion. Au niveau du site urbain, des différences saisonnières ont été mises en évidence, avec notamment une contribution moindre des émissions industrielles (Fe, Mn, Zn, Pb, Cr et Cd) en automne (U-A-PM) qu'aux autres saisons, avec en revanche une contribution plus grande des émissions liées à la combustion du fuel lourd (Ni, V, Co) au printemps (U-P-PM). Nous avons montré aussi que la fraction carbonée (C total, CPAH et TPAH) était plus importante en automne et en hiver, qu'au printemps et en été et que cette différence était à rapprocher d'un recours plus grand à des procédés de combustion en période froide (Tableau IV-1 et
Tableau IV-2).

Pour autant, même si les échantillons $PM_{2,5\text{-}0,3}$ prélevés sur les différents sites ont des caractéristiques spécifiques, nous faisons aussi le constat que les constituants chimiques majoritaires des particules, à savoir ions inorganiques secondaires (NO_3^-, SO_4^{2-}, NH_4^+), les sels marins et la fraction carbonée restent les mêmes et dans des proportions assez proches d'un échantillon à l'autre (Tableau IV-1). Cette situation est également rencontrée dans d'autres études d'évaluation d'impact toxicologique des PM (Dergham *et al.*, 2015; Van Den Heuvel *et al.*, 2016; Crobeddu *et al.*, 2020) et peut rendre plus difficile l'établissement de relations entre la composition des particules et la réponse cellulaire.

Il nous faut également rappeler que nous ne disposons pas d'une information exhaustive de la composition chimique des particules. La caractérisation a été ciblée sur les éléments majeurs et traces métalliques, les ions hydrosolubles et les hydrocarbures aromatiques. Ce choix était motivé par la capacité des HAP liés aux particules et des éléments métalliques tels que Fe, Mn, Cu, V, Ni à causer une cytotoxicité et engendrer un stress oxydant, comme précédemment montré dans la littérature (Shafer *et al.*, 2010; Gualtieri *et al.*, 2011; Dergham *et al.*, 2015).

Pour autant, il est connu que d'autres familles de composés non considérés dans cette étude peuvent contribuer aussi bien au potentiel oxydant qu'à un stress oxydant au niveau cellulaire. En exemple, parmi les composés organiques hydrosolubles, les substances de type HULIS, connues pour posséder des composés impliquées dans des réactions redox peuvent être impliquées dans la formation des ERO (Lin and Yu, 2011). Le rôle que pourraient exercer également d'autres familles de composés comme les phtalates, les dioxines/furannes, ou encore la fraction biologique des particules (Schins *et al.*, 2004) ne peut également pas être écarté. Par conséquent, le fait de ne pas disposer d'une connaissance complète de la composition des $PM_{2,5\text{-}0,3}$ constituera une limite dans l'interprétation de nos résultats. Dans le cas des composés synthétiques, on a bien une connaissance exhaustive, hormis pour le noir de carbone. La maitrise de la composition des composés synthétiques est intéressante et importante pour mieux comprendre l'effet de constituants seuls ou en mélange vis-à-vis de la réponse biologique.

L'échantillon de particules certifié (SRM 1648a) présente quant à lui des différences très nettes de composition par rapport à celle des échantillons de $PM_{2,5\text{-}0,3}$, quelle que soit leur typologie ou la saison (Tableau IV-1). Au niveau des espèces chimiques majoritaires, les teneurs en Ca, Mg, Ti élevées peuvent s'expliquer par une contribution de poussières crustales relativement élevée (Usher, Michel and Grassian, 2003). Cette explication peut être aussi soutenue en tenant compte que l'échantillon SRM 1648a présente une granulométrie

caractérisée par un diamètre moyen de 5,85 µm (National Institute of Standards & Technology, 2015) et que les particules crustales sont prépondérantes dans le mode grossier allant de 2,5 à 10 µm. La teneur en ions SO_4^{2-} est également élevée (165 000 µg/g), soit entre 2 et 4 fois plus que dans les échantillons de $PM_{2,5-0,3}$ de notre étude. Rappelons que la présence de cet ion s'explique en grande partie par la conversion de SO_2 dans l'air. Il peut ainsi être suggéré que la teneur en SO_4^{2-} s'explique par les niveaux élevés de SO_2 à l'époque de l'échantillonnage en 1977, qui était antérieure à la mise en place des réglementations sur la teneur en soufre dans les combustibles aux Etats-Unis, à partir de 1993 (USEPA, 2015). Par ailleurs, l'échantillon certifié est particulièrement riche en éléments connus pour leur toxicité comme les éléments Pb, Zn, Cr, As, et Cd (Chen and Lippmann, 2009; Fortoul *et al.*, 2015). Il a ainsi été montré que le plomb (6550 µg/g, soit 0,6 %) présent dans l'échantillon SRM 1648a avait une teneur 30 fois supérieure en moyenne à celle des échantillons de $PM_{2,5-0,3}$. Cette observation pourrait aussi être reliée à la période d'échantillonnage du SRM 1648a, réalisée peu après l'interdiction du plomb dans les carburants aux Etats-Unis en 1975, mais dont les effets sur la qualité de l'air ont mis plusieurs années avant d'être significatifs. Il peut être mentionné que la concentration en plomb dans l'air a diminué de 98 % aux Etats-Unis entre 1980 et 2014 (USEPA, 2016). Les teneurs en métaux sont de de 3 à 11 fois (cas des éléments Zn, Cr, As et Cd) plus élevées dans le SRM1648a en comparaison aux échantillons de $PM_{2,5-0,3}$. Ces spécificités doivent également être considérées afin de savoir si elles peuvent contribuer aux effets toxicologiques observés, notamment à la réponse biologique importante sur l'ensemble des paramètres de stress oxydant (ERO, 8-OHdG, protéines carbonylées et 8-isoprostane) après exposition des cellules à cet échantillon SRM 1648a (Figures IV-3 à IV-14).

3.2. Détermination de la toxicité des $PM_{2,5-0,3}$: réponse inflammatoire et stress oxydant

Les tests préliminaires de cytotoxicité nous ont permis de déterminer la dose 24 µg/cm^2 comme dose d'exposition des cellules BEAS-2B pour l'étude des mécanismes de toxicité sous-jacents que sont la réponse inflammatoire et l'éventuelle apparition d'un stress oxydant cellulaire. En particulier, les effets des différentes fractions de particules considérées (PM dans leur entièreté, fraction organique (EO), fraction hydrosoluble (Hyd), particules

débarrassées des fractions organiques et hydrosolubles (dPM) ont été explorées. Le Tableau IV-9 résume les résultats obtenus pour les différents paramètres cellulaires en réponse à l'exposition à ces fractions

Tableau IV-9: Effets comparatifs des différentes fractions des $PM_{2,5-0,3}$ et des particules synthétiques sur la réponse inflammatoire (IL-6), sur la quantité d'ERO intracellulaire et de lésions oxydatives à la membrane, aux protéines et à l'ADN de cellules BEAS-2B exposées (= pas de différence significative entre 2 fractions ; > valeur significativement plus élevée)

	$PM_{2,5-0,3}$	Particules synthétiques
IL-6	PM = dPM > EO > Hyd	PM = Hyd
ERO	PM > dPM = EO > Hyd	PM > Hyd
8-isoprostane	Pas de différence significative	PM > Hyd
Protéines carbonylées	PM = dPM > EO = Hyd	PM > Hyd
8-OHdG	Pas de différence significative	Hyd > PM

L'exposition des cellules aux particules totales et la fraction particulaire dépourvue des composés hydrosolubles et organiques a provoqué une augmentation significative (p <0,001 ; Figure IV-2) de la sécrétion de l'interleukine-6, cytokine pro-inflammatoire. Les extraits organiques ont eu le même effet à un degré moindre, alors que l'exposition aux extraits hydrosolubles n'a montré aucun effet. Différentes études ont abouti à des résultats similaires, avec une plus grande capacité des échantillons particulaires à induire le déclenchement d'une réponse inflammatoire en comparaison à leurs extraits hydrosolubles (Shang *et al.*, 2020) ou organiques (Verdin *et al.*, 2017; Badran, Verdin, *et al.*, 2020). D'autres études ont aussi mis en évidence, comme c'est le cas dans notre étude, l'absence de réponse inflammatoire suite à l'exposition des BEAS-2B à des extraits hydrosolubles et/ou organiques (Chowdhury *et al.*, 2018). Ces résultats obtenus sur les échantillons de $PM_{2,5-0,3}$ ont été partiellement confirmés par l'exposition des cellules BEAS-2B aux différents échantillons synthétiques. En effet même si au global, nous n'observons pas de différence significative, certaines fractions particulaires de ces échantillons ont tout de même provoqué une augmentation significative de la sécrétion en IL-6 alors que, dans tous les cas, la fraction hydrosoluble n'a, quant à elle, eu aucun effet sur ce paramètre de la réponse inflammatoire.

Ces résultats mettent ainsi en exergue le rôle prépondérant de la fraction particulaire dans la mise en place d'une réponse inflammatoire dans les cellules BEAS-2B. Ce processus a été

largement décrit dans la littérature comme étant intimement lié au déclenchement d'un stress oxydant cellulaire, avec notamment un lien étroit entre la sécrétion d'interleukines pro-inflammatoires et l'accumulation d'ERO (Dergham *et al.*, 2015; F. Xu *et al.*, 2018; N. Jiang *et al.*, 2020; Symon *et al.*, 2020).

Dans notre étude, nous nous sommes ensuite intéressés à l'éventuelle mise en place d'un stress oxydant. Il est apparu que les cellules BEAS-2B exposées aux différents échantillons/fractions de $PM_{2,5\text{-}0,3}$ présentaient une accumulation d'ERO dans toutes les conditions d'exposition, que ce soit avec les fractions particulaires, les extraits hydrosolubles ou les extraits organiques. Un effet prépondérant de la fraction particulaire a également pu être mis en avant, de même qu'un effet plus modéré des fractions hydrosolubles en comparaison aux fractions particulaires et aux extraits organiques. Comme précédemment évoqué et décrit dans la littérature, une corrélation positive, quoique faible ($r=0,33$, $p < 0,01$), entre la concentration cellulaire en ERO et la sécrétion d'IL-6 a été aussi ici mise en évidence. Cette hyper accumulation d'ERO dans la cellule est souvent décrite comme étant associée aux altérations des macromolécules biologiques (Dergham *et al.*, 2012; Dieme *et al.*, 2012; Cachon *et al.*, 2014; Van Den Heuvel *et al.*, 2016; Yan *et al.*, 2017; Ndong Ba *et al.*, 2019; Badran, Verdin, *et al.*, 2020; Cui, Chen and Yang, 2020). En effet, dans notre travail, des corrélations positives entre l'accumulation intracellulaire d'ERO et des altérations de la membrane cellulaire ($r=0,26$, $p < 0,0128$), l'oxydation des protéines ($r=0,67$, $p < 0,001$) et la formation d'adduits oxydatifs à l'ADN ($r=0,28$, $p < 0,006$) ont pu être mises en évidence.
L'effet majoritairement lié à la fraction particulaire observé précédemment pour la sécrétion d'IL-6 et l'accumulation d'ERO est également retrouvé pour des paramètres indicateurs de dommages oxydatifs aux macromolécules biologiques. En effet, l'impact prédominant de la fraction particulaire (totale ou débarrassée des fractions organiques et hydrosolubles) comparé aux autres fractions a été constaté sur l'oxydation irréversible des protéines par le dosage des protéines carbonylées ($p < 0,01$). Concernant les dommages membranaires mis en évidence par le dosage de la 8-isoprostane, seule une tendance semble se dégager pour les échantillons de $PM_{2,5\text{-}0,3}$, mais un effet significatif est cependant bien visible pour les fractions particulaires des échantillons synthétiques ($p < 0,001$). Concernant la 8-OHdG, si pour quelques influences considérées, l'effet des PM et des fractions EO semblent être prédominant, ce résultat ne peut être généralisé, puisqu'au global aucune différence significative n'a été observée entre les différentes fractions de $PM_{2,5\text{-}0,3}$.

Cet effet différencié relatif aux fractions est confirmé par différentes analyses statistiques, en particulier l'analyse en composantes principales suivie de la classification (Figure IV-19, Figure IV-20) qui montre une nette discrimination entre l'effet des fractions particulaires (particules totales et dans une moindre mesure les particules débarrassées des fractions hydrosoluble et organique) et les extraits organiques puis hydrosolubles. Cette même analyse a également permis de démontrer une nette différence de comportement entre le SRM 1648a et l'ensemble des échantillons testés (hormis le SRM).

3.3. Relation entre stress oxydant et composition chimique

Parmi les échantillons de $PM_{2,5\text{-}0,3}$, que ce soit pour l'accumulation d'ERO ou des paramètres d'évaluation des dommages oxydatifs, l'échantillon SRM 1648a (principalement sa fraction particulaire mais également ses extraits hydrosolubles et organiques) apparait comme l'un des plus nocifs pour les cellules BEAS-2B. Ceci pourrait être expliqué par sa composition chimique (Tableau IV-1) puisque cet échantillon est particulièrement riche en éléments traces connus pour jouer un rôle majeur dans la génération d'ERO et de dommages oxydatifs (Al, As, Cd, Cr, Co, Cu, Pb, Sr, V, Zn) (Shuster-Meiseles *et al.*, 2016; Crobeddu *et al.*, 2020; Fang *et al.*, 2020; Das *et al.*, 2021). En effet, Al et Pb ont déjà été décrits pour être associés aux réactions rédox (Verstraeten, Aimo and Oteiza, 2008) alors que Cr, As et Cd, éléments cancérigènes pour l'Homme (IARC, 2012), peuvent induire la surproduction d'ERO dans les cellules et ainsi contribuer à l'altération de la membrane plasmique, aux dommages aux protéines et à l'ADN (Chen and Lippmann, 2009; Fortoul *et al.*, 2015). Le SRM est également le plus concentré en Ti. Il a été démontré que l'exposition des cellules BEAS-2B au TiO_2 induisait la génération d'ERO, l'augmentation de la concentration en 8-OHdG, la peroxydation lipidique (Gurr *et al.*, 2005; Bhattacharya *et al.*, 2009). Cet échantillon est également 4 fois plus concentré en Zn que les autres échantillons de $PM_{2,5\text{-}0,3}$. ZnO a déjà été décrit pour induire la surproduction d'ERO, l'oxydation des protéines, des dommages à l'ADN, la peroxydation lipidique (Huang *et al.*, 2010; Syama *et al.*, 2013; Saliani, Jalal and Goharshadi, 2016; Singh, Cheng and Singh, 2020; Zoufan, Baroonian and Zargar, 2020). Dans notre étude des corrélations positives ont été mises en évidence entre certains de ces éléments et l'accumulation d'ERO (Cd : r=0,43, $p < 0,05$; Sr : r=0,55, $p < 0,01$), l'oxydation des protéines (Al : r=0,42, $p < 0,05$; As : r= 0,50, $p < 0,05$; Cu : r=0,45, $p < 0,05$; Pb :

r=0,43, $p < 0,05$) et l'altération des membranes cellulaires (Al : r=0,54, $p < 0,01$; As : r=0,48, $p < 0,05$).

La teneur en HAP légers (naphtalène, acénaphtène, phénanthrène, fluoranthène et pyrène) de l'échantillon certifié SRM 1648a est relativement importante notamment en comparaison aux échantillons U-A, U-E, U-M et T. Dans ce travail, nous avons mis en évidence des corrélations entre les teneurs en ces HAP légers et les dommages oxydatifs aux protéines (acy : r=0,33, $p < 0,05$; ace : r=0,42, $p < 0,01$), aux membranes cellulaires (ace : r=0,56, $p < 0,001$; phe : r=0,42, $p < 0,001$; ant : r=0,37, $p < 0,01$; fla : r=0,36, $p < 0,05$; pyr : r = 0,35, $p < 0,05$) ainsi qu'à l'ADN (nap : r=0,37, $p < 0,05$; ace : r=0,46, $p < 0,01$). En effet, des études *in vivo* et *in vitro*, sur des rats et cultures cellulaires, ont montré que ces HAP étaient capables d'induire la surproduction d'ERO, la peroxydation lipidique et des dommages à l'ADN (Vuchetich *et al.*, 1996; Wang and Zheng, 2008; Machado *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2019). De plus, les HAP présents dans les $PM_{2,5}$ ont précédemment été associés à l'induction du stress oxydant et de l'inflammation dans des modèles cellulaires bronchiques humains (Dergham *et al.*, 2012, 2015; Boublil *et al.*, 2013; Leclercq *et al.*, 2018).

De même, les fractions particulaires et organiques de l'échantillon influencé par le trafic routier (T) et les échantillons urbains collectés pendant les saisons froides (U-A et U-H) s'avèrent parmi les plus toxiques pour l'ensemble des tests réalisés. Une fois encore, les teneurs totales de ces échantillons en HAP (79 et 85 µg/g pour U-A et U-H respectivement) et en éléments traces comme Al, As, Cd, Cr, Co, Cu, Pb, Sr, et Zn pourraient expliquer cette toxicité. En effet, les teneurs en HAP sont 3 à 4 fois plus élevées dans les particules collectées durant les saisons froides par rapport aux saisons chaudes (U-H=85 ; U-A=79 ; U-P=25 et U-E=21 µg/g de PM). La différence de concentration en HAP durant ces deux périodes s'explique surtout par la concentration en chrysène, qui est liée à la combustion du bois et à la distillation du charbon, et au benzo[b]fluoranthene, qui est lié aux émissions des véhicules diesel. Il a été confirmé dans une étude précédente que pour U-H et U-A, une proportion de 82-83% des HAP était associé à la combustion, contre 66-68% au printemps/été (Heliot, 2018). Byambaa et al., (2019) ont également trouvé une forte influence de la combustion du bois et du charbon en hiver sur les concentration en HAP.

Par ailleurs, l'implication de la fraction organique peut-être confirmée par l'observation de l'effet toxique du noir de carbone (forme particulaire ou extrait organique), échantillon qui a une très forte teneur en HAP avec 1164,1 µg/g (8 à 60 fois plus élevée que nos échantillons de $PM_{2,5\text{-}0,3}$).

Sur la base des teneurs en composés organiques et inorganiques, il apparait surprenant que l'échantillon collecté sous influence industrielle (I), que ce soit pour sa fraction particulaire ou ses extraits hydrosoluble et organique, soit toujours positionné parmi les échantillons les moins toxiques et quel que soit le paramètre de stress oxydant évalué (mis également en évidence au travers de l'ACP/classification). En effet, cet échantillon $PM_{2,5-0,3}$ est celui présentant la plus grande concentration en HAPs (136 µg/g) (Figure IV-1) et en certains éléments traces (Tableau IV-1) précédemment évoqués (Cd, Cr, Co, Pb, Sr et Zn), ce qui pouvait laisser présager un degré de toxicité relativement élevé. Pour autant, un même constat avait déjà été observé par Dergham *et al.*, (2012) qui avaient prélevé, à Dunkerque également, un échantillon sous influence industrielle. Bien que nettement plus chargé en composés organiques et en éléments métalliques, l'échantillon de $PM_{2,5-0,3}$ collecté dans les mêmes conditions s'était avéré moins toxique qu'un échantillon prélevé sous influence urbaine, au regard de paramètres de stress oxydant.

Ce constat pourrait s'expliquer par la richesse de ces échantillons en Fe (plus de deux fois plus concentré que les autres échantillons) et notamment par la présence Fe_3O_4 qui a déjà été mise en évidence dans des échantillons prélevés sous influence industrielle à Dunkerque (Laversin, 2006; Kfoury *et al.*, 2016; Heliot, 2018) en raison des émissions du complexe sidérurgique Hleis *et al.*, (2013). En effet, il a été montré que la forme Fe_3O_4 était retrouvée dans des particules émises au niveau des hauts-fourneaux et de l'aciérie. A cette étape de la production de l'acier, la matière se retrouve en fusion et la fonte liquide atteint près de 2000°C. A cette température, le fer est volatil mais une fois dans l'air, la diminution de température est très rapide et entraîne la condensation du fer sous la forme de nanosphérules et microsphérules oxydées, renfermant les phases magnétite Fe_3O_4 et hématite α-Fe_2O_3 (Laversin, 2006). Si l'on se réfère aux tests réalisés en considérant les échantillons synthétiques, l'échantillon Fe_3O_4, lorsqu'il est considéré seul ou en association présente le moins de toxicité voire aucune. Cette observation tend à montrer que le Fe_3O_4 exercerait un effet inhibiteur sur l'induction du stress oxydant. Une étude récente menée sur les cellules épithéliales humaines A549 a montré que suite à l'exposition au mélange Mn/Pb, la viabilité cellulaire était de 45 %, et était plus élevée dans le cas du mélange Fe/Mn/Pb (69 %), ce qui signifierait que la présence de fer diminuerait la cytotoxicité de l'échantillon constitué de différents métaux (Yuan *et al.*, 2019).

