Thèse de Doctorat

Mention : Biologie, médecine, santé
Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

présentée à ***l'Ecole Doctorale en Sciences Technologie et Santé (ED 585)***

de l'Université du Littoral Côte d'Opale

par

Stéphanie ALKOUSSA

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université du Littoral Côte d'Opale

Contribution des fractions chimiques et des voies de signalisation à la toxicité pulmonaire des $PM_{2.5}$ et à la production des vésicules extracellulaires

Soutenue le 23 mars 2022, après avis des rapporteurs, devant le jury d'examen :

M. François HUAUX, Pr., Université Catholique de Louvain, Belgique	**Rapporteur**
M. Christophe LEFEBVRE, Pr., Université de Lille, France	**Rapporteur**
Mme Armelle BAEZA-SQUIBAN, Pr., Université de Paris, France	**Présidente du jury**
Mme Odile SERGENT, Pr., Université de Rennes, France	**Examinatrice**
M. Sylvain BILLET, Dr., Université du Littoral Côte d'Opale, France	**Directeur de thèse**

Remerciements

Je tiens à remercier l'**Université du Littoral Côte d'Opale** et le **Pôle Métropolitain de la Côte d'Opale** pour leur soutien financier qui m'a permis de réaliser cette thèse.

A Professeur Odile SERGENT et à Professeur Armelle BAEZA-SQUIBAN,
Membres de mon comité de suivi individuel, je vous remercie, tout d'abord d'avoir accépté de juger mon travail plusieurs fois et d'être les examinatrices de ma thèse. Merci à vous pour vos nombreux commentaires constructifs, pour votre exigence et votre rigueur qui m'ont permis d'améliorer mon travail. Vos suggestions et vos conseils avisés m'ont vraiment encouragé.

A Professeur Christophe LEFEBVRE,
En premier lieu, je tiens à vous remercier de l'accueil que vous m'avez réservé au sein du Laboratoire PRISM, qui m'a permis de mener à bien les analyses du Nanosight particle tracking analyses. Je vous remercie également d'avoir accepté d'évaluer mon travail en tant que rapporteur de ma thèse.

A Professeur François HUAUX,
Je tiens à vous remercier d'avoir accepté d'être le rapporteur de cette thèse.

A Docteur Perrine MARTIN et Docteur Sylvain BILLET,
Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée. Vous avez fait de moi une personne forte ayant toutes les qualités requises pour être un bon chercheur, autonome, créative et capable de travailler de façon indépendante et en équipe, Merci !

Aux membres du laboratoire Chimie et Toxicologie des Emissions Atmosphériques, Professeur Dominique COURCOT, Professeur Frédéric LEDOUX, Docteur Anthony VERDIN et Docteur Yann LANDKOCZ, je vous remercie de m'avoir accueilli au sein de ce laboratoire adapté pour la réalisation des travaux pratiques de ma thèse. Je vous remercie d'être toujours à l'écoute, pour vos encouragements et vos conseils avisés grandement appréciés. J'ai apprecié également vos commentaires et vos suggestions et nos discussions scientifiques lors de mes présentations orales qui m'ont toujours permis d'avancer dans mon travail.
A ceux qui ont partagé le terrain avec moi, **Marc, Nour, Margaux, Yamina et Salimatha**, je voudrais vous adresser toute ma reconnaissance pour la solidarité dont vous avez fait preuve tout au long de cette aventure. Je vous remercie pour les beaux moments inoubliables partagés

durant ces trois années. Je retiens que nous constituons désormais une famille au-delà de la recherche.

A Coralie PUSCA et François DELATTRE,

J'ai sincèrement apprécié vos conseils, vos encouragements et nos discussions personnelles et professionnelles. Je vous adresse ce remerciement spécial car, malgré toutes vos occupations, vous étiez toujours disponibles pour moi, toujours présents pour m'aider à surmonter les obstacles que j'ai rencontré durant la thèse. C'était vraiment un grand plaisir de faire votre connaissance.

A tous les doctorants et les collègues de la MREI 1 et 2,

Je tiens à remercier **Rebecca, Murielle, Myriam, Layla, Sara, Tarek, Nancy, Tracy, Clémence, Pedro, Lillian, Bastien, Ghidaa, Layal, Hadi, Khaoula, Abir, Maribelle, Michel, Bouthayna, Fatima, Ghoufrane et Hamed** pour les beaux moments, pour les soirées de jeux et pour l'ambiance agréable partagés pendant ces trois années.

Et il y a ces personnes qui, d'une façon particulière, vous permettent de vous réaliser.