Nous avons montré également que l'échantillon $PM_{2,5-0,3}$ prélevé sous influence industrielle (I-PM) renfermait une teneur en manganèse élevée (6692 µg/g) près de 4 fois plus

élevée que celle de l'échantillon urbain (U-PM) (Tableau IV-1). Cependant, il a été montré grâce aux tests effectués à partir des échantillons synthétiques que Mn_2O_3 pouvait engendrer une forte production d'ERO (Figure IV-4), et des augmentations significatives pour les autres paramètres du stress oxydant (Figure IV-7, Figure IV-10, Figure IV-13). Des études ont prouvé le rôle de cet oxyde métallique Mn_2O_3 dans l'induction du stress oxydant par l'oxydation des protéines et la peroxydation lipidique (Sun *et al.*, 2013; Ognik *et al.*, 2019). Une autre étude récente a montré que l'exposition des cellules A549 à 79 µg/L de Mn^{2+} pouvait diminuer leur viabilité cellulaire (Yuan *et al.*, 2019). Dans notre cas, et au regard des résultats de stress oxydant pour l'échantillon industriel (I-PM), il peut être suggéré que l'effet du manganèse soit limité à cause de la présence de Fe_3O_4 dans l'échantillon de PM.

Enfin, il ne peut être exclu un effet sur la réponse cellulaire de l'interaction entre des composés organiques, comme les HAP ou encore des composés organiques de type HULIS (bien que non analysés dans notre travail) avec des éléments métalliques. Il peut être suggéré que des interactions synergiques entre les métaux et les composés organiques contribuent au pouvoir oxydant des composés organiques tels que des quinones, qui oxydent les antioxydants cellulaires et génèrent par la suite H_2O_2. Ce dernier peut ensuite être converti en radical $OH^{\bullet}$ par les espèces métalliques, par la réaction de Fenton (Y. Wang *et al.*, 2018). Ce résultat est en accord avec ceux obtenues dans d'autres études récentes (Al Hanai *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2020). Ce type d'interaction entre composés des particules pourrait aussi être pris en compte pour expliquer le niveau de stress oxydant supérieur pour les échantillons de $PM_{2.5\text{-}0.3}$ sur le site urbain en saison froide (U-A-PM et U-H-PM), qui sont plus riches en HAPs que les échantillons prélevés au printemps et en été (U-P-PM et U-E-PM).

3.4. Potentiel oxydant des $PM_{2,5\text{-}0,3}$

Le potentiel oxydant des échantillons de $PM_{2,5\text{-}0,3}$ a été évalué à l'aide des méthodes au DTT et à l'acide ascorbique sur les fractions hydrosolubles et organiques. Les résultats du test à l'AA pour les échantillons de $PM_{2,5\text{-}0,3}$ ont montré des valeurs plus élevées pour la fraction hydrosoluble (0,5 à 2,8 pmol/min/µg) par rapport à la fraction organique (0,07 à 0,58 pmol/min/µg de PM) (Figure IV-17). Les valeurs obtenues par le test DTT étaient nettement plus faibles (0,04 à 0,35 pmol/min/µg), et pour ce test, il est difficile de définir

clairement laquelle des fractions organique ou hydrosoluble est responsable des plus fortes valeurs de potentiel oxydant (Figure IV-15).

Les échantillons de particules synthétiques quant à eux, ont montré des valeurs très faibles en comparaison (maximum 0,12 pmol/min/µg pour AA et 0,06 pmol/min/µg pour DTT), et bien souvent le potentiel oxydant n'a pu être quantifié (Figure IV-16 ; Figure IV-18). Ici, nous ne pouvons que constater que nos échantillons de particules synthétiques apparaissent ici comme un modèle peu représentatif du comportement des particules prélevées dans l'environnement vis-à-vis de OP.

En se référant également aux résultats présentés dans le chapitre 3, il apparait aussi que les valeurs obtenues ici pour les $PM_{2,5-0,3}$ sont bien en deçà de celles déterminées sur des échantillons de $PM_{2,5}$ collectés dans la même zone d'études (valeurs moyennes de 55 et 17 pmol/min/µg respectivement pour le potentiel oxydant déterminé à partir de AA et DTT). Ainsi, les valeurs trouvées pour les $PM_{2,5-0,3}$ sont de l'ordre de 20 à 40 fois plus faibles en comparaison à celles des $PM_{2,5}$. Certes les solvants d'extractions sont différents, solution de Gamble dans un cas, eau ultrapure dans l'autre, mais il a pu être observé peu de différences liées à cela (Calas *et al.*, 2017). De ce fait, ceci met clairement en évidence le rôle prépondérant de la fraction quasi-ultrafine ($PM_{0,3}$) des PM, et des espèces qui lui sont associées, sur les valeurs de OP. En particulier, nous avons pu montrer que cette fraction $PM_{0,3}$ était dix fois plus riche en composés de type HAP que la fraction $PM_{2,5-0,3}$, mais aussi qu'elle renfermait une plus grande proportion (jusqu'à 30 fois plus pour certains éléments) d'espèces métalliques hydrosolubles telles que le Zn, V, Fe, Cu, Cr (Landkocz *et al.*, 2017). Ces observations mettent en lumière la complexité des $PM_{2,5}$ en termes de composition avec des constituants dans la gamme granulométrique quasi-ultrafine pouvant impacter fortement les valeurs de OP.

Il est aussi connu que la fraction submicronique et quasi-ultrafine des particules atmosphériques est largement impactée par les émissions anthropiques (Ledoux, 2003; Ledoux *et al.*, 2004). En particulier, les processus de combustion, notamment liée au trafic automobile, maritime ou à la biomasse émettent des particules dans cette gamme granulométrique (Timonen *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2013; Ledoux *et al.*, 2018; Rivas *et al.*, 2020). De même, certains procédés industriels notamment lorsqu'ils font intervenir des procédés à haute température sont responsables de la formation et de l'émission de particules métalliques dans une gamme granulométrique couvrant largement le domaine submicronique (Moreno, Jones and Richards, 2004; Hleis, 2010).

Typiquement, la gamme quasi-ultrafine concentre également les composés organiques hydrosolubles, notamment associés aux processus de combustion (Park *et al.*, 2013; Qiao *et al.*, 2015; Voliotis *et al.*, 2017). Parmi ceux-ci, nous pouvons citer, les substances "Humic like" (HULIS), qui rassemblent des composés aromatiques et aliphatiques contenant diverses fonctions polaires telles que hydroxyle, carboxyle ou carbonyle (Graber and Rudich, 2006). Ils contiennent à la fois des composés redox actifs tels que les quinones, et d'autres constituants tels que les acides carboxyliques. Bien qu'ils n'aient pas de propriétés redox, les acides carboxyliques peuvent chélater les métaux de transition comme le Fe et le Cu, et influencer l'activité redox de ces derniers.

La combustion de biomasse est une source majeure des HULIS présents dans l'atmosphère, tandis que le sol, les émissions associées au trafic maritime et routier sont considérés comme de possibles contributeurs (Graber and Rudich, 2006; Zheng *et al.*, 2013; Kuang, 2017). Baduel, Voisin and J.-L. (2010) ont par ailleurs montré une différence saisonnière en termes de composition des HULIS : des composés plus aliphatiques et moins aromatiques prédominent en été par rapport à l'hiver et la teneur en groupements carboxyliques est plus élevée en hiver qu'en été.

Ma *et al.*, (2018) et Dou *et al.*, (2015) ont montré que les HULIS participent à la formation d'ERO et contribuent fortement au potentiel oxydant, tandis que Lin et Yu, (2020) ont étudié les effets des HULIS en présence de métaux sur l'oxydation de l'AA. Le rôle des HULIS semble aujourd'hui évident dans les réponses associées au potentiel oxydant. De la même manière, d'autres études ont montré que le potentiel oxydant en particulier mesuré par le DTT était lié en partie aux métaux (Guo *et al.*, 2019), au carbone organique (Delfino *et al.*, 2013), et aux quinones (Yu *et al.*, 2018) présentes dans les PM.

Ainsi, l'ordre de grandeur des valeurs de OP observées pour les échantillons de $PM_{2,5}$, de $PM_{2,5\text{-}0,3}$ et les échantillons de particules synthétiques pourrait s'expliquer par la présence/absence de ces familles de composés en plus de certains métaux présentant une affinité avec la fraction hydrosoluble et présents majoritairement dans les fractions quasi-ultrafines de particules prélevées dans l'environnement.

Si l'on cherche désormais à expliquer les réponses OP en fonction des influences sous lesquelles les $PM_{2,5\text{-}0,3}$ ont été prélevées, l'influence "trafic" et l'influence "urbaine" ressortent dans une certaine mesure si l'on considère le test à l'AA. Toutefois, cette hiérarchie est un peu

remise en cause si l'on se réfère aux tests au DTT, avec l'échantillon collecté sous influence industrielle qui vient s'intercaler entre le "trafic" et l'influence "urbaine". Il apparait donc délicat de conclure en nous basant sur les résultats obtenus. Néanmoins, nos observations apparaissent conformes avec plusieurs études ayant trouvé des relations entre OP-AA et OP-DTT et les émissions urbaines et industrielles (Simonetti *et al.*, 2018; Weber *et al.*, 2018; Perrone *et al.*, 2019).

Enfin, un lien peut être fait avec nos résultats obtenus sur les $PM_{2,5}$, où nous avions montré que la source "trafic hors échappement" ainsi que les sources de combustion, notamment liée au fuel lourd et les émissions industrielles notamment de la sidérurgie, étaient responsables de valeurs élevées de OP, que ce soit pour les mesures obtenues à partir du DTT ou de l'AA. Les influences considérées dans ce travail se rapportent soit entièrement à ces sources ("trafic" ou "industrie") soit combinent ces sources. Rappelons que le site urbain considéré ici est Dunkerque, ville portuaire face à la Mer du Nord, qui est également impacté par le trafic routier et les émissions industrielles. Il est dès lors possible de comprendre pourquoi les résultats relatifs à OP font ressortir les échantillons collectés sous influences urbaine, trafic et industrielle.

3.5.Relation entre potentiel oxydant et stress oxydant

Dans notre travail, comme cela a été évoqué précédemment, des corrélations positives ont été mises en évidence entre la réponse inflammatoire et l'accumulation intracellulaire d'ERO. De plus, cette hyper-accumulation d'ERO s'est révélée être positivement corrélée avec l'apparition d'un stress oxydant cellulaire via l'ensemble des tests de dommages oxydatifs cellulaires indicateurs de l'altération de la membrane plasmique, de l'oxydation des protéines et de la formation d'adduits oxydatifs à l'ADN.

Par contre, il n'a été observé aucune corrélation entre les tests OP et les réponses cellulaires, que ce soit en lien avec la réponse pro-inflammatoire ou les dommages oxydatifs aux macromolécules biologiques. Ces derniers sont pourtant le reflet de la réponse intégrative de la cellule aux différents constituants des particules et sont censés être plus représentatifs des effets potentiellement observables *in vivo*.

Si l'on se restreint aux recherches menées ces 10 dernières années, et bien que plusieurs études aient avancé des corrélations entre le potentiel oxydant et une réponse cellulaire (Steenhof *et al.*, 2011; Delfino *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014; Crobeddu *et al.*, 2017; Karavalakis *et al.*, 2017; Jaramillo *et al.*, 2018), aucun consensus n'est établi, loin de là. En effet, nombreuses sont les études qui ont conclu à une absence de corrélation dans leurs travaux (Danielsen *et al.*, 2010, 2011; Quintana *et al.*, 2011; Gerlofs-Nijland *et al.*, 2013; Badding *et al.*, 2014; Fox *et al.*, 2015; Van Den Heuvel *et al.*, 2016, 2018; Velali *et al.*, 2016). De plus, dans la majorité des cas, les corrélations avancées l'ont été avec des paramètres de cytotoxicité (Steenhof *et al.*, 2011; He *et al.*, 2018), de réponse du système anti-oxydant (Crobeddu *et al.*, 2017; Karavalakis *et al.*, 2017) ou avec des enzymes de métabolisation (Crobeddu *et al.*, 2017; Jaramillo *et al.*, 2018). Seuls quelques travaux ont mis en lumière des corrélations avec la réponse inflammatoire (Liu *et al.*, 2014; Karavalakis *et al.*, 2017; Jaramillo *et al.*, 2018), ou l'accumulation d'ERO (Delfino *et al.*, 2013; Crobeddu *et al.*, 2017; He *et al.*, 2018).

Crobeddu *et al.* (2017, 2020) ont en effet montré que des $PM_{2,5}$ collectées sous l'influence du trafic routier ou de la combustion de biomasse avaient donné une réponse positive, plus ou moins marquée, quel que soit le test OP considéré sur les 5 tests utilisés (dosage par RPE, déplétion de l'AA, déplétion du DTT, capacité d'oxydation de la CM-H2DCF, déplétion du contenu en anti-oxydants, cassures d'ADN plasmidique). De plus, les différents tests OP présentaient des corrélations plus ou moins bonnes avec la production intracellulaire d'ERO aussi bien dans les cellules épithéliales bronchiques humaines que dans les cellules endothéliales d'artères pulmonaires humaines. Cette observation serait probablement en lien avec la mise en jeu de divers évènements cellulaires générateurs d'ERO induits par l'interaction des PM avec les cellules et/ou par l'incapacité des mesures intracellulaires d'ERO de refléter l'ensemble des espèces produites.

Il est important de souligner que, bien que des corrélations aient été mises en évidence entre OP et la génération d'ERO et l'apparition d'une réponse inflammatoire d'une part, et qu'il soit bien établi dans la littérature un lien entre l'apparition de cette réponse inflammatoire ou de cette hyper-accumulation d'ERO et les dommages oxydatifs aux biomolécules cellulaires d'autre part, aucun lien direct, ni corrélation n'ont été trouvé dans notre étude entre OP et ces dommages oxydatifs cellulaires.

Plusieurs explications peuvent être avancées pour expliquer ce résultat quelque peu inattendu. La première explication tient probablement au fait que les tests OP mis en œuvre ne

rendraient pas entièrement compte de la production d'ERO cellulaires liés à l'impact de la particule elle-même (réactivité de surface des PM) ou à la métabolisation des composés organiques (Crobeddu *et al.*, 2017; Leni, Künzi and Geiser, 2020). Le principal défi serait donc de distinguer les dommages cellulaires provoqués directement par l'OP intrinsèque des particules de ceux générés par une formation « secondaire » d'ERO induite par les particules agissant sur divers mécanismes biologiques de la cellule. En outre, le terme ERO manque de précision, car il couvre une variété d'espèces réactives avec une variabilité considérable en termes de réactivité, de longévité et d'effets biologiques. Parmi les deux tests utilisés, celui au DTT a été considéré par Crobeddu *et al.*, (2017) comme le plus approprié pour évaluer l'OP des $PM_{2,5}$ en raison de sa sensibilité aux traceurs des métaux de transition dérivés de la combustion et des composés organiques aromatiques. De son côté, le test OP-AA semble être principalement sensible à la présence de métaux provenant des émissions de la combustion (Chapitre 3). Dans notre cas, quel que soit le test OP considéré, une réponse plus ou moins importante peut-être observée selon l'échantillon considéré. Cette variation en termes de réponses est le reflet de la variation en termes de composition ou d'influence de sources, qui possèdent toutes leur propre potentiel oxydant.

Une seconde explication pourrait résider dans le fait qu'OP ne soit finalement que peu relié au niveau d'ERO qui représentent une photographie à un instant donné de la balance oxydante, et non la somme de tous les ERO formés suite à l'exposition. De même, suivre des paramètres de dommages oxydatifs cellulaires pour tenter de les corréler avec le OP des particules ne semble pas être le meilleur choix ; il s'est en tout cas révélé ne pas l'être dans notre étude. En effet, une des limites de nos recherches se situe dans le fait de ne pas avoir considéré le système de défense anti-oxydante qui pourrait présenter un lien plus grand avec le potentiel oxydant. En effet, plusieurs études semblent confirmer cette piste qui sera indéniablement à approfondir dans le cadre de perspectives. En effet, dans leurs travaux, Crobeddu *et al.*, (2017, 2020) ont obtenu les meilleures corrélations lorsqu'ils ont considéré OP et les réponses cellulaires du système antioxydant, et notamment avec l'hème oxygénase, la superoxyde dismutase, et la diminution d'anti-oxydants (acide ascorbique et glutathion). Dans le même sens, Li *et al.*, (2003) avaient précédemment obtenu une très forte corrélation (R^2 = 0,97) entre OP-DTT et l'hème oxygénase.

4. Conclusion

Ce chapitre avait pour objectif principal de rechercher la contribution des caractéristiques physicochimiques des $PM_{2,5-0,3}$ dans l'induction du stress oxydant après exposition des cellules épithéliales bronchiques BEAS-2B. Il avait aussi pour objectif d'étudier le potentiel oxydant des fractions organique et hydrosoluble des échantillons, afin de conclure quant au lien entre le potentiel oxydant et le déclenchement du stress oxydant cellulaire.

Pour cela, des échantillons de particules $PM_{2,5-0,3}$ prélevées sur des sites de différentes typologies ont été sélectionnés : milieu urbain (U-PM) durant différentes saisons, proximité du trafic routier (T-PM) et sous l'influence d'émissions industrielles (I-PM). En complément, outre l'étude d'un échantillon certifié caractéristique d'une influence urbaine (SRM 1648a), des échantillons synthétiques à base d'oxydes métalliques et/ou de noir de carbone ont été sélectionnés afin de mieux comprendre l'effet des constituants chimiques des particules. L'évaluation de la réponse cellulaire a été menée en considérant quatre fractions des échantillons : la fraction particulaire (PM), la fraction hydrosoluble (Hyd), la fraction organique (EO), et la fraction débarrassée de l'extrait hydrosoluble et organique (dPM). Après exposition des cellules BEAS-2B à ces différentes fractions, la réponse en termes de stress oxydant a été suivie par la mesure de production des ERO et l'évaluation d'altérations biologiques au niveau de la membrane plasmique (8-isoprostane), des protéines (protéines carbonylées), et de l'ADN (8-OHdG). De même, la capacité des PM à générer des ERO a été estimée à l'aide de deux tests acellulaires de potentiel oxydant (DTT et AA).

Les résultats ont montré que toutes les fractions testées induisaient le stress oxydant, avec des intensités différentes selon les fractions. Les particules dans leur entièreté $PM_{2,5-0,3}$ ont été capables de déclencher la surproduction des ERO et causer des dommages aux protéines à des niveaux plus élevés que les autres fractions. L'effet prédominant de la fraction particulaire sur ces paramètres (ERO et protéines carbonylées) est confirmé par les résultats obtenus sur l'échantillon dPM, dont la réponse est supérieure à celle mesurée avec les extraits organiques et hydrosolubles. Bien qu'aucune différence significative n'ait été observée sur l'ensemble des échantillons des différentes fractions pour la 8-isoprostane et la 8-OHdG, des altérations plus élevées ont été constatées avec la fraction particulaire et les extraits organiques des échantillons de $PM_{2,5-0,3}$ provenant du site urbain.

L'analyse de corrélation a montré que les concentrations d'ERO présentaient des corrélations non seulement avec la cytotoxicité (WST-1 ; $r=0,31$) et l'inflammation (IL-6 ; $r=0,33$) mais aussi avec les trois paramètres d'atteinte liée au stress oxydant : corrélations

faibles avec les concentrations de 8-OHdG (r=0,28) et de 8-isoprostane (r=0,26), mais corrélation forte avec la concentration de protéines carbonylées (r=0,67). Par ailleurs, les paramètres de stress oxydant présentent des corrélations faibles ou moyennes avec quelques composés chimiques, qu'il s'agisse d'éléments majeurs et traces métalliques ou de HAP. Ceci tend à illustrer la complexité des interactions entre les constituants des PM, et potentiellement l'existence d'effets additifs, synergiques et antagonistes, pouvant expliquer les résultats observés.

L'analyse en composantes principales (ACP) a permis d'observer une corrélation entre la quantité d'ERO détectées et les paramètres 8-isoprostane et protéines carbonylées, tandis que la 8-OHdG semblait être totalement décorrélée des autres paramètres de dommages liés au stress oxydant. Les résultats de classification ont permis de confirmer la capacité des fractions particulaires à induire le plus de dommages au niveau des protéines et de la membrane cellulaire.

L'échantillon SRM 1648a (principalement sa fraction particulaire mais également ses extraits hydrosolubles et organiques) apparait comme l'un des plus délétères pour les cellules BEAS-2B, vis-à-vis de la production d'ERO et des dommages oxydatifs. Ces effets peuvent êtres dus aux fortes teneurs de cet échantillon en Al, As, Cd, Cr, Co, Cu, Pb, Sr, V, Zn, et Ti, et aux fortes teneurs en naphtalène, acénaphtène, phénanthrène, fluoranthène et pyrène, comparées aux autres échantillons. Cependant, l'échantillon de $PM_{2.5\text{-}0.3}$ provenant du site de typologie industrielle, plus riche en HAP et en éléments métalliques (surtout Fe, Mn, Ni et V) s'avère le moins toxique. Ceci pourrait être expliqué par la forte teneur en Fe, et en particulier par la présence de la forme Fe_3O_4, qui aurait tendance à inhiber les effets des autres composés présents dans les particules.

Concernant la mesure du potentiel oxydant, pour le test au DTT, il n'existe pas de différence marquée entre les réponses des fractions hydrosolubles et organiques pour une même influence, confirmant la sensibilité de ce test tant à des composés hydrosolubles que des composés organosolubles. Par contre, pour le test à l'AA, ce sont les extraits hydrosolubles qui donnent des valeurs jusqu'à 10 fois plus élevées que les extraits organiques, révélant que le test à l'AA parait plus sensible aux espèces hydrosolubles. Cependant, les résultats des échantillons synthétiques montrent que les oxydes métalliques contribuent peu aux valeurs de potentiel oxydant.

Il n'a pas été trouvé de corrélation entre le potentiel oxydant (OP-AA et OP-DTT) et les réponses cellulaires, que ce soit en lien avec la réponse pro-inflammatoire ou les

dommages oxydatifs aux macromolécules biologiques, ce qui signifie que ces mesures de OP ne permettraient pas de prédire les dommages cellulaires *in vitro* que nous avons suivis dans cette étude.

Suite à la discussion de nos résultats, il faut retenir que le potentiel oxydant reste une méthode de mesure acellulaire, basée sur la consommation d'espèces anti-oxydantes. L'absence de corrélations entre le potentiel oxydant, les espèces réactives de l'oxygène et les altérations cellulaires (membrane, protéines, ADN) a montré que notre approche était insuffisante pour établir le lien entre potentiel et stress oxydant. Une approche plus globale pourrait être proposée, en considérant notamment la mobilisation du système anti-oxydant dans la réponse cellulaire. Celle-ci pourrait permettre de mieux appréhender l'apport de la mesure du potentiel oxydant dans la compréhension des effets des PM en lien avec le stress oxydant cellulaire.

Conclusion générale

Conclusion générale et perspectives

Les objectifs principaux de ce travail étaient d'étudier le potentiel oxydant des PM en fonction de leur composition chimique et de leurs sources d'émission, et d'évaluer le stress oxydant induit lors de l'exposition de cellules épithéliales bronchiques BEAS-2B aux PM en recherchant le lien entre composition chimique, fractions considérées et effets observés. Au terme de ces recherches, une analyse du lien entre le potentiel oxydant et le stress oxydant a été proposée et discutée.

Etude du potentiel oxydant

Pour parvenir à remplir ces objectifs, dans un premier temps, nous avons sélectionné différents échantillons (n=57) de $PM_{2,5}$ prélevés sur un site urbain sous influence industrielle, situé à Dunkerque. Les échantillons ont été considérés pour étudier leur potentiel oxydant, à partir d'extraits préparés dans le fluide pulmonaire synthétique (solution de Gamble) et en réalisant deux tests complémentaires : le test à l'acide ascorbique (AA) et celui utilisant le dithiothréitol (DTT). Ces tests en version microplaques ont été développés pour la première fois au laboratoire UCEiV dans le cadre de ce travail de thèse.

Les concentrations des $PM_{2,5}$, celles de certains constituants des $PM_{2,5}$ et les contributions de sources de $PM_{2,5}$ se sont révélées être corrélées avec les valeurs de OP (AA ou DTT) (Chapitre 3). Il a été trouvé que le potentiel oxydant normalisé au volume OP-DTTv était fortement corrélé avec de nombreuses espèces chimiques Ag, Al, As, Ba, Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mn, Ni, Pb, Rb, Sb, Sn, Zn, NO_3^- et TC ($r > 0,6$), et très fortement corrélés avec les éléments Cu, Cd, et Sn ($r > 0,8$). En parallèle, il a été trouvé que OP-AAv était fortement corrélé avec As, Ba, Cu, Na, Pb, Sb, Sn et TC.

Grâce aux données des contributions de sources obtenues par l'application d'un modèle source-récepteur (CW-NMF), il a été possible d'aller plus loin et de relier le potentiel à des sources de particules. De fortes corrélations ont été obtenues entre OP-DTTv et la contribution des sources « Trafic hors échappement », « Nitrates secondaires », « Emissions diffuses du site sidérurgique », « Cheminées d'agglomération de minerais du site sidérurgique », et « Aciérie électrique ». OP-AAv s'est avéré fortement corrélé avec la source « Trafic hors échappement » ($r=0,66$). La comparaison des représentations polaires de potentiel oxydant

avec celles des contributions de sources a permis de montrer que OP-AAv était clairement lié aux concentrations de $PM_{2,5}$ et aux sources de combustion. OP-DTTv a été quant à lui clairement relié à des sources émettant des métaux, dans notre cas, les émissions du site sidérurgique intégré, celles provenant d'une aciérie électrique et la combustion de fioul lourd, sans exclure les autres sources de combustion. L'utilisation du modèle de concentrations pondérées sur les trajectoires (CWT) a indiqué que le transport à longue distance est également un paramètre à prendre en compte lors de l'interprétation des données de potentiel oxydant. En effet, non seulement la partie nord de la France, mais aussi l'Allemagne, la Belgique et les Pays-Bas ont été identifiés comme des régions sources de $PM_{2,5}$ à forte valeur de OP

Etude du stress oxydant

Le stress oxydant a été évalué par la capacité des particules à induire la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), à engendrer des altérations membranaires (8-isoprostane), aux protéines (protéines carbonylées) et/ou à l'ADN (8-hydroxydéoxyguanosine) sur des cellules épithéliales bronchiques humaines BEAS-2B. Plusieurs méthodes statistiques (ACP, classification, coefficients de corrélation) ont été utilisées afin de mieux comprendre la relation entre stress oxydant et les caractéristiques physico-chimiques des particules et le rôle de leurs différentes fractions.

Pour répondre à cette question, nous avons tout d'abord sélectionné des $PM_{2,5\text{-}0,3}$ collectées sous différentes influences (urbaine, trafic routier et industrielle) et à différentes saisons (printemps, été, automne, hiver et échantillon annuel) au niveau du site urbain. Différentes fractions ont été préparées à partir de ces échantillons : fraction hydrosoluble, fraction organique, PM totales, PM débarrassées de leurs fractions hydrosoluble et organique. De plus, des mélanges d'oxydes métalliques et de noir de carbone, simulant les émissions industrielles, ainsi qu'un échantillon certifié de particules urbaines SRM 1648a, ont été considérés pour cette étude.

En préalable au suivi des paramètres de stress oxydant, le test de cytotoxicité WST-1 a été réalisé afin de choisir une dose d'exposition adaptée. Ensuite, la mesure de la réponse pro-inflammatoire (IL-6) et celle du stress oxydant par la quantification des ERO et des atteintes

aux protéines, aux membranes et à l'ADN, ont été réalisées après 48 heures d'exposition des cellules aux échantillons, à la dose 24 µg/cm^2.

Il a pu être montré que toutes les fractions testées (PM, dPM, EO et Hyd) induisaient un stress oxydant. Pour autant, il est clairement apparu que les fractions particulaires PM et dPM étaient responsables d'une production plus importante d'ERO et de protéines carbonylées que les extraits organiques et hydrosolubles. Au global, il n'a pas été observé de différence significative entre les fractions de $PM_{2,5-0,3}$ pour la 8-isoprostane et la 8-OHdG. Pour autant, il a été possible de montrer le rôle de la fraction organique sur l'altération oxydative de la membrane plasmique et de l'ADN dans le cas des échantillons de $PM_{2,5-0,3}$ provenant du site urbain.

L'analyse en composantes principales (ACP) a permis d'observer une corrélation entre tous les paramètres de stress oxydant hormis la variable 8-OHdG, et que la fraction particulaire semble induire le plus de dommages au niveau de la membrane plasmique et des protéines. L'analyse de corrélation a montré que les concentrations d'ERO présentaient des corrélations avec les trois paramètres d'atteintes liées au stress oxydant (8-OHdG, 8-isoprostane et protéines carbonylées). Il a également été mis en évidence la corrélation entre la présence des éléments Al, As, Cd, Cr, Co, Cu, Pb, Sr, V, Zn, Ti, et des HAP tels que le naphtalène, acénaphtène, phénanthrène, fluoranthène et pyrène et l'induction du stress oxydant. De même, l'étude des échantillons synthétiques a permis de mettre en évidence l'effet limitant du Fe_3O_4, forme retrouvée localement dans des émissions sidérurgiques, sur le stress oxydant. Cette observation nous a permis de proposer une explication à la faible réponse cellulaire en termes de stress oxydant, pour des $PM_{2,5-0,3}$ prélevées sur le site de typologie industrielle et présentant des teneurs élevées en HAP et en éléments métalliques.

Relation entre potentiel oxydant et stress oxydant

Afin d'étudier le lien entre les données de réponse cellulaire en termes de stress oxydant, les tests AA et DDT ont été réalisés sur les fractions hydrosolubles et organiques des $PM_{2,5-0,3}$. Les réponses du test au DTT ne montrent pas de différence marquée entre les fractions hydrosolubles et organiques, suggérant que ce test était sensible autant aux composés hydrosolubles qu'aux composés organosolubles présents dans nos échantillons. Pour OP-AAm, une tendance marquée se dégage : les extraits hydrosolubles présentent des résultats 2 à

10 fois plus élevés que les extraits organiques. Ceci tend à montrer que le test AA parait plus sensible aux espèces hydrosolubles.

L'analyse de corrélation ne semble pas montrer un lien entre le potentiel oxydant et les paramètres de stress oxydant considérés dans cette étude (ERO, atteintes lipidiques et protéiques, altération oxydative à l'ADN). Ceci peut être dû au fait que les tests de potentiel oxydant DTT et AA ne rendraient pas entièrement compte du comportement de la cellule notamment lorsque celle-ci est amenée à lutter contre les ERO. Par ailleurs les cellules ont la capacité de métaboliser certains constituants des PM. Ainsi, ces derniers, peuvent ne plus avoir le même effet et les mêmes propriétés que la forme initiale, chose qui n'est pas considéré dans les tests OP. Par ailleurs, nous nous sommes intéressés à des paramètres de dommages intervenant à une étape peut être trop avancée dans la caractérisation du stress oxydant. Il aurait été intéressant de considérer la réponse anti-oxydante déclenchée en cas de déséquilibre de la balance entre les espèces oxydantes et anti-oxydantes à l'échelle cellulaire, qui intervient plus précocement.

Enfin, à l'issue de ce travail, il nous semble important de repositionner les choses. Le potentiel oxydant est désormais largement employé dans la communauté scientifique, pour compléter l'information renvoyée par la donnée de concentration atmosphérique de PM. Cette dernière étant parfois peu représentative du risque sanitaire, l'idée d'avoir un paramètre supplémentaire a émergé, celui–ci a pris la forme du potentiel oxydant. A la lumière de nos résultats obtenus sur un panel d'échantillons relativement large, il apparaît que, si les données relatives à OP peuvent compléter l'information sur la concentration de PM atmosphérique, elles ne peuvent néanmoins remplacer les mesures de paramètres cellulaires.

Perspectives

Une des limites soulevée dans cette étude porte sur le fait que notre connaissance de la composition chimique des PM n'est pas complète. Comme présenté dans ce travail, il a été fait le choix de considérer des espèces chimiques, notamment les éléments majeurs et traces métalliques de même que les hydrocarbures aromatiques, connus pour leurs effets en termes de stress oxydant. Cependant, parmi les espèces non analysées dans ce travail, il nous semblerait pertinent d'intégrer l'analyse des composés organiques hydrosolubles des $PM_{2,5\text{-}0,3}$ et $PM_{2,5}$, et en particulier identifier et quantifier les composés faisant partie de la famille des HULIS (humic-like substances) mentionnés dans la littérature pour posséder des espèces

impliquées dans des réactions redox et susceptibles de contribuer à la formation des ERO. De plus, il serait utile de quantifier les espèces métalliques dans la fraction hydrosoluble, afin de pouvoir faire le lien entre les réponses cellulaires et les composés métalliques présents dans la solution d'exposition des cellules.

L'étude de composés synthétiques a aussi permis d'apporter des éléments de compréhension de l'effet de composés seuls ou en mélange sur la réponse cellulaire. Afin de mieux comprendre les effets synergiques et antagonistes entre les métaux et/ou composés organiques, il serait intéressant d'augmenter le nombre d'échantillons synthétiques, en préparant toutes les combinaisons possibles, surtout avec le noir de carbone, et en incluant des composés individuels organiques dans ces mélanges, notamment les quinones. Pour aller plus loin, il pourrait être pertinent d'étudier également l'effet de la dose, en préparant des échantillons synthétiques avec différentes proportions massiques des composés. Ces approches seraient non seulement intéressantes pour l'évaluation des effets cellulaires, mais aussi dans le cadre de la mesure du potentiel oxydant. La modélisation des effets serait alors nécessaire pour mieux comprendre et déterminer le rôle des constituants dans un cocktail de composés. Même s'il demeure intéressant d'étudier les fractions bioaccessibles, des mesures en considérant aussi la fraction particulaire pourraient permettre de prendre en compte la contribution cette fraction sur le potentiel oxydant.

Enfin, le manque de corrélation entre le potentiel oxydant et les paramètres de stress oxydant (ERO, protéines carbonylées, 8-isoprostane et 8-OHdG) a révélé que notre approche était insuffisante pour comprendre l'apport d'une donnée a-cellulaire dans le comportement de la cellule en termes de stress oxydant après exposition à des particules fines. Comme mentionné ci-dessus, l'approche suivie dans ce travail n'a pas pris en compte la réponse anti-oxydante de la cellule. Par conséquent, il serait intéressant d'étudier le système de défense anti-oxydant tant sous sa forme non enzymatique, avec la mesure de la vitamine E, ou du GSH, que le volet dans lequel sont impliquées de nombreuses enzymes, telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx) et l'hème oxygénase.

Références

Abbas, I. *et al.* (2019) 'In vitro evaluation of organic extractable matter from ambient $PM_{2.5}$ using human bronchial epithelial BEAS-2B cells: Cytotoxicity, oxidative stress, pro-inflammatory response, genotoxicity, and cell cycle deregulation', *Environmental Research*, 171, pp. 510–522. doi: 10.1016/j.envres.2019.01.052.

Abrams, J. Y. *et al.* (2017) 'Associations between Ambient Fine Particulate Oxidative Potential and Cardiorespiratory Emergency Department Visits', *Environmental Health Perspectives*, 125(10). doi: 10.1289/EHP1545.

Akagawa, M. (2020) 'Protein carbonylation: molecular mechanisms, biological implications, and analytical approaches', *Free Radical Research*, 0(ja), pp. 1–37. doi: 10.1080/10715762.2020.1851027.

Al Hanai, A. H. *et al.* (2019) 'Seasonal variations in the oxidative stress and inflammatory potential of $PM_{2.5}$ in Tehran using an alveolar macrophage model; The role of chemical composition and sources', *Environment International*, 123, pp. 417–427. doi: 10.1016/j.envint.2018.12.023.

Alharbi, B., Shareef, M. M. and Husain, T. (2015) 'Study of chemical characteristics of particulate matter concentrations in Riyadh, Saudi Arabia', *Atmospheric Pollution Research*, 6(1), pp. 88–98. doi: 10.5094/APR.2015.011.

Alraddadi, S. (2020) 'Surface and thermal properties of fine black and white volcanic ash', *Materials Today: Proceedings*. doi: 10.1016/j.matpr.2020.02.429.

Amann, M. *et al.* (2017) *MEASURES TO ADDRESS AIR POLLUTION FROM AGRICULTURAL SOURCES*. International Institute for Applied Systems Analysis (IIASA).

Ambrogio, M. *et al.* (2002) 'On the generation of aerosol for diesel particulate filtration studies', *Separation and Purification Technology*, 27(3), pp. 195–209. doi: 10.1016/S1383-5866(01)00182-4.

An, J. *et al.* (2011) 'The combined effects of BDE47 and BaP on oxidatively generated DNA damage in L02 cells and the possible molecular mechanism', *Mutation Research*, 721(2), pp. 192–198. doi: 10.1016/j.mrgentox.2011.02.002.

ANSES (2014) *Environnement-Santé-Travail: « Biomarqueurs de toxicité de la pollution atmosphérique particulaire influencés par l'âge, PACATOX »(2015-2017).*

ANSES (2016) *Environnement-Santé-Travail: 'Impact des $PM_{2.5}$ variant selon leur source (Trafic routier - Industries) sur la santé respiratoire. Approche in vitro (TRIPLER)'.*

Arnhold, J. (2020) 'Chapter 5 - Mechanisms of Cell Death', in Arnhold, J. (ed.) *Cell and Tissue Destruction*. Academic Press, pp. 135–153. doi: 10.1016/B978-0-12-816388-7.00005-X.

Badding, M. A. *et al.* (2014) 'A Comparison of Cytotoxicity and Oxidative Stress from Welding Fumes Generated with a New Nickel-, Copper-Based Consumable versus Mild and Stainless Steel-Based Welding in RAW 264.7 Mouse Macrophages', *PLOS ONE*, 9(6), p. e101310. doi: 10.1371/journal.pone.0101310.

Badran, G., Ledoux, F., *et al.* (2020) 'Toxicity of fine and quasi-ultrafine particles: Focus on the effects of organic extractable and non-extractable matter fractions', *Chemosphere*, 243, p. 125440. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.125440.

Badran, G., Verdin, A., *et al.* (2020) 'Toxicological appraisal of the chemical fractions of ambient fine ($PM_{2.5-0.3}$) and quasi-ultrafine ($PM_{0.3}$) particles in human bronchial epithelial BEAS-2B cells', *Environmental Pollution*, 263, p. 114620. doi: 10.1016/j.envpol.2020.114620.

Baduel, C., Voisin, D. and J.-L, J. (2010) 'Seasonal variations of concentrations and optical properties of water soluble HULIS collected in urban environments', *Atmospheric Chemistry and Physics*, 10. doi: 10.5194/acp-10-4085-2010.

Bai, K.-J. *et al.* (2019) 'Microglial activation and inflammation caused by traffic-related particulate matter', *Chemico-Biological Interactions*, 311, p. 108762. doi: 10.1016/j.cbi.2019.108762.

Baker, M. A., Cerniglia, G. J. and Zaman, A. (1990) 'Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples', *Analytical Biochemistry*, 190(2), pp. 360–365. doi: 10.1016/0003-2697(90)90208-q.

Balakrishnan, K. *et al.* (2019) 'The impact of air pollution on deaths, disease burden, and life expectancy across the states of India: the Global Burden of Disease Study 2017', *The Lancet Planetary Health*, 3(1), pp. e26–e39. doi: 10.1016/S2542-5196(18)30261-4.

Balbin Villaverde, A. I., Netherton, J. and Baker (2019) 'From Past to Present: The Link Between Reactive Oxygen Species in Sperm and Male Infertility', *Antioxidants*, 8, p. 616. doi: 10.3390/antiox8120616.

Barnes, J. *et al.* (2018) 'Carcinogens and DNA damage', *Biochemical Society Transactions*, 46, p. BST20180519. doi: 10.1042/BST20180519.

Barraza, F. (2017) *Human exposure assessment related to oil activities in Ecuador: from the air quality monitoring to the study of metallic contaminants transfer in the soil-plant continuum*.

Bates, J. T. *et al.* (2019) 'Review of Acellular Assays of Ambient Particulate Matter Oxidative Potential: Methods and Relationships with Composition, Sources, and Health Effects', *Environmental Science & Technology*, 53(8), pp. 4003–4019. doi: 10.1021/acs.est.8b03430.

Bauer, H. *et al.* (2008) 'Arabitol and mannitol as tracers for the quantification of airborne fungal spores', *Atmospheric Environment*.

Bautista, A. T. *et al.* (2014) 'Carbonaceous particulate matter characterization in an urban and a rural site in the Philippines', *Atmospheric Pollution Research*, 5(2), pp. 245–252. doi: 10.5094/APR.2014.030.

Belis, C. A. *et al.* (2013) 'Critical review and meta-analysis of ambient particulate matter source apportionment using receptor models in Europe', *Atmospheric Environment*, 69, pp. 94–108. doi: 10.1016/j.atmosenv.2012.11.009.

Benbrahim-Tallaa, L. *et al.* (2012) 'Carcinogenicity of diesel-engine and gasoline-engine exhausts and some nitroarenes', *The Lancet. Oncology*, 13(7), pp. 663–664. doi: 10.1016/s1470-2045(12)70280-2.

Bernatsky, S. *et al.* (2016) 'Fine particulate air pollution and systemic autoimmune rheumatic disease in two Canadian provinces', *Environmental Research*, 146, pp. 85–91. doi: 10.1016/j.envres.2015.12.021.

Bhaskaran, K. *et al.* (2011) 'The effects of hourly differences in air pollution on the risk of myocardial infarction: case crossover analysis of the MINAP database.', *BMJ (Clinical Research ed.)*, 343, pp. d5531–d5531. doi: 10.1136/bmj.d5531.