A mes collocataires Lamia et Mia,

Je tiens à vous exprimer mes vifs remerciements. Vous étiez toujours à mes côtés. Merci de m'aider à surmonter les difficultés et le stress de la thèse, chacune à sa façon. Nous avons partagé des moments inoubliables, des belles soirées d'anniversaire et beaucoup de repas gastronomiques. Merci du fond du cœur !

A Romy IBRAHIM,

Un remerciement spécial à toi, ma meilleure amie aux Liban. Malgré la distance qui nous sépare, on n'a pas perdu le contact. Merci d'avoir prié et continué de prier pour moi, tu m'as soutenu, encouragé et motivé. J'ai de la chance de t'avoir à mes cotés.

Que tous ceux, trop nombreux pour être cités nommément, qui de près ou de loin m'ont aidé, aussi bien dans la vie en général que dans la réalisation de ce travail, trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude.

A mes grand-parents, à mes parents Amal et Georges, à mon frère Elie et ma sœur Cynthia,

Je vous remercie pour vos prières, vos sacrifices et vos soutiens que vous m'avez accordé tout au long de ces neuf années d'études… Ça y est, c'est enfin fini ! Vous avez fait de moi ce que je suis par toutes les valeurs que vous m'avez transmises. Merci pour vos encouragements inconditionnels. Sans vous je n'étais pas aujourd'hui là où je suis !

A Joe,

Toute ma famille en France, aucun mot n'est assez fort pour t'exprimer ma gratitude pour ton soutien, ta patience, ta gentillesse et bien d'autres choses. Tu es mon pilier, mon énergie, ma motivation, je ne serai certainement pas arrivée au bout de ce projet sans ton soutien, si précieux.

Ma source de force, je vous aime fort !

Cette thèse, c'est à vous que je la dédie.

Valorisations scientifiques

Article publié :

- Stéphanie ALKOUSSA, Sébastien HULO, Domonique COURCOT, Sylvain BILLET, Perrine MARTIN, 2020. Extracellular vesicles as actors in the air pollution related cardiopulmonary diseases. Critical Reviews in Toxicology. 50, 402–423. Https://doi.Org/10.1080/10408444.2020.1763252. If: 5.313.

Article soumis:

- Stéphanie ALKOUSSA, Perrine J. MARTIN, Frédéric LEDOUX, Sylvain BILLET, Identification of crosstalk between the toxicity pathways of fine particulate matter and of their organic and water-soluble fraction using specific inhibitors of oxidative stress, TLR4 and AhR pathways. *Soumis à Environmental Pollution.*

Communications affichées nationales :

- Stéphanie ALKOUSSA, Sylvain BILLET, Dominique COURCOT, Perrine J. MARTIN. Isolation optimization of extracellular vesicles released by lung epithelial cells exposed to fine particulate matter or its organic and inorganic extract. Congrès 2019 de la "french society of extracellular vesicles" (FSEV), nantes, 14-15 octobre 2019.

- Stéphanie ALKOUSSA, Perrine J. MARTIN, Sylvain BILLET. Mécanismes d'action impliqués dans la toxicité des $PM_{2.5}$ dans les cellules épithéliales pulmonaires. "Journées jeunes chercheurs SFR Condorcet 2021", 14-15 janvier 2021.

Communication affichée internationale :

- Stéphanie ALKOUSSA, Sylvain BILLET, Perrine MARTIN, 2021. Particulate matter air pollution and evs: pm-fraction and pm-activated toxic signaling pathways involved in evs release by pulmonary epithelial cells. Congrès de "international society of extracellular vesicles" (ISEV), 18-21 mai 2021.

Table des matières

Remerciements **3**

Valorisations scientifiques **6**

Liste des figures **13**

Liste des tableaux **17**

Liste des abréviations **18**

Introduction générale **22**

CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE 29

Partie A : La pollution atmosphérique particulaire **29**

1. La pollution de l'air 29

1.1. Définition 29

1.2. Principaux polluants atmosphériques 30

2. La pollution particulaire 32

2.1. Définition 32

2.2. Taille des PM 32

2.3. Sources des PM 33

2.3.1. Sources naturelles 34

2.3.2. Sources anthropiques 34

2.4. Composition chimique des PM 36

2.5. Recommandation de l'OMS 38

2.6. Impact sanitaire des particules atmosphériques 39

2.6.1. Physiologie de l'appareil respiratoire 39

2.6.2. Pénétration et dépôt des PM dans l'appareil respiratoire 42

2.6.3. Epidémiologies des maladies respiratoires causées par les PM 43

Partie B : Vésicules extracellulaires **46**

1. Découverte des vésicules extracellulaires 46

2. Les exosomes 47

2.1. Définition des exosomes 47

2.2. Biogénèse des exosomes 48

2.2.1. Rôle de la machinerie ESCRT 49

2.2.2. Rôle des tétraspanines 50

2.2.3. Rôle des céramides 51

3. Microvésicules 51

3.1. Définition des microvésicules 51

3.2. Biogénèse des microvésicules 52

3.2.1. Asymétrie de la membrane plasmique 53
3.2.2. Externalisation de la PS dépendante du Ca^{2+} 54
3.2.3. Remodelage du cytosquelette Ca^{2+}-dépendant et génération des MV 54
4. Composition des VE en lipides, protéines et acides nucléiques 55
4.1. Composition lipidique 56
4.2. Composition protéique 57
4.3. Composition en acides nucléiques 58
5. Interaction des VE avec les cellules cibles 59
5.1. Liaison des VE à leurs cellules cibles 59
5.2. Internalisation et devenir intracellulaire des VE 60
6. Vésicules extracellulaires pulmonaires 60
6.1. Cellules pulmonaires productrices de VE 60
6.2. Maladies pulmonaires associées aux VE 63
Partie C : Toxicité des PM et Vésicules extracellulaire 66
1. Stress oxydant 66
1.1. Définition du stress oxydant 66
1.2. Espèces réactives de l'oxygène 66
1.3. Systèmes de défense antioxydants 66
1.4. Mécanismes de defense antioxydant dépendant du Nrf2 67
1.5. Effets toxiques du stress oxydant 68
1.5.1. Peroxydation lipidique 69
1.5.2. Modification des protéines 69
1.5.3. Oxydation de l'ADN 70
1.6. Stress oxydant et PM 70
1.6.1. Stress oxydant induit par les PM entières 71
1.6.2. Stress oxydant induit par la fraction organique des PM 72
1.6.3. Stress oxydant induit par les métaux de transitions des PM 72
1.7. Stress oxydant et VE 72
1.7.1. Effet du stress oxydant sur la sécrétion des VE 73
1.7.2. Effet du stress oxydant sur la composition des VE 73
2. Inflammation 74
2.1. Généralités sur le système immunitaire 74
2.1.1. Le système immunitaire inné 74
2.1.2. Le système immunitaire adaptatif 75
2.2. Activation de l'inflammation 76
2.2.1. Les PAMP et DAMP comme activateurs de l'inflammation 76

2.2.2. Récepteurs et corécepteurs de l'inflammation 77
2.2.3. Reconnaissance des PAMP par les TLR 78
2.2.4. Signalisation du TLR4 79
2.3. PM, Stress oxydant et inflammation 81
2.3.1. Les PM induisent l'inflammation *via* le stress oxydant 81
2.3.2. Les PM induisent l'inflammation indépendamment du stress oxydant 82
2.4. VE et inflammation 82
3. Activation métabolique des HAP 83
3.1. Biotransformation et de l'activation métabolique des xénobiotiques 83
3.2. Processus de bioactivation des HAP 84
3.3. Activation métabolique induite par les PM 85
3.4. AhR, activation métabolique et cancérogénèse 85
3.4.1. Rôle de l'AhR dans l'activation métabolique des HAP des PM 85
3.4.2. Signalisation de l'AhR 86
3.5. Activation métabolique et sécrétion des VE 87
4. Effet des PM sur les VE 88
4.1. Effets des PM sur la sécrétion des VE 89
4.1.1. Études humaines 89
4.1.2. Etudes *in vitro* 89
4.2. Effets des PM sur la composition des VE 90
4.2.1. Etudes humaines 90
4.2.2. Etudes *in vitro* 91
4.3. Effets des VE produites après exposition aux PM 91
Problématique et objectifs de la thèse 93

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES 99
Partie A : Evaluation de la toxicité des $PM_{2.5}$ 99
1. Prélèvement et caractérisation des PM 99
2. Culture cellulaire 101
2.1. Matériel biologique 101
2.2. Culture des cellules BEAS-2B 102
3. Exposition des cellules 102
3.1. Préparation des solutions d'exposition aux $PM_{2.5}$ et leurs extraits 102
3.2. Exposition des cellules aux inhibiteurs 103
3.2.1. Optimisation de l'inhibition de la voie AhR 103
3.2.2. Optimisation de l'inhibition de la voie TLR4 104