Bhattacharya, K. *et al.* (2009) 'Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress and DNA-adduct formation but not DNA-breakage in human lung cells', *Particle and Fibre Toxicology*, 6, p. 17. doi: 10.1186/1743-8977-6-17.

Billet, S. *et al.* (2007) 'Ambient particulate matter ($PM_{2.5}$): physicochemical characterization and metabolic activation of the organic fraction in human lung epithelial cells (A549)', *Environmental Research*, 105(2), pp. 212–223. doi: 10.1016/j.envres.2007.03.001.

Billet, S. *et al.* (2018) 'Chemical characterization of fine and ultrafine PM, direct and indirect genotoxicity of PM and their organic extracts on pulmonary cells', *Journal of Environmental Sciences (China)*, 71, pp. 168–178. doi: 10.1016/j.jes.2018.04.022.

Blanchard, D. C. and Woodcock, A. H. (1980) *Production, Concentration, and Vertical Distribution of the SeaSalt Aerosol*. N.Y.

Bocchi, C. *et al.* (2019) 'Characterization of urban aerosol: Seasonal variation of genotoxicity of the water-soluble portion of PM2.5 and PM1', *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 841, pp. 23–30. doi: 10.1016/j.mrgentox.2019.04.005.

Bode, A. M., Cunningham, L. and Rose, R. C. (1990) 'Spontaneous decay of oxidized ascorbic acid (dehydro-L-ascorbic acid) evaluated by high-pressure liquid chromatography.', *Clinical Chemistry*, 36(10), pp. 1807–1809.

Bogunia-Kubik, K. and Sugisaka, M. (2002) 'From molecular biology to nanotechnology and nanomedicine', *Bio Systems*, 65(2–3), pp. 123–138. doi: 10.1016/s0303-2647(02)00010-2.

Bolton, J. L. and Dunlap, T. (2017) 'Formation and Biological Targets of Quinones: Cytotoxic versus Cytoprotective Effects', *Chemical Research in Toxicology*, 30(1), pp. 13–37. doi: 10.1021/acs.chemrestox.6b00256.

Borgie, M. *et al.* (2015) 'Genotoxic and epigenotoxic effects of fine particulate matter from rural and urban sites in Lebanon on human bronchial epithelial cells', *Environmental Research*, 136, pp. 352–362. doi: 10.1016/j.envres.2014.10.010.

Borm, P. J. A. *et al.* (2007) 'Oxidant generation by particulate matter: from biologically effective dose to a promising, novel metric', *Occupational and Environmental Medicine*, 64(2), pp. 73–74. doi: 10.1136/oem.2006.029090.

Boublil, L. *et al.* (2013) 'Development of a repeated exposure protocol of human bronchial epithelium in vitro to study the long-term effects of atmospheric particles', *Toxicology in Vitro*, 27(2), pp. 533–542. doi: 10.1016/j.tiv.2012.11.008.

Bourdrel, T. *et al.* (2017) 'Cardiovascular effects of air pollution', *Archives of Cardiovascular Diseases*, 110(11), pp. 634–642. doi: 10.1016/j.acvd.2017.05.003.

Boyman, L. *et al.* (2019) 'Dynamics of the mitochondrial permeability transition pore: Transient and permanent opening events', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 666, pp. 31–39. doi: 10.1016/j.abb.2019.03.016.

Buoli, M. *et al.* (2018) 'Is there a link between air pollution and mental disorders?', *Environment International*, 118, pp. 154–168. doi: 10.1016/j.envint.2018.05.044.

Byambaa, B. *et al.* (2019) 'Sources and Characteristics of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Ambient Total Suspended Particles in Ulaanbaatar City, Mongolia', *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(3). doi: 10.3390/ijerph16030442.

Caboche, J. *et al.* (2011) 'Development of an in vitro method to estimate lung bioaccessibility of metals from atmospheric particles', *Journal of environmental monitoring*, 13(3), pp. 621–630. doi: 10.1039/c0em00439a.

Cachon, B. F. *et al.* (2014) 'Proinflammatory effects and oxidative stress within human bronchial epithelial cells exposed to atmospheric particulate matter ($PM_{(2.5)}$ and $PM_{(>2.5)}$) collected from Cotonou, Benin', *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 185, pp. 340–351. doi: 10.1016/j.envpol.2013.10.026.

Cai, Z. and Yan, L.-J. (2013) 'Protein Oxidative Modifications: Beneficial Roles in Disease and Health', *Journal of biochemical and pharmacological research*, 1(1), pp. 15–26.

Çakmak, G. *et al.* (2019) 'Investigation of spatial and temporal variation of particulate matter in vitro genotoxicity and cytotoxicity in relation to the elemental composition', *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 842, pp. 22–34. doi: 10.1016/j.mrgentox.2019.01.009.

Calas, A. *et al.* (2017) 'The importance of simulated lung fluid (SLF) extractions for a more relevant evaluation of the oxidative potential of particulate matter', *Scientific Reports*, 7(1), p. 11617. doi: 10.1038/s41598-017-11979-3.

Calas, A. *et al.* (2018) 'Comparison between five acellular oxidative potential measurement assays performed with detailed chemistry on PM_{10} samples from the city of Chamonix (France)', *Atmospheric Chemistry and Physics*, 18(11), pp. 7863–7875. doi: https://doi.org/10.5194/acp-18-7863-2018.

Calas, A. *et al.* (2019) 'Seasonal Variations and Chemical Predictors of Oxidative Potential (OP) of Particulate Matter (PM), for Seven Urban French Sites', *Atmosphere*, 10(11), p. 698. doi: 10.3390/atmos10110698.

Cangemi, M. *et al.* (2017) 'Potentially harmful elements released by volcanic ashes: Examples from the Mediterranean area', *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, 337, pp. 16–28. doi: 10.1016/j.jvolgeores.2017.03.015.

Cantin, A. M. *et al.* (1987) 'Normal alveolar epithelial lining fluid contains high levels of glutathione', *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, 63(1), pp. 152–157. doi: 10.1152/jappl.1987.63.1.152.

Cao, C. *et al.* (2014) 'Inhalable Microorganisms in Beijing's $PM_{2.5}$ and PM_{10} Pollutants during a Severe Smog Event', *Environmental Science & Technology*, 48(3), pp. 1499–1507. doi: 10.1021/es4048472.

Cao, X. *et al.* (2021) 'Cadmium induced BEAS-2B cells apoptosis and mitochondria damage via MAPK signaling pathway', *Chemosphere*, 263, p. 128346. doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.128346.

Carlton, A. G., Wiedinmyer, C. and Kroll, J. H. (2009) 'A review of Secondary Organic Aerosol (SOA) formation from isoprene', *Atmospheric Chemistry and Physics*, 9(14), pp. 4987–5005. doi: https://doi.org/10.5194/acp-9-4987-2009.

Carslaw, D. (2019) *The openair manual - open-source tools for analysing air pollution data.* Manual for version 2.6-6. University of York, p. 229.

Carslaw, D. C. *et al.* (2006) 'Detecting and quantifying aircraft and other on-airport contributions to ambient nitrogen oxides in the vicinity of a large international airport', *Atmospheric Environment*, 40(28), pp. 5424–5434. doi: 10.1016/j.atmosenv.2006.04.062.

Carslaw, D. C. and Ropkins, K. (2012) 'openair — An R package for air quality data analysis', *Environmental Modelling & Software*, 27–28, pp. 52–61. doi: 10.1016/j.envsoft.2011.09.008.

Castegna, A. *et al.* (2003) 'Protein Carbonyl Levels—An Assessment of Protein Oxidation', in, pp. 161–168. doi: 10.1385/1-59259-424-7:161.

Cesaroni, G. *et al.* (2014) 'Long term exposure to ambient air pollution and incidence of acute coronary events: prospective cohort study and meta-analysis in 11 European cohorts from the ESCAPE Project', *BMJ (Clinical research ed.)*, 348, p. f7412. doi: 10.1136/bmj.f7412.

Chafe, Z. *et al.* (2015) *Residential heating with wood and coal: health impacts and policy options in Europe and North America*.

Charpin, D. *et al.* (2016) 'La pollution atmosphérique et ses effets sur la santé respiratoire. Document d'experts du groupe pathologies pulmonaires professionnelles environnementales et iatrogéniques (PAPPEI) de la Société de pneumologie de langue française (SPLF)', *Revue des Maladies Respiratoires*, 33(6), pp. 484–508. doi: 10.1016/j.rmr.2016.04.002.

Charrier, J. G. and Anastasio, C. (2012) 'On dithiothreitol (DTT) as a measure of oxidative potential for ambient particles: evidence for the importance of soluble transition metals', *Atmospheric Chemistry and Physics*, 12(5), pp. 11317–11350. doi: 10.5194/acpd-12-11317-2012.

Chen, C. *et al.* (2018) 'Ambient air pollution and daily hospital admissions for mental disorders in Shanghai, China', *The Science of the Total Environment*, 613–614, pp. 324–330. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.09.098.

Chen, L. C. and Lippmann, M. (2009) 'Effects of metals within ambient air particulate matter (PM) on human health', *Inhalation Toxicology*, 21(1), pp. 1–31. doi: 10.1080/08958370802105405.

Chen, P.-Y. *et al.* (2020) 'Associations between Levels of Urinary Oxidative Stress of 8-OHdG and Risk of Atopic Diseases in Children', *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(21), p. 8207. doi: 10.3390/ijerph17218207.

Cheng, I. *et al.* (2013) 'Concentration-weighted trajectory approach to identifying potential sources of speciated atmospheric mercury at an urban coastal site in Nova Scotia, Canada', *Atmospheric Chemistry and Physics*, 13(12), pp. 6031–6048. doi: https://doi.org/10.5194/acp-13-6031-2013.

Cherian, D. A. *et al.* (2019) 'Malondialdehyde as a Marker of Oxidative Stress in Periodontitis Patients', *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 11(Suppl 2), pp. S297–S300. doi: 10.4103/JPBS.JPBS_17_19.

Chirizzi, D. *et al.* (2017) 'Influence of Saharan dust outbreaks and carbon content on oxidative potential of water-soluble fractions of $PM_{2.5}$ and PM_{10}', *Atmospheric Environment*, 163. doi: 10.1016/j.atmosenv.2017.05.021.

Chowdhury, P. H. *et al.* (2018) 'Aqueous and organic extract of $PM_{2.5}$ collected in different seasons and cities of Japan differently affect respiratory and immune systems', *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 235, pp. 223–234. doi: 10.1016/j.envpol.2017.12.040.

Christoffersen, T. S. *et al.* (1998) 'cis-pinic acid, a possible precursor for organic aerosol formation from ozonolysis of α-pinene', *Atmospheric Environment*, 32(10), pp. 1657–1661. doi: 10.1016/S1352-2310(97)00448-2.

Code de l'environnement - Article L220-2 (2010) *Code de l'environnement*.

Colombo, C., Monhemius, A. J. and Plant, J. A. (2008) 'Platinum, palladium and rhodium release from vehicle exhaust catalysts and road dust exposed to simulated lung fluids', *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71(3), pp. 722–730. doi: 10.1016/j.ecoenv.2007.11.011.

Commoner, B., Townsend, J. and Pake, G. E. (1954) 'Free Radicals in Biological Materials', *Nature*, 174(4432), pp. 689–691. doi: 10.1038/174689a0.

Conte, E. *et al.* (2017) 'Oxidative Potential of Selected PM Components', *Proceedings*, 1(5), p. 108. doi: 10.3390/ecas2017-04131.

Cooke, M. S. *et al.* (2003) 'Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease', *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(10), pp. 1195–1214. doi: 10.1096/fj.02-0752rev.

Costa, A., Macedonio, G. and Folch, A. (2006) 'A three-dimensional Eulerian model for transport and deposition of volcanic ashes', *Earth and Planetary Science Letters*, 241(3), pp. 634–647. doi: 10.1016/j.epsl.2005.11.019.

Courcot, D. *et al.* (2009) 'Composition and textural properties of soot and study of their oxidative elimination by catalytic process', *International Journal of Environment and Pollution*, 39(3–4), pp. 253–263. doi: 10.1504/IJEP.2009.028689.

Crenn, V. *et al.* (2017) 'Fine particles sampled at an urban background site and an industrialized coastal site in Northern France — Part 1: Seasonal variations and chemical characterization', *Science of The Total Environment*, 578, pp. 203–218. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.11.165.

Crobeddu, B. *et al.* (2017) 'Oxidative potential of particulate matter $_{2.5}$ as predictive indicator of cellular stress', *Environmental Pollution*, 230, pp. 125–133. doi: 10.1016/j.envpol.2017.06.051.

Crobeddu, B. *et al.* (2020) 'Lung Antioxidant Depletion: A Predictive Indicator of Cellular Stress Induced by Ambient Fine Particles', *Environmental Science & Technology*, 54(4), pp. 2360–2369. doi: 10.1021/acs.est.9b05990.

Cui, L. *et al.* (2013) 'Comparative Analysis of Four Oxidized Guanine Lesions from Reactions of DNA with Peroxynitrite, Singlet Oxygen, and γ-Radiation', *Chemical Research in Toxicology*, 26(2), pp. 195–202. doi: 10.1021/tx300294d.

Cui, Y., Chen, G. and Yang, Z. (2020) 'Mitochondrial superoxide mediates $PM_{2.5}$-induced cytotoxicity in human pulmonary lymphatic endothelial cells', *Environmental Pollution*, 263, p. 114423. doi: 10.1016/j.envpol.2020.114423.

Cusack, M. *et al.* (2013) 'Source apportionment of fine PM and sub-micron particle number concentrations at a regional background site in the western Mediterranean: a 2.5 year study', *Atmospheric Chemistry and Physics*, 13(10), pp. 5173–5187. doi: https://doi.org/10.5194/acp-13-5173-2013.

Daellenbach, K. R. *et al.* (2020) 'Sources of particulate-matter air pollution and its oxidative potential in Europe', *Nature*, 587(7834), pp. 414–419. doi: 10.1038/s41586-020-2902-8.

Damodaran, S. (1985) 'Estimation of disulfide bonds using 2-nitro-5-thiosulfobenzoic acid: limitations', *Analytical Biochemistry*, 145(1), pp. 200–204.

Danielsen, P. H. *et al.* (2010) 'Oxidative stress, inflammation, and DNA damage in rats after intratracheal instillation or oral exposure to ambient air and wood smoke particulate matter', *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 118(2), pp. 574–585. doi: 10.1093/toxsci/kfq290.

Danielsen, P. H. *et al.* (2011) 'Oxidative stress, DNA damage, and inflammation induced by ambient air and wood smoke particulate matter in human A549 and THP-1 cell lines', *Chemical Research in Toxicology*, 24(2), pp. 168–184. doi: 10.1021/tx100407m.

Das, A. *et al.* (2021) 'Reactive oxygen species production and inflammatory effects of ambient $PM_{2.5}$ -associated metals on human lung epithelial A549 cells "one year-long study": The Delhi chapter', *Chemosphere*, 262, p. 128305. doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.128305.

Delfino, R. J. *et al.* (2013) 'Airway inflammation and oxidative potential of air pollutant particles in a pediatric asthma panel', *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology*, 23(5), pp. 466–473. doi: 10.1038/jes.2013.25.

Delmas, R., Mégie, G. and Peuch, V. (2007) *Physique et chimie de l'atmosphère* -. Belin. Available at: https://www.eyrolles.com/Sciences/Livre/physique-et-chimie-de-l-atmosphere-9782701137001/ (Accessed: 26 March 2020).

Dergham, M. *et al.* (2012) 'Prooxidant and proinflammatory potency of air pollution particulate matter ($PM_{2.5-0.3}$) produced in rural, urban, or industrial surroundings in human bronchial epithelial cells (BEAS-2B)', *Chemical Research in Toxicology*, 25(4), pp. 904–919. doi: 10.1021/tx200529v.

Dergham, M. *et al.* (2015) 'Temporal–spatial variations of the physicochemical characteristics of air pollution Particulate Matter ($PM_{2.5-0.3}$) and toxicological effects in human bronchial epithelial cells (BEAS-2B)', *Environmental Research*, 137, pp. 256–267. doi: 10.1016/j.envres.2014.12.015.

Deshmukh, D. K., Kawamura, K. and Deb, M. K. (2016) 'Dicarboxylic acids, ω-oxocarboxylic acids, α-dicarbonyls, WSOC, OC, EC, and inorganic ions in wintertime size-segregated aerosols from central India: Sources and formation processes', *Chemosphere*, 161, pp. 27–42. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.06.107.

D'Evelyn, S. M. *et al.* (2021) 'Differential inflammatory potential of particulate matter (PM) size fractions from imperial valley, CA', *Atmospheric Environment*, 244, p. 117992. doi: 10.1016/j.atmosenv.2020.117992.

Di, Q. *et al.* (2017) 'Air Pollution and Mortality in the Medicare Population', *The New England Journal of Medicine*, 376(26), pp. 2513–2522. doi: 10.1056/NEJMoa1702747.

Dieme, D. *et al.* (2012) 'Relationship between physicochemical characterization and toxicity of fine particulate matter ($PM_{2.5}$) collected in Dakar city (Senegal)', *Environmental Research*, 113, pp. 1–13. doi: 10.1016/j.envres.2011.11.009.

Dimitriou, K. *et al.* (2015) 'Spatial distribution of source areas of $PM_{2.5}$ by Concentration Weighted Trajectory (CWT) model applied in $PM_{2.5}$ concentration and composition data', *Atmospheric Environment*, 116, pp. 138–145. doi: 10.1016/j.atmosenv.2015.06.021.

Dong, Y. *et al.* (2019) 'Skin inflammation induced by ambient particulate matter in China', *Science of The Total Environment*, 682, pp. 364–373. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.05.155.

Dou, J. *et al.* (2015) 'Reactive Oxygen Species Production Mediated by Humic-like Substances in Atmospheric Aerosols: Enhancement Effects by Pyridine, Imidazole, and Their Derivatives', *Environmental Science & Technology*, 49(11), pp. 6457–6465. doi: 10.1021/es5059378.

Duncan, M. W. (2003) 'A review of approaches to the analysis of 3-nitrotyrosine', *Amino Acids*, 25(3), pp. 351–361. doi: 10.1007/s00726-003-0022-z.

EEA (2012) *European Environmental Agency - Air Quality in Europe*. Technical Report 4/2012. Office for Official Publications of the European Union, Luxembourg, p. 108.

Available at: https://www.eea.europa.eu/publications/air-quality-in-europe-2012 (Accessed: 17 August 2020).

EEA (2013a) *European Environmental Agency - Air Quality in Europe - 2013.* Technical Report 9/2013. Office of the European Union, Copenhagen, p. 112. Available at: https://www.eea.europa.eu/publications/air-quality-in-europe-2013 (Accessed: 10 April 2019).

EEA (2013b) *European Environmental Agency. The Impact of International Shipping on European Air Quality and Climate Forcing.* Technical Report 4/2013. Publications Office of the European Union, Luxembourg 2013, p. 84. Available at: https://www.eea.europa.eu/publications/the-impact-of-international-shipping (Accessed: 16 August 2020).

EEA (2019) *Air Quality in Europe-2019.*

Elbert, W. *et al.* (2007) 'Contribution of fungi to primary biogenic aerosols in the atmosphere: wet and dry discharged spores, carbohydrates, and inorganic ions', *Atmospheric Chemistry and Physics*, 7(17), pp. 4569–4588.

Epe, B. (2020) 'Chapter 18 - Oxidatively generated DNA base modifications: Relation to eustress and distress', in Sies, H. (ed.) *Oxidative Stress*. Academic Press, pp. 331–361. doi: 10.1016/B978-0-12-818606-0.00018-3.

E-PRTR (2011) 'The European Pollutant Release and Transfer Register. European Environment Agency.' Available at: http://prtr.ec.europa.eu.

Eyer, P. *et al.* (2003) 'Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment', *Analytical Biochemistry*, 312(2), pp. 224–227.

Fang, T. *et al.* (2016) 'Oxidative potential of ambient water-soluble $PM_{2.5}$ in the southeastern United States: contrasts in sources and health associations between ascorbic acid (AA) and dithiothreitol (DTT) assays', *Atmospheric Chemistry and Physics*, 16(6), pp. 3865–3879. doi: https://doi.org/10.5194/acp-16-3865-2016.

Fang, Y. *et al.* (2020) 'Activation of the ROS/HO-1/NQO1 signaling pathway contributes to the Cu-induced oxidative stress and autophagy in duck renal tubular epithelial cells', *Science of The Total Environment*, p. 143753. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.143753.

Favez, O. *et al.* (2012) 'Caractéristiques et origines principales des épisodes de pollution hivernaux aux $PM_{2.5}$ en France', *Pollution Atmosphérique : climat, santé, société*, (SpÃ\copyrightcial Novembre), pp. 163–181.

Feigin, V. L. *et al.* (2016) 'Global burden of stroke and risk factors in 188 countries, during 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013', *The Lancet Neurology*, 15(9), pp. 913–924. doi: 10.1016/S1474-4422(16)30073-4.

Fenech, S. *et al.* (2019) 'Meteorological drivers and mortality associated with O_3 and $PM_{2.5}$ air pollution episodes in the UK in 2006', *Atmospheric Environment*, 213, pp. 699–710. doi: 10.1016/j.atmosenv.2019.06.030.

Feng, L. *et al.* (2017) 'Insight into Generation and Evolution of Sea-Salt Aerosols from Field Measurements in Diversified Marine and Coastal Atmospheres', *Scientific Reports*, 7, p. 41260. doi: 10.1038/srep41260.

Fischer, P. H. *et al.* (2020) 'Particulate air pollution from different sources and mortality in 7.5 million adults — The Dutch Environmental Longitudinal Study (DUELS)', *Science of The Total Environment*, 705, p. 135778. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.135778.

Flores, R. M. *et al.* (2017) 'The effect of mineral dust transport on PM_{10} concentrations and physical properties in Istanbul during 2007–2014', *Atmospheric Research*, 197, pp. 342–355. doi: 10.1016/j.atmosres.2017.07.009.

Fortoul, T. I. *et al.* (2015) 'Health Effects of Metals in Particulate Matter', *Current Air Quality Issues*, p. 654. doi: 10.5772/59749.

Fox, J. R. *et al.* (2015) 'Chemical characterization and in vitro toxicity of diesel exhaust particulate matter generated under varying conditions', *Air Quality, Atmosphere, & Health*, 8(5), pp. 507–519. doi: 10.1007/s11869-014-0301-8.

Freedman, M. A., Ott, E.-J. E. and Marak, K. E. (2019) 'Role of pH in Aerosol Processes and Measurement Challenges', *The Journal of Physical Chemistry A*, 123(7), pp. 1275–1284. doi: 10.1021/acs.jpca.8b10676.

Fuller, G. W. *et al.* (2014) 'Contribution of wood burning to PM_{10} in London', *Atmospheric Environment*, 87, pp. 87–94. doi: 10.1016/j.atmosenv.2013.12.037.

Gali, N. K. *et al.* (2019) 'Diurnal trends in redox characteristics of water-soluble and -insoluble PM components', *Environmental Pollution*, 254, p. 112841. doi: 10.1016/j.envpol.2019.07.009.

Gao, D., Ripley, S., *et al.* (2020) 'Ambient particulate matter oxidative potential: Chemical determinants, associated health effects, and strategies for risk management', *Free Radical Biology and Medicine*, 151, pp. 7–25. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.04.028.

Gao, D., Godri Pollitt, K. J., *et al.* (2020) 'Characterization and comparison of $PM_{2.5}$ oxidative potential assessed by two acellular assays', *Atmospheric Chemistry and Physics*, 20(9), pp. 5197–5210. doi: https://doi.org/10.5194/acp-20-5197-2020.

Gao, X.-H. *et al.* (2009) 'Methods for Analysis of Protein Glutathionylation and their Application to Photosynthetic Organisms', *Molecular Plant*, 2(2), pp. 218–235. doi: 10.1093/mp/ssn072.

Genc, S. *et al.* (2012) *The Adverse Effects of Air Pollution on the Nervous System*, *Journal of Toxicology*. doi: 10.1155/2012/782462.

Gerlofs-Nijland, M. E. *et al.* (2013) 'Cell toxicity and oxidative potential of engine exhaust particles: impact of using particulate filter or biodiesel fuel blend', *Environmental Science & Technology*, 47(11), pp. 5931–5938. doi: 10.1021/es305330y.

Ghio, A. J. *et al.* (2015) 'Wood Smoke Particle Sequesters Cell Iron to Impact a Biological Effect', *Chemical Research in Toxicology*, 28(11), pp. 2104–2111. doi: 10.1021/acs.chemrestox.5b00270.

Gietl, J. *et al.* (2010) 'Identification of Brake Wear Particles and Derivation of a Quantitative Tracer for Brake Dust at a Major Road', *Atmospheric Environment*, 44, pp. 141–146. doi: 10.1016/j.atmosenv.2009.10.016.

Gogna, P. *et al.* (2019) 'Estimates of the current and future burden of lung cancer attributable to $PM_{2.5}$ in Canada', *Preventive Medicine*, 122, pp. 91–99. doi: 10.1016/j.ypmed.2019.03.010.

Gogou, A. *et al.* (1996) 'Organic aerosols in Eastern Mediterranean: components source reconciliation by using molecular markers and atmospheric back trajectories', *Organic Geochemistry*, 25(1), pp. 79–96. doi: 10.1016/S0146-6380(96)00105-2.

Goiffon, R. J., Martinez, S. C. and Piwnica-Worms, D. (2015) 'A rapid bioluminescence assay for measuring myeloperoxidase activity in human plasma', *Nature Communications*, 6(1), pp. 1–9. doi: 10.1038/ncomms7271.

Golly, B. *et al.* (2019) 'Organic markers and OC source apportionment for seasonal variations of $PM_{2.5}$ at 5 rural sites in France', *Atmospheric Environment*, 198, pp. 142–157. doi: 10.1016/j.atmosenv.2018.10.027.

Gonzalez, D. H. *et al.* (2017) 'HULIS Enhancement of Hydroxyl Radical Formation from Fe(II): Kinetics of Fulvic Acid–Fe(II) Complexes in the Presence of Lung Antioxidants', *Environmental Science & Technology*, 51(13), pp. 7676–7685. doi: 10.1021/acs.est.7b01299.

Graber, E. R. and Rudich, Y. (2006) 'Atmospheric HULIS: How humic-like are they? A comprehensive and critical review', *Atmospheric Chemistry and Physics*, 6(3), pp. 729–753.

Graille, M. *et al.* (2020) 'Urinary 8-isoprostane as a biomarker for oxidative stress. A systematic review and meta-analysis', *Toxicology Letters*, 328, pp. 19–27. doi: 10.1016/j.toxlet.2020.04.006.

Grimsrud, P. A. *et al.* (2008) 'Oxidative Stress and Covalent Modification of Protein with Bioactive Aldehydes', *The Journal of Biological Chemistry*, 283(32), pp. 21837–21841. doi: 10.1074/jbc.R700019200.

Gualtieri, M. *et al.* (2011) 'Airborne urban particles (Milan winter-$PM_{2.5}$) cause mitotic arrest and cell death: Effects on DNA, mitochondria, AhR binding and spindle organization', *Mutation Research*, 713(1–2), pp. 18–31. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2011.05.011.

Gualtieri, M. *et al.* (2017) 'PARTICULATE MATTER PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION AND IN VITRO TOXICOLOGICAL EFFECTS', in.

Guo, H. *et al.* (2019) 'Size-resolved particle oxidative potential in the office, laboratory, and home: Evidence for the importance of water-soluble transition metals', *Environmental Pollution*, 246, pp. 704–709. doi: 10.1016/j.envpol.2018.12.094.

Gurr, J.-R. *et al.* (2005) 'Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells', *Toxicology*, 213(1–2), pp. 66–73. doi: 10.1016/j.tox.2005.05.007.

Haddad, I. E. *et al.* (2011) 'Insights into the secondary fraction of the organic aerosol in a Mediterranean urban area: Marseille', *Atmospheric Chemistry and Physics*, 11(5), pp. 2059–2079. doi: https://doi.org/10.5194/acp-11-2059-2011.

Hall, M. and Grover, P. L. (1990) 'Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Metabolism, Activation and Tumour Initiation', in Cooper, C. S. and Grover, Philip L. (eds) *Chemical Carcinogenesis and Mutagenesis I*. Berlin, Heidelberg: Springer (Handbook of Experimental Pharmacology), pp. 327–372. doi: 10.1007/978-3-642-74775-5_9.

Han, D. *et al.* (2018) 'Do volatile organic compounds (VOCs) emitted from petrochemical industries affect regional $PM_{2.5}$?', *Atmospheric Research*, 209, pp. 123–130. doi: 10.1016/j.atmosres.2018.04.002.

Happo, M. S. *et al.* (2014) 'Role of microbial and chemical composition in toxicological properties of indoor and outdoor air particulate matter', *Particle and Fibre Toxicology*, 11(1), p. 60. doi: 10.1186/s12989-014-0060-6.

Harman, D. (1956) 'Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry', *Journal of Gerontology*, 11(3), pp. 298–300. doi: 10.1093/geronj/11.3.298.

Havet, A. (2018) *Pollution de l'air extérieur, 8-isoprostane exhalé et phénotypes d'asthme chez les adultes dans l'étude EGEA*. Doctorat en Pharmacie. Université Lille 2. Available at: http://pepite.univ-lille2.fr/notice/view/UDSL2-workflow-10355 (Accessed: 24 November 2020).

He, R.-W. *et al.* (2018) 'Pro-inflammatory responses to $PM_{0.25}$ from airport and urban traffic emissions', *Science of The Total Environment*, 640–641, pp. 997–1003. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.05.382.

Hedayat, F. *et al.* (2016) 'Influence of oxygen content of the certain types of biodiesels on particulate oxidative potential', *The Science of the Total Environment*, 545–546, pp. 381–388. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.12.036.

Heliot, A. (2018) *Étude de la réponse cellulaire et des Vésicules Extracellulaires produites par des macrophages primaires exposés aux particules fines ($PM_{2.5}$).* Thèse de doctorat. Université du Littoral-Côte d'Opale.

Hendryx, M. *et al.* (2019) 'Air pollution exposures from multiple point sources and risk of incident chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma', *Environmental Research*, 179(Pt A), p. 108783. doi: 10.1016/j.envres.2019.108783.

Hernández-Pellón, A. *et al.* (2018) 'Metal(loid) bioaccessibility and inhalation risk assessment: A comparison between an urban and an industrial area', *Environmental Research*, 165, pp. 140–149. doi: 10.1016/j.envres.2018.04.014.

Hleis, D. (2010) *Evaluation de la contribution d'émissions sidérurgiques à la teneur en particules en suspension dans l'atmosphère à une échelle locale*. These de doctorat. Université du Littoral Côte d'Opale. Available at: http://www.theses.fr/2010DUNK0263 (Accessed: 22 December 2020).

Hleis, D. *et al.* (2013) 'Chemical profile identification of fugitive and confined particle emissions from an integrated iron and steelmaking plant.', *Journal of hazardous materials*, 250–251, pp. 246–255. doi: 10.1016/j.jhazmat.2013.01.080.

Ho, E. *et al.* (2013) 'Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice', *Redox Biology*, 1(1), pp. 483–491. doi: 10.1016/j.redox.2013.07.006.

Housseiny, H. A. *et al.* (2020) 'Inflammatory Gene Expression and Oxidative Stress in Human Lung Epithelial Cells Exposed to Combustion-Produced $PM_{2.5}$', *The FASEB Journal*, 34(S1), pp. 1–1. doi: https://doi.org/10.1096/fasebj.2020.34.s1.04184.

Huang, C.-C. *et al.* (2010) 'Oxidative stress, calcium homeostasis, and altered gene expression in human lung epithelial cells exposed to ZnO nanoparticles', *Toxicology in Vitro*, 24(1), pp. 45–55. doi: 10.1016/j.tiv.2009.09.007.

Huang, S.-L., Hsu, M.-K. and Chan, C.-C. (2003) 'Effects of submicrometer particle compositions on cytokine production and lipid peroxidation of human bronchial epithelial cells', *Environmental Health Perspectives*, 111(4), pp. 478–482. doi: 10.1289/ehp.5519.

Huang, W. *et al.* (2020) 'The cytotoxicity and genotoxicity of $PM_{2.5}$ during a snowfall event in different functional areas of a megacity', *Science of The Total Environment*, 741, p. 140267. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.140267.

Hudda, N. *et al.* (2014) 'Emissions from an International Airport Increase Particle Number Concentrations 4-fold at 10 km Downwind', *Environmental Science & Technology*, 48(12), pp. 6628–6635. doi: 10.1021/es5001566.

Hudda, N. and Fruin, S. A. (2016) 'International Airport Impacts to Air Quality: Size and Related Properties of Large Increases in Ultrafine Particle Number Concentrations', *Environmental Science & Technology*, 50(7), pp. 3362–3370. doi: 10.1021/acs.est.5b05313.

IARC (2012) *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans,volume 100 C, arsenic, metals, fibres, and dusts: this publication represents the views and expert opinions of an IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. IARC, Lyon. Available at: https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans/Arsenic-Metals-Fibres-And-Dusts-2012 (Accessed: 18 September 2020).

Jan, R. *et al.* (2020) 'Toxicological screening of airborne particulate matter in atmosphere of Pune: Reactive oxygen species and cellular toxicity', *Environmental Pollution*, 261, p. 113724. doi: 10.1016/j.envpol.2019.113724.

Janssen, N. *et al.* (2013) 'Oxidative potential of particulate matter collected at sites with different source characteristics', *The Science of the total environment*, 472C, pp. 572–581. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.11.099.

Janssen, N. A. H. *et al.* (2014) 'Oxidative potential of particulate matter collected at sites with different source characteristics', *Science of The Total Environment*, 472, pp. 572–581. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.11.099.

Janssen, N. A. H. *et al.* (2015) 'Associations between three specific a-cellular measures of the oxidative potential of particulate matter and markers of acute airway and nasal inflammation in healthy volunteers', *Occup Environ Med*, 72(1), pp. 49–56. doi: 10.1136/oemed-2014-102303.

Jaramillo, I. C. *et al.* (2018) 'Effects of Fuel Components and Combustion Particle Physicochemical Properties on Toxicological Responses of Lung Cells', *Journal of environmental science and health. Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering*, 53(4), pp. 295–309. doi: 10.1080/10934529.2017.1400793.

Jedyńska, A. *et al.* (2016) 'Spatial variations and development of land use regression models of oxidative potential in ten European study areas', *Atmospheric Environment*, 150. doi: 10.1016/j.atmosenv.2016.11.029.

Jia, J. *et al.* (2018) 'Emission characteristics and chemical components of size-segregated particulate matter in iron and steel industry', *Atmospheric Environment*, 182, pp. 115–127. doi: 10.1016/j.atmosenv.2018.03.051.

Jia, S. *et al.* (2020) 'Size-segregated deposition of atmospheric elemental carbon (EC) in the human respiratory system: A case study of the Pearl River Delta, China', *Science of The Total Environment*, 708, p. 134932. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.134932.

Jiang, H. *et al.* (2020) 'Role of functional groups in reaction kinetics of dithiothreitol with secondary organic aerosols', *Environmental Pollution*, 263, p. 114402. doi: 10.1016/j.envpol.2020.114402.

Jiang, N. *et al.* (2020) 'Low-dose combined exposure of carboxylated black carbon and heavy metal lead induced potentiation of oxidative stress, DNA damage, inflammation, and apoptosis in BEAS-2B cells', *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 206, p. 111388. doi: 10.1016/j.ecoenv.2020.111388.

Jovanovic, M. V. *et al.* (2019) 'Measurements of Oxidative Potential of Particulate Matter at Belgrade Tunnel; Comparison of BPEAnit, DTT and DCFH Assays', *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(24). doi: 10.3390/ijerph16244906.

Jung, C.-H. and Wells, W. W. (1998) 'Spontaneous Conversion ofl-Dehydroascorbic Acid tol-Ascorbic Acid andl-Erythroascorbic Acid', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 355(1), pp. 9–14. doi: 10.1006/abbi.1998.0713.

Kamens, R. *et al.* (1999) 'Aerosol Formation from the Reaction of α-Pinene and Ozone Using a Gas-Phase Kinetics-Aerosol Partitioning Model', *Environmental Science & Technology*, 33(9), pp. 1430–1438. doi: 10.1021/es980725r.

Karagulian, F. *et al.* (2015) 'Contributions to cities' ambient particulate matter (PM): A systematic review of local source contributions at global level', *Atmospheric Environment*, 120, pp. 475–483. doi: 10.1016/j.atmosenv.2015.08.087.

Karavalakis, G. *et al.* (2017) 'Impact of biodiesel on regulated and unregulated emissions, and redox and proinflammatory properties of PM emitted from heavy-duty vehicles', *Science of The Total Environment*, 584. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.01.187.

Karimi, B. and Shokrinezhad, B. (2020) 'Air pollution and mortality among infant and children under five years: A systematic review and meta-analysis', *Atmospheric Pollution Research*. doi: 10.1016/j.apr.2020.02.006.

Katerji, M., Filippova, M. and Duerksen-Hughes, P. (2019) *Approaches and Methods to Measure Oxidative Stress in Clinical Samples: Research Applications in the Cancer Field*, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi. doi: https://doi.org/10.1155/2019/1279250.

Kelly, F. and Fussell, J. (2012) 'Size, source and chemical composition as determinants of toxicity attributable to ambient particulate matter', *Atmospheric Environment*, 60, pp. 504–526. doi: 10.1016/j.atmosenv.2012.06.039.

Keuken, M. P. *et al.* (2015) 'Total and size-resolved particle number and black carbon concentrations in urban areas near Schiphol airport (the Netherlands)', *Atmospheric Environment*, 104, pp. 132–142. doi: 10.1016/j.atmosenv.2015.01.015.

Kfoury, A. (2013) *Origin and physicochemical behaviour of atmospheric $PM_{2.5}$ in cities located in the littoral area of the Nord-Pas-de-Calais region, France*. Université du littoral cote d'opale.

Kfoury, A. *et al.* (2016) '$PM_{2.5}$ source apportionment in a French urban coastal site under steelworks emission influences using constrained non-negative matrix factorization receptor model', *Journal of Environmental Sciences (China)*, 40, pp. 114–128. doi: 10.1016/j.jes.2015.10.025.

Khreis, H. *et al.* (2017) 'Exposure to traffic-related air pollution and risk of development of childhood asthma: A systematic review and meta-analysis', *Environment International*, 100, pp. 1–31. doi: 10.1016/j.envint.2016.11.012.

Kim, K. E., Cho, D. and Park, H. J. (2016) 'Air pollution and skin diseases: Adverse effects of airborne particulate matter on various skin diseases', *Life Sciences*, 152, pp. 126–134. doi: 10.1016/j.lfs.2016.03.039.

Kim, M.-H. (2016) 'Biological effects of zinc oxide nanoparticles on inflammation', *CELLMED*, 6(4), p. 23.1-23.6. doi: 10.5667/tang.2016.0013.

Kinsey, J. S. *et al.* (2010) 'Physical characterization of the fine particle emissions from commercial aircraft engines during the Aircraft Particle Emissions eXperiment (APEX) 1–3', *Atmospheric Environment*, 44(17), pp. 2147–2156. doi: 10.1016/j.atmosenv.2010.02.010.

Koçak, M. *et al.* (2015) 'PM_{10} and $PM_{2.5}$ composition over the Central Black Sea: origin and seasonal variability', *Environmental Science and Pollution Research*, 22(22), pp. 18076–18092. doi: 10.1007/s11356-015-4928-2.

Korkmaz, K. S., Butuner, B. D. and Roggenbuck, D. (2018) 'Detection of 8-OHdG as a diagnostic biomarker', *Journal of Laboratory and Precision Medicine*, 3(0). Available at: http://jlpm.amegroups.com/article/view/4605 (Accessed: 26 November 2020).

Kroemer, G. *et al.* (2009) 'Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009', *Cell Death & Differentiation*, 16(1), pp. 3–11. doi: 10.1038/cdd.2008.150.

Kuang, B. (2017) *Source investigation and mass spectrometric characterization of humic-like substances in atmospheric aerosols*.

Kulhánová, I. *et al.* (2018) 'The fraction of lung cancer incidence attributable to fine particulate air pollution in France: Impact of spatial resolution of air pollution models', *Environment International*, 121, pp. 1079–1086. doi: 10.1016/j.envint.2018.09.055.

Kumagai, Y. *et al.* (2002) 'Oxidation of Proximal Protein Sulfhydryls by Phenanthraquinone, a Component of Diesel Exhaust Particles', *Chemical Research in Toxicology*, 15(4), pp. 483–489. doi: 10.1021/tx0100993.

Kuniyal, J. C. and Guleria, R. P. (2019) 'The current state of aerosol-radiation interactions: A mini review', *Journal of Aerosol Science*, 130, pp. 45–54. doi: 10.1016/j.jaerosci.2018.12.010.

Kutlar Joss, M. *et al.* (2017) 'Time to harmonize national ambient air quality standards', *International Journal of Public Health*, 62(4), pp. 453–462. doi: 10.1007/s00038-017-0952-y.

Lademann, J. *et al.* (2004) 'Penetration of microparticles into human skin.', *Der Hautarzt; Zeitschrift fur Dermatologie, Venerologie, und Verwandte Gebiete*, 55(12), pp. 1117–1119. doi: 10.1007/s00105-004-0841-1.

Lam, J. *et al.* (2016) 'A Systematic Review and Meta-Analysis of Multiple Airborne Pollutants and Autism Spectrum Disorder', *PloS One*, 11(9), p. e0161851. doi: 10.1371/journal.pone.0161851.