3.2.3. Optimisation de l'inhibition du stress oxydant 105
4. Méthodes d'analyse toxicologique 107
4.1. Test de cytotoxicité globale 107
4.1.1. Mesure de l'activité de la LDH 107
4.1.2. Alamar blue 108
4.2. Etude de l'expression génique par RT-qPCR 108
4.3. Evaluation de la production des cytokines pro-inflammatoires par ELISA 110
4.4. Quantification de la production des espèces réactives de l'oxygène 111
5. Analyses statistiques 112
Partie B : Isolement et caractérisation des vésicules extracellulaires 113
1. Isolement des VE par SEC 113
2. Caractérisation des VE isolées 116
2.1. Comptage des VE par nanosight particle tracking analysis 116
2.2. Western blot 118

CHAPITRE III : FRACTIONS ET VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUEES DANS LA TOXICITE DES $PM_{2.5}$ 124
1. Introduction 124
2. Evaluation de la cytotoxicité et de la viabilité cellulaire 124
3. Etude de la réponse oxydante par quantification de la production des ROS 125
4. Etude de la réponse inflammatoire 129
4.1. Etude de l'expression génique de l'IL-6 129
4.2. Quantification de la production de l'IL-6 133
5. Etude de la réponse métabolique par quantification de l'expression génique des enzymes de métabolisation 137
5.1. Etude de l'expression génique du CYP1A1 137
5.2. Etude de l'expression génique de la GSTM1 141
6. Discussion 146
6.1. Evaluation de la cytotoxicité et de la viabilité cellulaire 147
6.2. Fractions et voies de signalisation impliquées dans l'induction stress oxydant par les $PM_{2.5}$ 147
6.3. Fractions et voies de signalisation impliquées dans la réponse inflammatoire induite par les $PM_{2.5}$ 149
6.4. Fractions et voies de signalisation impliquées dans l'expression génique des enzymes de métabolisation des xénobiotiques 151
7. Conclusion 153

CHAPITRE IV : EFFETS DES $PM_{2.5}$ SUR LA SECRETION DES VESICULES EXTRACELLULAIRES 158

Partie A : Optimisation de l'isolement des VE 158

Partie B : Fractions et voies de signalisation les plus impliquées dans l'induction de la sécrétion des VE par les $PM_{2.5}$ 163

1. Choix des conditions d'exposition aux $PM_{2.5}$.....163
2. Détermination de l'influence de la fraction chimique des $PM_{2.5}$ dans la sécrétion des VE 165
3. Voies de signalisation impliquées dans la sécrétion des VE 168
4. Discussion 171
   4.1. Fractions des $PM_{2.5}$ impliquées dans la libération des VE 173
   4.2. Mécanismes de toxicité induits par les $PM_{2.5}$ impliquées dans la libération des VE.....174
5. Conclusion.....177

Conclusions générales et perspectives..... 183

Références bibliographiques 190

Annexe……...229

Liste des figures

Figure 1: Distribution des pourcentages de décès dus aux maladies pulmonaires et cardiovasculaires causées par la pollution atmosphérique. 30
Figure 2: Classification granulométrique des particules atmosphériques. 33
Figure 3: Sources d'émission de PM_{10} et de $PM_{2.5}$ en Ile-de-France en 2018 (AirParif, 2020). 33
Figure 4: Composition relative moyenne des $PM_{2.5}$ en France observée aux stations de réseau MERA entre 2011 et 2019 (LSCQA, 2020). 37
Figure 5: Anatomie de l'appareil respiratoire 39
Figure 6: Structure de l'épithélium respiratoire. 42
Figure 7: Pénétration et dépôt des PM dans les voies respiratoires 43
Figure 8: Impact sanitaire de l'exposition aux particules fines. 44
Figure 9 : Exocytose des vésicules endosomales après fusion d'un corps multivésiculaire avec la membrane plasmique (Harding et al., 1983). 47
Figure 10: Biogénèse et sécrétion des exosomes (van Niel et al., 2018). 49
Figure 11: Composition et interactions moléculaires de la machinerie ESCRT (Raiborg and Stenmark, 2009). 50
Figure 12: Première observation du bourgeonnement de la membrane plasmique et de la sécrétion des microvésicules (Dalton, 1975) 52
Figure 13: Biogénèse des microvésicules (van Niel et al., 2018). 53
Figure 14: Échange de phospholipides régulé par les transporteurs entre les deux feuillets lipidiques de la membrane cellulaire (Zwaal et al., 2005). 54
Figure 15: Rôle du calcium dans la sécrétion des MV (Turturici et al., 2014). 55
Figure 16: Représentation schématique de la composition des VE. 56
Figure 17: Mécanismes par lesquels les VE interagissent avec les cellules cibles (Turturici et al., 2014). 59
Figure 18: Cellules productrices de vésicules extracellulaires pulmonaires. 61
Figure 19: Mécanisme de défense enzymatique contre le stress oxydant. 67
Figure 20: Voie de signalisation de Nrf2. 68
Figure 21: Mécanisme de peroxydation des lipides membranaires insaturés provoquée par les radicaux libre et les ROS (Sachdeva et al., 2014). 69
Figure 22: Représentation schématique des modifications des résidus thiols des protéines par les ROS (Benedikter et al., 2018a). 70
Figure 23: Réponse immunitaire induite après fixation des PAMP et des DAMP sur les récepteurs PRR exprimés à la surface de diverses cellules immunitaires (Kono and Rock, 2008). 75
Figure 24: Voies de signalisation impliquées dans l'inflammation induite par les DAMP. 77
Figure 25: Classification des récepteurs de la famille des TLR en fonction de leur localisation et de la nature des ligands reconnus. 79
Figure 26: Signalisation de TLR4 dépendante de MyD88. 80
Figure 27: Les PM induisent l'inflammation dépendamment ou indépendamment du stress oxydant. 82
Figure 28: Bioactivation des HAP. 85
Figure 29: Voie de signalisation de l'AhR. 87