Lamarque, J.-F. *et al.* (2011) 'Global and regional evolution of short-lived radiatively-active gases and aerosols in the Representative Concentration Pathways', *Climatic Change*, pp. 191–212. doi: 10.1007/s10584-011-0155-0.

Landkocz, Y. *et al.* (2017) 'Fine and ultrafine atmospheric particulate matter at a multi-influenced urban site: Physicochemical characterization, mutagenicity and cytotoxicity', *Environmental Pollution*, 221, pp. 130–140. doi: 10.1016/j.envpol.2016.11.054.

Laversin, H. (2006) *Traceurs et formes chimiques du fer dans les particules émises dans l'atmosphère depuis un site sidérurgique : étude spectroscopique et caractérisation de composés de référence et de particules collectées dans l'environnement*. These de doctorat. Littoral. Available at: http://www.theses.fr/2006DUNK0163 (Accessed: 21 December 2020).

Lê, S., Josse, J. and Husson, F. (2008) 'FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis', *Journal of Statistical Software*, 25(1), pp. 1–18. doi: 10.18637/jss.v025.i01.

Leclercq, B. *et al.* (2018) 'Air pollution-derived $PM_{2.5}$ impairs mitochondrial function in healthy and chronic obstructive pulmonary diseased human bronchial epithelial cells', *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 243(Pt B), pp. 1434–1449. doi: 10.1016/j.envpol.2018.09.062.

Ledoux, F. (2003) *Les aérosols particulaires atmosphériques sur le Dunkerquois : caractérisations chimiques, physiques, spectroscopiques et évaluation de leur toxicité*. These de doctorat. Université du Littoral Côte d'Opale. Available at: http://www.theses.fr/2003DUNK0096 (Accessed: 14 December 2020).

Ledoux, F. *et al.* (2004) 'EPR investigation of iron in size segregated atmospheric aerosols collected at Dunkerque, Northern France', *Atmospheric Environment*, 38(8), pp. 1201–1210. doi: 10.1016/j.atmosenv.2003.11.005.

Ledoux, F. *et al.* (2006) 'A summer and winter apportionment of particulate matter at urban and rural areas in northern France', *Atmospheric Research*, 82(3), pp. 633–642. doi: 10.1016/j.atmosres.2006.02.019.

Ledoux, F. *et al.* (2018) 'Influence of ship emissions on NOx, SO_2, O_3 and PM concentrations in a North-Sea harbor in France', *Journal of Environmental Sciences*, 71, pp. 56–66. doi: 10.1016/j.jes.2018.03.030.

Lelieveld, J. *et al.* (2020) 'Loss of life expectancy from air pollution compared to other risk factors: a worldwide perspective', *Cardiovascular research*. doi: 10.1093/cvr/cvaa025.

Leni, Z., Künzi, L. and Geiser, M. (2020) 'Air pollution causing oxidative stress', *Current Opinion in Toxicology*, 20–21, pp. 1–8. doi: 10.1016/j.cotox.2020.02.006.

Levin, Z. *et al.* (2005) 'On the interactions of mineral dust, sea-salt particles, and clouds: A measurement and modeling study from the Mediterranean Israeli Dust Experiment campaign', *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, 110(D20). doi: 10.1029/2005JD005810.

Lewis, E. R. and Schwartz, S. E. (2004) 'Sea Salt Aerosol Production: Mechanisms, Methods, Measurements and Models—A Critical Review', *Washington DC American Geophysical Union Geophysical Monograph Series*, 152. doi: 10.1029/GM152.

Li, K. *et al.* (2014) 'Current and Emerging Biomarkers of Cell Death in Human Disease', *BioMed Research International*, 2014. doi: 10.1155/2014/690103.

Li, N. *et al.* (2003) 'Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage', *Environmental Health Perspectives*, 111(4), pp. 455–460. doi: 10.1289/ehp.6000.

Li, W. *et al.* (2020) 'Overview of primary biological aerosol particles from a Chinese boreal forest: Insight into morphology, size, and mixing state at microscopic scale', *Science of The Total Environment*, 719, p. 137520. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.137520.

Liang, C.-S. *et al.* (2016) 'Review on recent progress in observations, source identifications and countermeasures of $PM_{2.5}$', *Environment International*, 86, pp. 150–170. doi: 10.1016/j.envint.2015.10.016.

Libalova, H. *et al.* (2018) 'Kinetics of ROS generation induced by polycyclic aromatic hydrocarbons and organic extracts from ambient air particulate matter in model human lung cell lines', *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 827, pp. 50–58. doi: 10.1016/j.mrgentox.2018.01.006.

Lim, H. *et al.* (2020) 'Polycyclic aromatic compounds in particulate matter and indoor dust at preschools in Stockholm, Sweden: Occurrence, sources and genotoxic potential in vitro', *Science of The Total Environment*, p. 142709. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.142709.

Lin, M. and Yu, J. Z. (2019) 'Effect of metal-organic interactions on the oxidative potential of mixtures of atmospheric humic-like substances and copper/manganese as investigated by the dithiothreitol assay', *Science of The Total Environment*, 697, p. 134012. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.134012.

Lin, M. and Yu, J. Z. (2020) 'Assessment of Interactions between Transition Metals and Atmospheric Organics: Ascorbic Acid Depletion and Hydroxyl Radical Formation in Organic-Metal Mixtures', *Environmental Science & Technology*, 54(3), pp. 1431–1442. doi: 10.1021/acs.est.9b07478.

Lin, P. *et al.* (2010) 'Abundance and size distribution of HULIS in ambient aerosols at a rural site in South China', *Journal of Aerosol Science*, 41(1), pp. 74–87. doi: 10.1016/j.jaerosci.2009.09.001.

Lin, P. and Yu, J. Z. (2011) 'Generation of reactive oxygen species mediated by humic-like substances in atmospheric aerosols', *Environmental Science & Technology*, 45(24), pp. 10362–10368. doi: 10.1021/es2028229.

Liu, J. *et al.* (2020) 'Fine particulate matter exposure induces DNA damage by downregulating Rad51 expression in human bronchial epithelial Beas-2B cells in vitro', *Toxicology*, 444, p. 152581. doi: 10.1016/j.tox.2020.152581.

Liu, L. *et al.* (2018) 'Metals and oxidative potential in urban particulate matter influence systemic inflammatory and neural biomarkers: A controlled exposure study', *Environment International*, 121, pp. 1331–1340. doi: 10.1016/j.envint.2018.10.055.

Liu, Q. *et al.* (2014) 'Oxidative Potential and Inflammatory Impacts of Source Apportioned Ambient Air Pollution in Beijing', *Environmental Science & Technology*, 48(21), pp. 12920–12929. doi: 10.1021/es5029876.

Liu, Q. *et al.* (2020) 'Oxidative potential of ambient $PM_{2.5}$ in Wuhan and its comparisons with eight areas of China', *Science of The Total Environment*, 701, p. 134844. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.134844.

Liu, X. *et al.* (2020) '$PM_{2.5}$ triggered apoptosis in lung epithelial cells through the mitochondrial apoptotic way mediated by a ROS-DRP1-mitochondrial fission axis', *Journal of Hazardous Materials*, 397, p. 122608. doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.122608.

Loomis, D. *et al.* (2013) 'The carcinogenicity of outdoor air pollution', *The Lancet Oncology*, 14(13), pp. 1262–1263. doi: 10.1016/S1470-2045(13)70487-X.

Ma, J.-K. *et al.* (2019) *Effects of Pyrene on Human Liver HepG2 Cells: Cytotoxicity, Oxidative Stress, and Transcriptomic Changes in Xenobiotic Metabolizing Enzymes and Inflammatory Markers with Protection Trial Using Lycopene*, *BioMed Research International*. Hindawi. doi: https://doi.org/10.1155/2019/7604851.

Ma, Y. *et al.* (2018) 'Sources and oxidative potential of water-soluble humic-like substances ($HULIS_{WS}$) in fine particulate matter ($PM_{2.5}$) in Beijing', *Atmospheric Chemistry and Physics*, 18(8), pp. 5607–5617. doi: https://doi.org/10.5194/acp-18-5607-2018.

Machado, A. A. de S. *et al.* (2014) 'Oxidative stress and DNA damage responses to phenanthrene exposure in the estuarine guppy Poecilia vivipara', *Marine Environmental Research*, 98, pp. 96–105. doi: 10.1016/j.marenvres.2014.03.013.

Maffia, J. *et al.* (2020) 'PM emissions from open field crop management: Emission factors, assessment methods and mitigation measures – A review', *Atmospheric Environment*, 226, p. 117381. doi: 10.1016/j.atmosenv.2020.117381.

Malerbi, F. K. *et al.* (2012) 'Ambient levels of air pollution induce clinical worsening of blepharitis', *Environmental Research*, 112, pp. 199–203. doi: 10.1016/j.envres.2011.11.010.

Manders, A. M. M. *et al.* (2010) 'Sea salt concentrations across the European continent', *Atmospheric Environment*, 44(20), pp. 2434–2442. doi: 10.1016/j.atmosenv.2010.03.028.

Manno, E., Varrica, D. and Dongarrà, G. (2006) 'Metal distribution in road dust samples collected in an urban area close to a petrochemical plant at Gela, Sicily', *Atmospheric Environment*, 40(30), pp. 5929–5941. doi: 10.1016/j.atmosenv.2006.05.020.

Marano, F. (2007) 'A-t-on raison de considérer que les particules atmosphériques fines et ultrafines sont dangereuses pour la santé ?' Pollution atmosphérique.

Maret, W. (2019) 'The redox biology of redox-inert zinc ions', *Free Radical Biology and Medicine*, 134, pp. 311–326. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.01.006.

Marnett, L. J. (1999) 'Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde', *Mutation Research*, 424(1–2), pp. 83–95. doi: 10.1016/s0027-5107(99)00010-x.

Mårtensson, E. M. *et al.* (2003) 'Laboratory simulations and parameterization of the primary marine aerosol production', *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, 108(D9). doi: 10.1029/2002JD002263.

Massimi, L., Simonetti, G., *et al.* (2020) 'Spatial distribution of levoglucosan and alternative biomass burning tracers in atmospheric aerosols, in an urban and industrial hot-spot of Central Italy', *Atmospheric Research*, 239, p. 104904. doi: 10.1016/j.atmosres.2020.104904.

Massimi, L., Ristorini, M., *et al.* (2020) 'Spatial mapping and size distribution of oxidative potential of particulate matter released by spatially disaggregated sources', *Environmental Pollution*, 266, p. 115271. doi: 10.1016/j.envpol.2020.115271.

Matthias-Maser, S., Bogs, B. and Jaenicke, R. (2000) 'The size distribution of primary biological aerosol particles in cloud water on the mountain Kleiner Feldbergr/Taunus (FRG)', *Atmospheric Research*, 54, pp. 1–13.

Mayol- Bracero, O. L. *et al.* (2002) 'Water-soluble organic compounds in biomass burning aerosols over Amazonia 2. Apportionment of the chemical composition and importance of the polyacidic fraction', *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, 107(D20), p. LBA 59-1-LBA 59-15. doi: 10.1029/2001JD000522.

Mazzei, F. *et al.* (2008) 'Characterization of particulate matter sources in an urban environment', *Science of The Total Environment*, 401(1), pp. 81–89. doi: 10.1016/j.scitotenv.2008.03.008.

McWhinney, R. D. *et al.* (2013) 'Filterable Redox Cycling Activity: A Comparison between Diesel Exhaust Particles and Secondary Organic Aerosol Constituents', *Environmental Science & Technology*, 47(7), pp. 3362–3369. doi: 10.1021/es304676x.

Megido, L. *et al.* (2016) 'Traffic tracers in a suburban location in northern Spain: relationship between carbonaceous fraction and metals', *Environmental Science and Pollution Research*, 23(9), pp. 8669–8678. doi: 10.1007/s11356-015-5955-8.

Meizarini, A. *et al.* (2018) 'Anti-inflammatory properties of a wound dressing combination of zinc oxide and turmeric extract', *Veterinary World*, 11(1), pp. 25–29. doi: 10.14202/vetworld.2018.25-29.

Migdal, C. and Serres, M. (2011) 'Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant', *médecine/sciences*, 27(4), pp. 405–412. doi: 10.1051/medsci/2011274017.

Milkovic, L. *et al.* (2019) 'Short Overview of ROS as Cell Function Regulators and Their Implications in Therapy Concepts', *Cells*, 8(8). doi: 10.3390/cells8080793.

Moloi, K. *et al.* (2002) 'Black carbon, mass and elemental measurements of airborne particles in the village of Serowe, Botswana', *Atmospheric Environment*, 36(14), pp. 2447–2457. doi: 10.1016/S1352-2310(02)00085-7.

Monaci, F. and Bargagli, R. (1997) 'Barium and Other Trace Metals as Indicators of Vehicle Emissions', *Water Air and Soil Pollution*, 100, pp. 89–98. doi: 10.1023/A:1018318427017.

Mooibroek, D. *et al.* (2011) 'Source apportionment and spatial variability of $PM_{2.5}$ using measurements at five sites in the Netherlands', *Atmospheric Environment*, 45(25), pp. 4180–4191. doi: 10.1016/j.atmosenv.2011.05.017.

Morakinyo, O. M. *et al.* (2016) 'Health Outcomes of Exposure to Biological and Chemical Components of Inhalable and Respirable Particulate Matter', *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(6). doi: 10.3390/ijerph13060592.

Moreno, T., Jones, T. P. and Richards, R. J. (2004) 'Characterisation of aerosol particulate matter from urban and industrial environments: examples from Cardiff and Port Talbot, South Wales, UK', *The Science of the Total Environment*, 334–335, pp. 337–346. doi: 10.1016/j.scitotenv.2004.04.074.

Morrow, J. D. *et al.* (1992) 'Non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F2-isoprostanes) are formed in situ on phospholipids.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(22), pp. 10721–10725.

Mueller-Anneling, L. *et al.* (2004) 'Ambient endotoxin concentrations in PM_{10} from Southern California', *Environmental Health Perspectives*, 112(5), pp. 583–588. doi: 10.1289/ehp.6552.

Musiek, E. S. *et al.* (2005) 'Recent advances in the biochemistry and clinical relevance of the isoprostane pathway', *Lipids*, 40(10), pp. 987–994. doi: 10.1007/s11745-005-1460-7.

Myhre, O. *et al.* (2018) 'Early life exposure to air pollution particulate matter (PM) as risk factor for attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD): Need for novel strategies for mechanisms and causalities', *Toxicology and Applied Pharmacology*, 354, pp. 196–214. doi: 10.1016/j.taap.2018.03.015.

Nagel, G. *et al.* (2018) 'Air pollution and incidence of cancers of the stomach and the upper aerodigestive tract in the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE)', *International Journal of Cancer*, 143(7), pp. 1632–1643. doi: 10.1002/ijc.31564.

Nascimento, M. M., da Rocha, G. O. and de Andrade, J. B. (2017) 'Pesticides in fine airborne particles: from a green analysis method to atmospheric characterization and risk assessment', *Scientific Reports*, 7. doi: 10.1038/s41598-017-02518-1.

Nathan, C. and Cunningham-Bussel, A. (2013) 'Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species', *Nature Reviews Immunology*, 13(5), pp. 349–361. doi: 10.1038/nri3423.

National Institute of Standards & Technology (2015) *Certificate of Analysis Standard Reference Material ® 1648a Department of commerce United states of America*. Certificate of Analysis, p. 17.

Ndong Ba, A. *et al.* (2019) 'Physico-chemical characterization and in vitro inflammatory and oxidative potency of atmospheric particles collected in Dakar city's (Senegal)', *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 245, pp. 568–581. doi: 10.1016/j.envpol.2018.11.026.

Nicolas, J. *et al.* (2015) 'Redox activity and chemical interactions of metal oxide nano- and micro-particles with dithiothreitol (DTT)', *Environmental Science. Processes & Impacts*, 17(11), pp. 1952–1958. doi: 10.1039/c5em00352k.

Niki, E. (2020) 'Chapter 14 - Dual stressor effects of lipid oxidation and antioxidants', in Sies, H. (ed.) *Oxidative Stress*. Academic Press, pp. 249–262. doi: 10.1016/B978-0-12-818606-0.00014-6.

Ognik, K. *et al.* (2019) 'The effect of manganese nanoparticles on performance, redox reactions and epigenetic changes in turkey tissues', *Animal: An International Journal of Animal Bioscience*, 13(6), pp. 1137–1144. doi: 10.1017/S1751731118002653.

Oh, S. M. *et al.* (2011) 'Organic extracts of urban air pollution particulate matter (PM2.5)-induced genotoxicity and oxidative stress in human lung bronchial epithelial cells (BEAS-2B cells)', *Mutation Research*, 723(2), pp. 142–151. doi: 10.1016/j.mrgentox.2011.04.003.

Oravisjärvi, K. *et al.* (2003) 'Source contributions to $PM_{2.5}$ particles in the urban air of a town situated close to a steel works', *Atmospheric Environment*, 37(8), pp. 1013–1022. doi: 10.1016/S1352-2310(02)01048-8.

Ornatowski, W. *et al.* (2020) 'Complex interplay between autophagy and oxidative stress in the development of pulmonary disease', *Redox Biology*, 36, p. 101679. doi: 10.1016/j.redox.2020.101679.

Oudin, A. *et al.* (2016) 'Association between neighbourhood air pollution concentrations and dispensed medication for psychiatric disorders in a large longitudinal cohort of Swedish children and adolescents', *BMJ Open*, 6(6), p. e010004. doi: 10.1136/bmjopen-2015-010004.

Ouyang, Y. *et al.* (2018) 'Modulation of thiol-dependent redox system by metal ions via thioredoxin and glutaredoxin systems', *Metallomics*, 10(2), pp. 218–228. doi: 10.1039/C7MT00327G.

Øvrevik, J. (2019) 'Oxidative Potential Versus Biological Effects: A Review on the Relevance of Cell-Free/Abiotic Assays as Predictors of Toxicity from Airborne Particulate Matter', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19). doi: 10.3390/ijms20194772.

Pachon, J. E. *et al.* (2013) 'Revising the use of potassium (K) in the source apportionment of $PM_{2.5}$', *Atmospheric Pollution Research*, 4(1), pp. 14–21. doi: 10.5094/APR.2013.002.

Pan, C.-J. G. *et al.* (2004) 'Inherent Redox Properties of Diesel Exhaust Particles: Catalysis of the Generation of Reactive Oxygen Species by Biological Reductants', *Toxicological Sciences*, 81(1), pp. 225–232. doi: 10.1093/toxsci/kfh199.

Panov, A. (2018) 'Perhydroxyl Radical (HO_2•) as Inducer of the Isoprostane Lipid Peroxidation in Mitochondria', *Molecular Biology*, 52(3), pp. 295–305. doi: 10.1134/S0026893318020097.

Papadopoulos, G. *et al.* (2020) 'Real-world gaseous and particulate emissions from Euro IV to VI medium duty diesel trucks', *Science of The Total Environment*, p. 139137. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.139137.

Paraskevopoulou, D. *et al.* (2019) 'Yearlong variability of oxidative potential of particulate matter in an urban Mediterranean environment', *Atmospheric Environment*, 206, pp. 183–196. doi: 10.1016/j.atmosenv.2019.02.027.

Park, S.-S. *et al.* (2013) 'Size distribution of water-soluble components in particulate matter emitted from biomass burning', *Atmospheric Environment*, 73, pp. 62–72. doi: 10.1016/j.atmosenv.2013.03.025.

Patel, A. and Rastogi, N. (2018) 'Oxidative potential of ambient fine aerosol over a semi-urban site in the Indo-Gangetic Plain', *Atmospheric Environment*, 175, pp. 127–134. doi: 10.1016/j.atmosenv.2017.12.004.

Pateraki, St. *et al.* (2012) 'Carbonaceous and ionic compositional patterns of fine particles over an urban Mediterranean area', *Science of The Total Environment*, 424, pp. 251–263. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.02.046.

Paulauskas, R. *et al.* (2020) 'Online determination of potassium and sodium release behaviour during single particle biomass combustion by FES and ICP-MS', *Science of The Total Environment*, 746, p. 141162. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.141162.

Pay, M. T. *et al.* (2010) 'A full year evaluation of the CALIOPE-EU air quality modeling system over Europe for 2004', *Atmospheric Environment*, 44(27), pp. 3322–3342. doi: 10.1016/j.atmosenv.2010.05.040.

Pay, M. T., Jiménez-Guerrero, P. and Baldasano, J. M. (2012) 'Assessing sensitivity regimes of secondary inorganic aerosol formation in Europe with the CALIOPE-EU modeling system', *Atmospheric Environment*, 51, pp. 146–164. doi: 10.1016/j.atmosenv.2012.01.027.

Peden, D. B. *et al.* (1990) 'Uric acid is a major antioxidant in human nasal airway secretions.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(19), pp. 7638–7642.

Peixoto, M. S., de Oliveira Galvão, M. F. and Batistuzzo de Medeiros, S. R. (2017) 'Cell death pathways of particulate matter toxicity', *Chemosphere*, 188, pp. 32–48. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.08.076.

Peralta, D. *et al.* (2015) 'A proton relay enhances H O 2 sensitivity of GAPDH to facilitate metabolic adaptation', *Nature Chemical Biology*, 11(2), pp. 156–163. doi: 10.1038/nchembio.1720.

Perrone, M. *et al.* (2015) 'PM chemical composition and oxidative potential of the soluble fraction of particles at two sites in the urban area of Milan, Northern Italy', *Atmospheric Environment*, 128. doi: 10.1016/j.atmosenv.2015.12.040.

Perrone, M. R. *et al.* (2019) '$PM_{2.5}$ and PM_{10} oxidative potential at a Central Mediterranean Site: Contrasts between dithiothreitol- and ascorbic acid-measured values in relation with particle size and chemical composition', *Atmospheric Environment*, 210, pp. 143–155. doi: 10.1016/j.atmosenv.2019.04.047.

Pey, J. *et al.* (2013) 'Chemical fingerprint and impact of shipping emissions over a western Mediterranean metropolis: Primary and aged contributions', *Science of The Total Environment*, 463–464, pp. 497–507. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.06.061.

Platel, A. *et al.* (2020) 'Study of in vitro and in vivo genotoxic effects of air pollution fine ($PM_{2.5-0.18}$) and quasi-ultrafine ($PM_{0.18}$) particles on lung models', *Science of The Total Environment*, 711, p. 134666. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.134666.

pollution | Origin and meaning of pollution by Online Etymology Dictionary (2017) *Online Etymology Dictionary*. Available at: https://www.etymonline.com/word/pollution (Accessed: 26 March 2020).

Poon, R. Y. C. (2016) 'Mitotic Catastrophe', in Bradshaw, R. A. and Stahl, P. D. (eds) *Encyclopedia of Cell Biology*. Waltham: Academic Press, pp. 399–403. doi: 10.1016/B978-0-12-394447-4.30053-0.

Porter, N. A., Caldwell, S. E. and Mills, K. A. (1995) 'Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids', *Lipids*, 30(4), pp. 277–290. doi: 10.1007/bf02536034.

Prada, D. *et al.* (2017) 'Association of air particulate pollution with bone loss over time and bone fracture risk: analysis of data from two independent studies', *The Lancet. Planetary Health*, 1(8), pp. e337–e347. doi: 10.1016/S2542-5196(17)30136-5.

Pushparajah, D. S. *et al.* (2017) 'Synergistic and antagonistic interactions of binary mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons in the upregulation of CYP1 activity and mRNA levels in precision-cut rat liver slices', *Environmental Toxicology*, 32(3), pp. 764–775. doi: 10.1002/tox.22276.

Qiao, T. *et al.* (2015) 'Seasonal variations of water soluble composition (WSOC, Hulis and WSIIs) in PM_1 and its implications on haze pollution in urban Shanghai, China', *Atmospheric Environment*, 123, pp. 306–314. doi: 10.1016/j.atmosenv.2015.03.010.

Qing, X. *et al.* (2019) 'Prognostic significance of 8-hydroxy-2′-deoxyguanosine in solid tumors: a meta-analysis', *BMC Cancer*, 19(1), p. 997. doi: 10.1186/s12885-019-6189-9.

Qiu, Y. *et al.* (2020) 'Ambient air pollution and male fecundity: A retrospective analysis of longitudinal data from a Chinese human sperm bank (2013–2018)', *Environmental Research*, p. 109528. doi: 10.1016/j.envres.2020.109528.

Querol, X. *et al.* (2007) 'Source origin of trace elements in PM from regional background, urban and industrial sites of Spain', *Atmospheric Environment*, 41(34), pp. 7219–7231. doi: 10.1016/j.atmosenv.2007.05.022.

Quintana, R. *et al.* (2011) 'The oxidative potential and biological effects induced by PM10 obtained in Mexico City and at a receptor site during the MILAGRO Campaign', *Environmental Pollution*, 159(12), pp. 3446–3454. doi: 10.1016/j.envpol.2011.08.022.

Raaschou-Nielsen, O. *et al.* (2013) 'Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE)', *The Lancet. Oncology*, 14(9), pp. 813–822. doi: 10.1016/S1470-2045(13)70279-1.

Reiss, R. *et al.* (2007) 'Evidence of health impacts of sulfate-and nitrate-containing particles in ambient air', *Inhalation Toxicology*, 19(5), pp. 419–449. doi: 10.1080/08958370601174941.

Rivas, I. *et al.* (2020) 'Source apportionment of particle number size distribution in urban background and traffic stations in four European cities', *Environment International*, 135, p. 105345. doi: 10.1016/j.envint.2019.105345.

Roche, C. (2016) *Etude des concentrations et de la composition des PM_{10} sur le littoral du nord de la France – Evaluation des contributions maritimes de l'espace Manche-Mer du Nord*. Université du Littoral Côte d'Opale.

Rodríguez-Cotto, R. I., Ortiz-Martínez, M. G. and Jiménez-Vélez, B. D. (2015) 'Organic extracts from African dust storms stimulate oxidative stress and induce inflammatory responses in human lung cells through Nrf2 but not NF-κB', *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 39(2), pp. 845–856. doi: 10.1016/j.etap.2015.02.015.

Rolph, G., Stein, A. and Stunder, B. (2017) 'Real-time Environmental Applications and Display sYstem: READY', *Environmental Modelling & Software*, 95, pp. 210–228. doi: 10.1016/j.envsoft.2017.06.025.

Rubbo, H., Trostchansky, A. and O'Donnell, V. (2008) 'Peroxynitrite-mediated lipid oxidation and nitration: Mechanisms and consequences', *Archives of biochemistry and biophysics*, 484, pp. 167–72. doi: 10.1016/j.abb.2008.11.007.

Sahu, D. *et al.* (2016) *In Vitro Cytotoxicity of Nanoparticles: A Comparison between Particle Size and Cell Type*, *Journal of Nanoscience*. Hindawi. doi: https://doi.org/10.1155/2016/4023852.

Sahu, D., Kannan, G. M. and Vijayaraghavan, R. (2014) *Carbon Black Particle Exhibits Size Dependent Toxicity in Human Monocytes*, *International Journal of Inflammation*. Hindawi. doi: https://doi.org/10.1155/2014/827019.

Salcedo, D. *et al.* (2016) 'Using trace element content and lead isotopic composition to assess sources of PM in Tijuana, Mexico', *Atmospheric Environment*, 132, pp. 171–178. doi: 10.1016/j.atmosenv.2016.02.041.

Saliani, M., Jalal, R. and Goharshadi, E. K. (2016) 'Mechanism of oxidative stress involved in the toxicity of ZnO nanoparticles against eukaryotic cells', *Nanomedicine Journal*, 3(1), pp. 1–14. doi: 10.7508/nmj.2016.01.001.

Samake, A. *et al.* (2017) 'The unexpected role of bioaerosols in the Oxidative Potential of PM', *Scientific Reports*, 7(1), p. 10978. doi: 10.1038/s41598-017-11178-0.

Samburova, V. *et al.* (2016) 'Polycyclic aromatic hydrocarbons in biomass-burning emissions and their contribution to light absorption and aerosol toxicity', *Science of The Total Environment*, 568, pp. 391–401. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.06.026.

Samet, J. M. *et al.* (2019) 'Non-redox cycling mechanisms of oxidative stress induced by PM metals', *Free Radical Biology and Medicine*. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.12.027.

Santacatalina, M. *et al.* (2010) 'Impact of fugitive emissions in ambient PM levels and composition: A case study in Southeast Spain', *Science of The Total Environment*, 408(21), pp. 4999–5009. doi: 10.1016/j.scitotenv.2010.07.040.

Scheers, H. *et al.* (2015) 'Long-Term Exposure to Particulate Matter Air Pollution Is a Risk Factor for Stroke: Meta-Analytical Evidence', *Stroke*, 46(11), pp. 3058–3066. doi: 10.1161/STROKEAHA.115.009913.

Schieber, M. and Chandel, N. S. (2014) 'ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress', *Current Biology*, 24(10), pp. R453–R462. doi: 10.1016/j.cub.2014.03.034.

Schins, R. P. F. *et al.* (2004) 'Inflammatory effects of coarse and fine particulate matter in relation to chemical and biological constituents', *Toxicology and Applied Pharmacology*, 195(1), pp. 1–11. doi: 10.1016/j.taap.2003.10.002.

Schraufnagel, D. E. *et al.* (2019) 'Air Pollution and Noncommunicable Diseases: A Review by the Forum of International Respiratory Societies' Environmental Committee, Part 2: Air Pollution and Organ Systems', *Chest*, 155(2), pp. 417–426. doi: 10.1016/j.chest.2018.10.041.

Sedelnikova, O. A. *et al.* (2010) 'Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis', *Mutation Research*, 704(1–3), pp. 152–159. doi: 10.1016/j.mrrev.2009.12.005.

Seinfeld, J. H. *et al.* (2004) 'Scientific Objectives, Measurement Needs, and Challenges Motivating the PARAGON Aerosol Initiative', *Bulletin of the American Meteorological Society*, 85(10), pp. 1503–1510. doi: 10.1175/BAMS-85-10-1503.

Seinfeld, J. H. and Pandis, S. N. (2006) *Atmospheric chemistry and physics: from air pollution to climate change - 2nd Edition.* second edition. John Wiley & Sons, Inc., United States of America.

Shafer, M. M. *et al.* (2010) 'Reactive oxygen species activity and chemical speciation of size-fractionated atmospheric particulate matter from Lahore, Pakistan: an important role for transition metals', *Journal of environmental monitoring: JEM*, 12(3), pp. 704–715. doi: 10.1039/b915008k.

Shahpoury, P. *et al.* (2019) 'Development of an antioxidant assay to study oxidative potential of airborne particulate matter', *Atmospheric Measurement Techniques*, 12, pp. 6529–6539. doi: 10.5194/amt-12-6529-2019.

Shang, J. *et al.* (2020) 'Associations between source-resolved $PM_{2.5}$ and airway inflammation at urban and rural locations in Beijing', *Environment International*, 139, p. 105635. doi: 10.1016/j.envint.2020.105635.

Shang, Y. *et al.* (2018) 'Cytotoxicity Comparison between Fine Particles Emitted from the Combustion of Municipal Solid Waste and Biomass', *Journal of Hazardous Materials*, 367. doi: 10.1016/j.jhazmat.2018.12.065.

Shi, T. *et al.* (2003) 'Hydroxyl radical generation by electron paramagnetic resonance as a new method to monitor ambient particulate matter composition', *Journal of Environmental Monitoring*, 5(4), pp. 550–556. doi: 10.1039/B303928P.

Shuster-Meiseles, T. *et al.* (2016) 'ROS-generating/ARE-activating capacity of metals in roadway particulate matter deposited in urban environment', *Environmental Research*, 146, pp. 252–262. doi: 10.1016/j.envres.2016.01.009.

Sies, H. (1985a) '1 - Oxidative Stress: Introductory Remarks', in Sies, H. (ed.) *Oxidative Stress*. London: Academic Press, pp. 1–8. doi: 10.1016/B978-0-12-642760-8.50005-3.

Sies, H. (1985b) *Oxidative Stress - 1st Edition*. Academic Press. London. Available at: https://www.elsevier.com/books/oxidative-stress/sies/978-0-12-642760-8 (Accessed: 18 April 2020).

Sies, H. (1986) 'Biochemistry of Oxidative Stress', *Angewandte Chemie International Edition in English*, 25(12), pp. 1058–1071. doi: 10.1002/anie.198610581.

Sies, H. (2015) 'Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine', *Redox Biology*, 4, pp. 180–183. doi: 10.1016/j.redox.2015.01.002.

Sies, H. and Jones, D. (2007) 'Oxidative Stress*', in Fink, G. (ed.) *Encyclopedia of Stress (Second Edition)*. New York: Academic Press, pp. 45–48. doi: 10.1016/B978-012373947-6.00285-3.

Sillanpää, M. *et al.* (2006) 'Chemical composition and mass closure of particulate matter at six urban sites in Europe', *Atmospheric Environment*, 40, pp. 212–223. doi: 10.1016/j.atmosenv.2006.01.063.

Silva, K. K. da *et al.* (2019) 'Physico-chemical properties and genotoxic effects of air particulate matter collected from a complex of ceramic industries', *Atmospheric Pollution Research*, 10(2), pp. 597–607. doi: 10.1016/j.apr.2018.11.001.

Simoneit, B. R. T. *et al.* (1999) 'Levoglucosan, a tracer for cellulose in biomass burning and atmospheric particles', *Atmospheric Environment*, 33(2), pp. 173–182. doi: 10.1016/S1352-2310(98)00145-9.

Simonetti, G. *et al.* (2018) 'Oxidative potential of size-segregated PM in an urban and an industrial area of Italy', *Atmospheric Environment*, 187, pp. 292–300. doi: 10.1016/j.atmosenv.2018.05.051.

Singh, R., Cheng, S. and Singh, S. (2020) 'Oxidative stress-mediated genotoxic effect of zinc oxide nanoparticles on Deinococcus radiodurans', *3 Biotech*, 10(2). doi: 10.1007/s13205-020-2054-4.

Sippula, O. *et al.* (2007) 'Effect of Wood Fuel on the Emissions from a Top-Feed Pellet Stove', *Energy & Fuels*, 21(2), pp. 1151–1160. doi: 10.1021/ef060286e.

Son, E. S. *et al.* (2020) 'Effects of antioxidants on oxidative stress and inflammatory responses of human bronchial epithelial cells exposed to particulate matter and cigarette smoke extract', *Toxicology in Vitro*, 67, p. 104883. doi: 10.1016/j.tiv.2020.104883.

Staal, Y. C. M. *et al.* (2007) 'Binary PAH mixtures cause additive or antagonistic effects on gene expression but synergistic effects on DNA adduct formation', *Carcinogenesis*, 28(12), pp. 2632–2640. doi: 10.1093/carcin/bgm182.

Steenhof, M. *et al.* (2011) 'In vitro toxicity of particulate matter (PM) collected at different sites in the Netherlands is associated with PM composition, size fraction and oxidative potential--the RAPTES project', *Particle and Fibre Toxicology*, 8, p. 26. doi: 10.1186/1743-8977-8-26.

Stein, A. F. *et al.* (2015) 'NOAA's HYSPLIT Atmospheric Transport and Dispersion Modeling System', *Bulletin of the American Meteorological Society*, 96(12), pp. 2059–2077. doi: 10.1175/BAMS-D-14-00110.1.

Strak, M. *et al.* (2017) 'Long-term exposure to particulate matter, NO_2 and the oxidative potential of particulates and diabetes prevalence in a large national health survey', *Environment International*, 108, pp. 228–236. doi: 10.1016/j.envint.2017.08.017.

Su, L.-J. *et al.* (2019) *Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis*, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi. doi: https://doi.org/10.1155/2019/5080843.

Sun, W. *et al.* (2013) 'Assessing protein oxidation by inorganic nanoparticles with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)', *Biotechnology and Bioengineering*, 110(3), pp. 694–701. doi: 10.1002/bit.24754.

Švédová, B. *et al.* (2019) 'Water-soluble ions in dust particles depending on meteorological conditions in urban environment', *Journal of Environmental Management*, 237, pp. 322–331. doi: 10.1016/j.jenvman.2019.02.086.

Syama, S. *et al.* (2013) 'Effect of Zinc Oxide nanoparticles on cellular oxidative stress and antioxidant defense mechanisms in mouse liver', *Toxicological & Environmental Chemistry*, 95(3), pp. 495–503. doi: 10.1080/02772248.2013.789606.

Sylvestre, A. *et al.* (2017) 'Comprehensive chemical characterization of industrial $PM_{2.5}$ from steel industry activities', *Atmospheric Environment*, 152, pp. 180–190. doi: 10.1016/j.atmosenv.2016.12.032.

Symon, T. *et al.* (2020) 'Oxidative Stress Indicators in Leukocytes from Humans and Bottlenose Dolphins in Response to a Proinflammatory Challenge', *Free Radical Biology and Medicine*, 159, p. S48. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.10.133.

Szyszkowicz, M. *et al.* (2010) 'Air pollution and emergency department visits for suicide attempts in vancouver, Canada', *Environmental Health Insights*, 4, pp. 79–86. doi: 10.4137/EHI.S5662.

Tanabe, K. *et al.* (2014) 'Increased levels of the oxidative stress marker, nitrotyrosine in patients with provocation test-induced coronary vasospasm', *Journal of Cardiology*, 64(2), pp. 86–90. doi: 10.1016/j.jjcc.2013.11.017.

Tegen, I. and Schepanski, K. (2018) 'Climate Feedback on Aerosol Emission and Atmospheric Concentrations', *Current Climate Change Reports*, 4(1), pp. 1–10. doi: 10.1007/s40641-018-0086-1.

Thorpe, A. and Harrison, R. M. (2008) 'Sources and properties of non-exhaust particulate matter from road traffic: a review', *The Science of the Total Environment*, 400(1–3), pp. 270–282. doi: 10.1016/j.scitotenv.2008.06.007.

Timonen, H. *et al.* (2008) 'Size distributions, sources and source areas of water-soluble organic carbon in urban background air', *Atmospheric Chemistry and Physics*, 8(18), pp. 5635–5647. doi: https://doi.org/10.5194/acp-8-5635-2008.

Turner, M. C. *et al.* (2017) 'Ambient Air Pollution and Cancer Mortality in the Cancer Prevention Study II', *Environmental Health Perspectives*, 125(8), p. 087013. doi: 10.1289/EHP1249.

USEPA, O. (2015) *Diesel Fuel Standards and Rulemakings*, *USEPA*. Available at: https://www.epa.gov/diesel-fuel-standards/diesel-fuel-standards-and-rulemakings (Accessed: 21 December 2020).

USEPA, O. (2016) *Lead Trends*, *USEPA*. Available at: https://www.epa.gov/air-trends/lead-trends (Accessed: 21 December 2020).

Usher, C. R., Michel, A. E. and Grassian, V. H. (2003) 'Reactions on mineral dust', *Chemical Reviews*, 103(12), pp. 4883–4940. doi: 10.1021/cr020657y.

Valavanidis, A., Vlachogianni, T. and Fiotakis, C. (2009) '8-hydroxy-2' -deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis', *Journal of Environmental Science and Health. Part C, Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews*, 27(2), pp. 120–139. doi: 10.1080/10590500902885684.

Valko, M. *et al.* (2016) 'Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease', *Archives of Toxicology*, 90(1), pp. 1–37. doi: 10.1007/s00204-015-1579-5.

Valko, M., Morris, H. and Cronin, M. T. D. (2005) 'Metals, toxicity and oxidative stress', *Current Medicinal Chemistry*, 12(10), pp. 1161–1208. doi: 10.2174/0929867053764635.

Van Den Heuvel, R. *et al.* (2016) 'Identification of PM_{10} characteristics involved in cellular responses in human bronchial epithelial cells (Beas-2B)', *Environmental Research*, 149, pp. 48–56. doi: 10.1016/j.envres.2016.04.029.

Van Den Heuvel, R. *et al.* (2018) 'Toxicity of Urban PM_{10} and Relation with Tracers of Biomass Burning', *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15, p. 320. doi: 10.3390/ijerph15020320.

Vander Wal, R. L., Bryg, V. M. and Huang, C.-H. (2014) 'Aircraft engine particulate matter: Macro- micro- and nanostructure by HRTEM and chemistry by XPS', *Combustion and Flame*, 161(2), pp. 602–611. doi: 10.1016/j.combustflame.2013.09.003.

Velali, E. *et al.* (2016) 'Redox activity and in vitro bioactivity of the water-soluble fraction of urban particulate matter in relation to particle size and chemical composition', *Environmental Pollution*, 208, pp. 774–786. doi: 10.1016/j.envpol.2015.10.058.

Verdin, A. *et al.* (2017) 'Caractérisation chimique et évaluation des propriétés cytotoxiques, pro-inflammatoires et génotoxiques de particules fines en suspension dans l'air en milieu rural.', in. *47e congrès du Groupe Français des Pesticides*, Nancy, France.

Verma, V. *et al.* (2014) 'Reactive oxygen species associated with water-soluble $PM_{2.5}$ in the southeastern United States: spatiotemporal trends and source apportionment', *Atmospheric Chemistry and Physics*, 14(23), pp. 12915–12930. doi: https://doi.org/10.5194/acp-14-12915-2014.

Verstraeten, S. V., Aimo, L. and Oteiza, P. I. (2008) 'Aluminium and lead: molecular mechanisms of brain toxicity', *Archives of Toxicology*, 82(11), pp. 789–802. doi: 10.1007/s00204-008-0345-3.

Viana, M. *et al.* (2007) 'Comparative chemical mass closure of fine and coarse aerosols at two sites in south and west Europe: Implications for EU air pollution policies', *Atmospheric Environment*, 41(2), pp. 315–326. doi: 10.1016/j.atmosenv.2006.08.010.

Viana, M. *et al.* (2014) 'Impact of maritime transport emissions on coastal air quality in Europe', *Atmospheric Environment*, 90, pp. 96–105. doi: 10.1016/j.atmosenv.2014.03.046.

Visentin, M. *et al.* (2016) 'Urban $PM_{2.5}$ oxidative potential: Importance of chemical species and comparison of two spectrophotometric cell-free assays', *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 219, pp. 72–79. doi: 10.1016/j.envpol.2016.09.047.

Voliotis, A. *et al.* (2017) 'New insights on humic-like substances associated with wintertime urban aerosols from central and southern Europe: Size-resolved chemical characterization and optical properties', *Atmospheric Environment*, 166, pp. 286–299. doi: 10.1016/j.atmosenv.2017.07.024.

Vuchetich, P. J. *et al.* (1996) 'Naphthalene-induced oxidative stress in rats and the protective effects of vitamin E succinate', *Free Radical Biology & Medicine*, 21(5), pp. 577–590. doi: 10.1016/0891-5849(96)00161-x.

Waked, A. *et al.* (2018) 'Investigation of the geographical origins of PM_{10} based on long, medium and short-range air mass back-trajectories impacting Northern France during the period 2009–2013', *Atmospheric Environment*, 193, pp. 143–152. doi: 10.1016/j.atmosenv.2018.08.015.

Wang, C. *et al.* (2018) 'Review of arsenic behavior during coal combustion: Volatilization, transformation, emission and removal technologies', *Progress in Energy and Combustion Science*, 68, pp. 1–28. doi: 10.1016/j.pecs.2018.04.001.

Wang, Jian *et al.* (2019) 'Osteopontin potentiates PM-induced IL-1α and IL-1β production via the ERK/JNK signaling pathway', *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 171, pp. 467–474. doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.01.005.

Wang, Jingpeng *et al.* (2019) 'Temporal variation of oxidative potential of water soluble components of ambient $PM_{2.5}$ measured by dithiothreitol (DTT) assay', *Science of The Total Environment*, 649, pp. 969–978. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.08.375.

Wang, L. and Zheng, B. (2008) 'Toxic effects of fluoranthene and copper on marine diatom Phaeodactylum tricornutum', *Journal of Environmental Sciences*, 20(11), pp. 1363–1372. doi: 10.1016/S1001-0742(08)62234-2.

Wang, Y. *et al.* (2018) 'Assessing the cytotoxicity of ambient particulate matter (PM) using Chinese hamster ovary (CHO) cells and its relationship with the PM chemical composition and oxidative potential', *Atmospheric Environment*, 179, pp. 132–141. doi: 10.1016/j.atmosenv.2018.02.025.

Waring, M. S. and Wells, J. R. (2015) 'Volatile organic compound conversion by ozone, hydroxyl radicals, and nitrate radicals in residential indoor air: Magnitudes and impacts of oxidant sources', *Atmospheric Environment*, 106, pp. 382–391. doi: 10.1016/j.atmosenv.2014.06.062.

Weber, S. *et al.* (2018) 'An apportionment method for the oxidative potential of atmospheric particulate matter sources: application to a one-year study in Chamonix, France', *Atmospheric Chemistry and Physics*, 18(13), pp. 9617–9629. doi: https://doi.org/10.5194/acp-18-9617-2018.

Wehr, N. B. and Levine, R. L. (2013) 'Quantification of Protein Carbonylation', *Cell Senescence*, pp. 265–281. doi: 10.1007/978-1-62703-239-1_18.

Weichenthal, S. *et al.* (2017) 'Long-term exposure to ambient ultrafine particles and respiratory disease incidence in in Toronto, Canada: a cohort study', *Environmental Health*, 16(1), p. 64. doi: 10.1186/s12940-017-0276-7.

Wen, J. *et al.* (2018) 'Source contributions to water-soluble organic carbon and water-insoluble organic carbon in $PM_{2.5}$ during Spring Festival, heating and non-heating seasons', *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 164, pp. 172–180. doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.08.002.

Weng, S.-L. *et al.* (2017) 'Investigation and identification of protein carbonylation sites based on position-specific amino acid composition and physicochemical features', *BMC bioinformatics*, 18(Suppl 3), p. 66. doi: 10.1186/s12859-017-1472-8.

Weydert, C. J. and Cullen, J. J. (2010) 'Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue', *Nature Protocols*, 5(1), pp. 51–66. doi: 10.1038/nprot.2009.197.

WHO (2017) *WHO | Ambient air pollution: Pollutants, WHO*. World Health Organization. Available at: http://www.who.int/airpollution/ambient/pollutants/en/ (Accessed: 26 March 2020).

WHO (2018) *WHO | World Health Statistics 2018: Monitoring health for the SDGs*. Available at: http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2018/en/ (Accessed: 27 March 2019).

Wilson, M. R. *et al.* (2002) 'Interactions between ultrafine particles and transition metals in vivo and in vitro', *Toxicology and Applied Pharmacology*, 184(3), pp. 172–179. doi: 10.1006/taap.2002.9501.

Win, M. S. *et al.* (2018) 'Atmospheric HULIS and its ability to mediate the reactive oxygen species (ROS): A review', *Journal of Environmental Sciences*, 71, pp. 13–31. doi: 10.1016/j.jes.2017.12.004.

Winijkul, E. and Bond, T. C. (2016) 'Emissions from residential combustion considering end-uses and spatial constraints: Part II, emission reduction scenarios', *Atmospheric Environment*, 124, pp. 1–11. doi: 10.1016/j.atmosenv.2015.10.011.

Wolff, H. and Perry, L. (2010) 'Policy MonitorTrends in Clean Air Legislation in Europe: Particulate Matter and Low Emission Zones', *Review of Environmental Economics and Policy*, 4(2), pp. 293–308. doi: 10.1093/reep/req008.

Wothe (Henschel), S. *et al.* (2011) 'THE APHEKOM PROJECT – A LITERATURE REVIEW OF AIR POLLUTION INTERVENTIONS AND THEIR IMPACT ON PUBLIC HEALTH', *ISEE Conference Abstracts*, 2011. doi: 10.1289/isee.2011.00123.

Wragg, J. and Klinck, B. (2007) 'The bioaccessibility of lead from Welsh mine waste using a respiratory uptake test', *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 42(9), pp. 1223–1231. doi: 10.1080/10934520701436054.

Wu, C. *et al.* (2019) 'Molecular characterization of water-soluble organic compounds in $PM_{2.5}$ using ultrahigh resolution mass spectrometry', *Science of The Total Environment*, 668, pp. 917–924. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.03.031.

Wu, J. *et al.* (2012) 'In vitro cytotoxicity of Cu2+, Zn2+, Ag+ and their mixtures on primary human endometrial epithelial cells', *Contraception*, 85(5), pp. 509–518. doi: 10.1016/j.contraception.2011.09.016.

Xiang, P. *et al.* (2016) 'Mechanisms of housedust-induced toxicity in human corneal epithelial cells: Oxidative stress, proinflammatory response and mitochondrial dysfunction', *Environment International*, 89–90, pp. 30–37. doi: 10.1016/j.envint.2016.01.008.

Xu, C. *et al.* (2018) 'High molecular weight hyaluronan attenuates fine particulate matter-induced acute lung injury through inhibition of ROS-ASK1-p38/JNK-mediated epithelial apoptosis', *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 59, pp. 190–198. doi: 10.1016/j.etap.2018.03.020.

Xu, F. *et al.* (2018) 'Effects on IL-1β signaling activation induced by water and organic extracts of fine particulate matter ($PM_{2.5}$) in vitro', *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 237, pp. 592–600. doi: 10.1016/j.envpol.2018.02.086.

Xu, F. *et al.* (2020) 'Investigation of the chemical components of ambient fine particulate matter ($PM_{2.5}$) associated with in vitro cellular responses to oxidative stress and inflammation', *Environment International*, 136, p. 105475. doi: 10.1016/j.envint.2020.105475.

Xue, T. and Zhang, Q. (2018) 'Associating ambient exposure to fine particles and human fertility rates in China', *Environmental Pollution*, 235, pp. 497–504. doi: 10.1016/j.envpol.2018.01.009.

Yamamoto, M., Kensler, T. W. and Motohashi, H. (2018) 'The KEAP1-NRF2 System: a Thiol-Based Sensor-Effector Apparatus for Maintaining Redox Homeostasis', *Physiological Reviews*, 98(3), pp. 1169–1203. doi: 10.1152/physrev.00023.2017.

Yan, J. *et al.* (2017) 'Industrial $PM_{2.5}$ cause pulmonary adverse effect through RhoA/ROCK pathway', *The Science of the Total Environment*, 599–600, pp. 1658–1666. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.05.107.

Yang, A. *et al.* (2014) 'Measurement of the oxidative potential of $PM_{2.5}$ and its constituents: The effect of extraction solvent and filter type', *Atmospheric Environment*, 83, pp. 35–42. doi: 10.1016/j.atmosenv.2013.10.049.

Yang, A. *et al.* (2015) 'Temporal and spatial variation of the metal-related oxidative potential of $PM_{2.5}$ and its relation to $PM_{2.5}$ mass and elemental composition', *Atmospheric Environment*, 102, pp. 62–69. doi: 10.1016/j.atmosenv.2014.11.053.

Yang, B.-Y. *et al.* (2019) 'Ambient PM_1 air pollution and cardiovascular disease prevalence: Insights from the 33 Communities Chinese Health Study', *Environment International*, 123, pp. 310–317. doi: 10.1016/j.envint.2018.12.012.

Yao, S. *et al.* (2018) 'Antibacterial activity and inflammation inhibition of ZnO nanoparticles embedded TiO_2 nanotubes', *Nanotechnology*, 29(24), p. 244003. doi: 10.1088/1361-6528/aabac1.

Yu, H. *et al.* (2018) 'Synergistic and Antagonistic Interactions among the Particulate Matter Components in Generating Reactive Oxygen Species Based on the Dithiothreitol Assay', *Environmental Science & Technology*, 52(4), pp. 2261–2270. doi: 10.1021/acs.est.7b04261.

Yu, S. *et al.* (2019) 'Characteristics and oxidative potential of atmospheric $PM_{2.5}$ in Beijing: Source apportionment and seasonal variation', *Science of The Total Environment*, 650, pp. 277–287. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.09.021.

Yuan, Y. *et al.* (2019) 'In vitro toxicity evaluation of heavy metals in urban air particulate matter on human lung epithelial cells', *Science of The Total Environment*, 678, pp. 301–308. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.04.431.

Yue, Z. and Fraser, M. (2004) 'Characterization of Nonpolar Organic Fine Particulate Matter in Houston, Texas Special Issue of Aerosol Science and Technology on Findings from the Fine Particulate Matter Supersites Program', *Aerosol Science and Technology*, 38, pp. 60–67. doi: 10.1080/02786820390229444.

Zhang, X. *et al.* (2020) 'Short-term exposure to ZnO/MCB persistent free radical particles causes mouse lung lesions via inflammatory reactions and apoptosis pathways', *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 261, p. 114039. doi: 10.1016/j.envpol.2020.114039.

Zhang, Y. *et al.* (2017) 'Review of receptor-based source apportionment research of fine particulate matter and its challenges in China', *Science of The Total Environment*, 586, pp. 917–929. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.02.071.

Zhang, Y. *et al.* (2020) 'Chemical compositions and the impact of sea salt in atmospheric PM1 and $PM_{2.5}$ in the coastal area', *Atmospheric Research*, p. 105323. doi: 10.1016/j.atmosres.2020.105323.

Zhang, Z. *et al.* (2019) 'Association of particulate matter air pollution and hospital visits for respiratory diseases: a time-series study from China', *Environmental Science and Pollution Research*, 26(12), pp. 12280–12287. doi: 10.1007/s11356-019-04397-7.

Zheng, G. *et al.* (2013) 'Measurement of humic-like substances in aerosols: A review', *Environmental Pollution*, 181, pp. 301–314. doi: 10.1016/j.envpol.2013.05.055.

Zhou, D., Shao, L. and Spitz, D. R. (2014) 'Chapter One - Reactive Oxygen Species in Normal and Tumor Stem Cells', in Townsend, D. M. and Tew, K. D. (eds) *Advances in Cancer Research*. Academic Press (Redox and Cancer Part A), pp. 1–67. doi: 10.1016/B978-0-12-420117-0.00001-3.

Zhu, Y. *et al.* (2018) 'Sources of particulate matter in China: Insights from source apportionment studies published in 1987–2017', *Environment International*, 115, pp. 343–357. doi: 10.1016/j.envint.2018.03.037.

Zielinski, H. *et al.* (1999) 'Modeling the interactions of particulates with epithelial lining fluid antioxidants', *The American Journal of Physiology*, 277(4), pp. L719-726. doi: 10.1152/ajplung.1999.277.4.L719.

Zoufan, P., Baroonian, M. and Zargar, B. (2020) 'ZnO nanoparticles-induced oxidative stress in Chenopodium murale L, Zn uptake, and accumulation under hydroponic culture', *Environmental Science and Pollution Research*, 27(10), pp. 11066–11078. doi: 10.1007/s11356-020-07735-2.

Annexes

Annexe 1

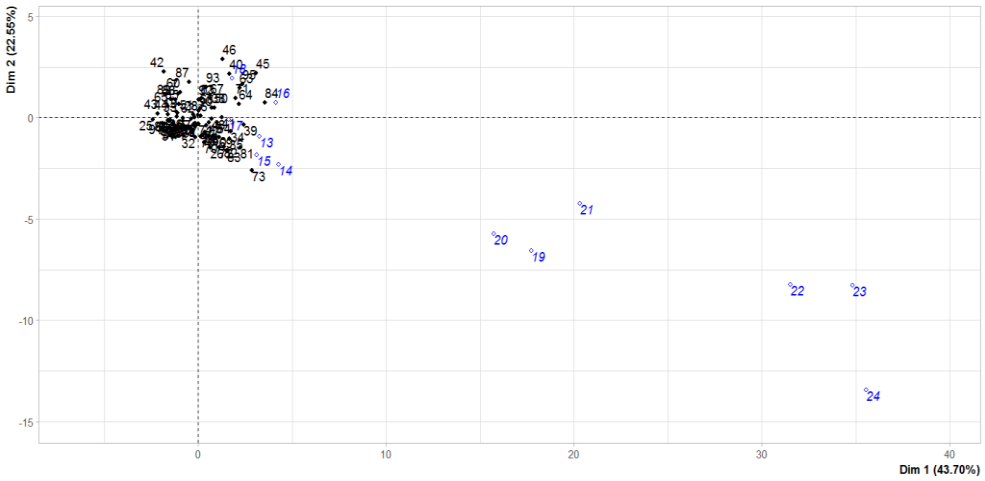
Coefficient de corrélation (Spearman) entre les valeurs de OP et les paramètres cellulaires, les teneurs en HAP (n=48), et en métaux (n=24). Seule les corrélations avec p <0,05 sont reportées (*p <0,01 ; ** p <0,001 ; T_Mtx1 : somme des concentrations en Co, Cr, Cu, Mo, Ni, Ti, V ; THAP : Sommes des concentrations des 16 HAP prioritaires USEPA ; T_Mtx2 : idem T_Mtx1 + Mn ; T_Mtx3 : idem T_Mtx1 + Mn + Fe ; T_Mtx4 : idem T_Mtx1 + Mn + Fe + Ba, Pb, Sn, Sn, Zn).

	Fraction Hydro (n=8)		**Fraction EO (n=8)**		**Fraction Hydro + fraction EO (n=16)**	
	OP_AAm	**OP_DTTm**	**OP_AAm**	**OP_DTTm**	**OP_AAm**	**OP_DTTm**
OP_AAm				0,93**		0,42*
OP_DTTm			0,93**		0,42*	
THAP			0,45		0,45	
T_Mtx1 (PM)	0,71**					
T_Mtx2 (PM)						
T_Mtx3 (PM)						
T_Mtx4 (PM)						
Corrélations par rapport aux ions éléments et HAP	As : 0,47 Cr : 0,53* Cu : 0,62* K : 0,57* Mo : 0,61* Pb : 0,43 Sn : 0,64* Sr : 0,55*	Na : 0,50 Ni : 0,69** F^- : 0,54 Cl^- : 0,60*	Acy : 0,79** Flu : 0,45 Chr : 0,62* BbF : 0,55* BkF : 0,55* BaP : 0,52* InPy : 0,76* DahA : 0,50 BghiP : 0,64*	Acy : 0,76** Chr : 0,55* BbF : 0,45 BkF : 0,45 InPy : 0,60* BghiP : 0,52*		

Annexe 2

Analyse en composantes principales concernant toutes les fractions des échantillons réels de $PM_{2,5\text{-}0,3}$; Carte des individus pour axe1 - axe2.

L'échantillon SRM considéré en supplémentaire. La justification est visible sur le graphe suivant où les fractions PM (points 22, 23 et 24) et hydrosolubles (points 19, 20 et 21) du SRM montrent clairement des caractéristiques différentes. La classification faisait par ailleurs ressortir ces fractions comme étant très différentes des autres échantillons considérés ; par extension aucune fraction des SRM n'a été considérée.



Résumé

La pollution atmosphérique par les particules en suspension « PM » dans l'air constitue une préoccupation actuelle majeure en raison de ses effets délétères sur la santé humaine. Aujourd'hui, un manque de connaissances demeure vis-à-vis du rôle spécifique de certains constituants des particules et des différentes fractions des PM sur l'apparition du stress oxydant. La capacité des PM à déclencher la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) en cause dans le stress oxydant peut également être renseignée par des méthodes chimiques de potentiel oxydant. Cette thèse vise à étudier le potentiel oxydant et le stress oxydant induit par les différentes fractions d'échantillons de particules $PM_{2,5}$ collectées sur des sites de typologies urbaine, trafic routier et industrielle. Le potentiel oxydant (OP) a été évalué par la mesure de la vitesse d'oxydation de l'acide ascorbique (AA) et du dithiothréitol (DTT). Il a été montré que les deux tests de potentiel apportaient des informations complémentaires, OP-AA normalisé au volume étant relié aux concentrations de $PM_{2,5}$ et aux sources de combustion, tandis que OP-DTT s'avère être sensible aux sources de particules émettant des métaux. Le stress oxydant a été étudié en quantifiant les ERO, les atteintes oxydatives aux protéines (protéines carbonylées), à la membrane plasmique (8-isoprostane) et à l'ADN (8-OHdG). Les particules totales sont capables d'induire la surproduction des ERO et de causer des dommages aux protéines, à des niveaux plus élevés que les autres fractions. Des altérations plus grandes de la membrane plasmique et de l'ADN ont été constatées avec la fraction particulaire et les extraits organiques des échantillons de $PM_{2,5-0,3}$ provenant du site urbain. Il n'a pas été trouvé de corrélation entre le potentiel oxydant et les dommages oxydatifs aux macromolécules biologiques, ce qui signifie que ces mesures de OP ne permettraient pas de prédire les dommages cellulaires *in vitro* que nous avons suivis dans cette étude. Une approche plus globale, considérant notamment la mobilisation du système anti-oxydant dans la réponse cellulaire, pourrait permettre de mieux appréhender l'apport de la mesure du potentiel oxydant dans la compréhension des effets des PM en lien avec le stress oxydant cellulaire.

Mots-clés : Particules fines, $PM_{2,5}$, cytotoxicité, inflammation, potentiel oxydant, stress oxydant, éléments majeurs et traces métalliques, hydrocarbures aromatiques polycycliques.

Abstract

Air pollution by airborne particulate matter (PM) is a current major concern because of its harmful effect on human health. Nowadays, a lack of knowledge remains regarding the specific role of certain PM components, and the different PM fractions on the occurrence of oxidative stress. The ability of PM to trigger the production of reactive oxygen species (ROS) involved in oxidative stress can also be assessed by chemical methods of oxidative potential (OP). This thesis aims at studying the oxidative potential and the oxidative stress induced by the different fractions of $PM_{2.5}$ samples collected in urban, traffic, and industrial sites. OP was evaluated by measuring the depletion rate of ascorbic acid (AA) and dithiothreitol (DTT). Both tests were shown to provide complementary information, with volume normalized OP-AA being related to $PM_{2.5}$ concentrations and combustion sources, while OP-DTT was found to be sensitive to metal-emitting particle sources. Oxidative stress was studied by quantifying ROS, oxidative damage to proteins (carbonyl proteins), cell membrane (8-isoprostane) and DNA (8-OHdG). Total particles are capable of inducing ROS overproduction, causing damage to proteins, at higher levels than other fractions. Higher cell membrane damage and DNA damage were found with the particulate fraction and organic extracts of $PM_{2.5-0.3}$ samples from the urban site. No correlation was found between oxidative potential and oxidative damage to biological macromolecules, which means that these OP measurements are not predictive of the *in vitro* cellular damages that were followed in this study. A more global approach, considering the mobilization of the antioxidant system in the cellular response, could allow a better understanding of the contribution of the oxidative potential in the understanding of PM effects, in relation to cellular oxidative stress.

Keywords: Fine particulate matter, $PM_{2.5}$, cytotoxicity, inflammation, oxidative potential, oxidative stress, major elements and trace metals, polycyclic aromatic hydrocarbons.