Figure 30: Représentation schématique des mécanismes identifiés impliqués dans la modification de la libération et de la composition des VE après exposition aux PM. 92
Figure 31: Stratégie expérimentale adoptée dans notre thèse. 95
Figure 32: Observation microscopique des cellules épithéliales bronchique BEAS-2B (x200). 101
Figure 33: Quantification de l'expression génique du CYP1A1 suite au traitement des cellules par 10 µM de CH223191 et leur exposition à deux concentrations de $PM_{2.5}$ (3 et 15 µg/cm^2) pendant 24 et 48h. 104
Figure 34: Quantification de la production d'IL-6 après exposition des cellules BEAS-2B à 3 et 15 µg/cm^2 de $PM_{2.5}$ en présence ou en absence de TAK-242 (1µM). 105
Figure 35: Quantification de la production de ROS dans les cellules BEAS-2B exposées à 3 et 15 µg/cm^2 de $PM_{2.5}$ en absence ou en présence de 2 concentrations de NAC (5 mM et 10 mM). 106
Figure 36: Principe du test de l'activité du lactate déshydrogénase (LDH). 107
Figure 37: Principe du test de la viabilité cellulaire: Alamar Blue. 108
Figure 38: Protocole de la quantification de la production des cytokines selon le protocole "Biolegend ELISA MAX ™ Deluxe Set human IL-6". 111
Figure 39: Principe de la quantification de la production des ROS par les cellules BEAS-2B par la sonde H_2DCFDA. 111
Figure 40: Principe de l'isolement des vésicules extracellulaire (VE) par la méthode de la chromatographie d'exclusion stérique (SEC). 114
Figure 41: Protocole de préparation de milieu conditionné concentré pour l'isolement des VE par la méthode SEC. 115
Figure 42: Principe du nanosight particle tracking analysis utilisé pour la caractérisation des VE. 117
Figure 43: Images représentatives des concentrations de particules pour les mesures de taille et de concentration d'un échantillon par NTA. 117
Figure 44: Pourcentage de la production des ROS après exposition aux $PM_{2.5}$ et leurs extraits. 126
Figure 45: Etude de l'implication de la voie AhR, TLR4 et stress oxydant dans la production des ROS. 128
Figure 46: Quantification de l'expression génique de l'IL-6. 130
Figure 47: Quantification de l'expression génique de l'IL-6 après inhibition de la voie AhR, TLR4 et le stress oxydant. 132
Figure 48: Quantification de la production de l'IL-6 induite par les $PM_{2.5}$ et leurs extraits. 134
Figure 49: Quantification de la production de l'IL-6 après inhibition des 3 voies de signalisation étudiées. 136
Figure 50: Quantification de l'expression génique du CYP1A1 suite à l'exposition aux $PM_{2.5}$ et leurs extraits organiques et hydrosolubles. 138
Figure 51: Quantification de l'expression génique du CYP1A1 suite à l'inhibition de la voie AhR, TLR4 et le stress oxydant. 140
Figure 52: Quantification de l'expression génique de GSTM1 et NQO1 suite à l'exposition aux $PM_{2.5}$ et leurs extraits organique et hydrosoluble. 142
Figure 53: Quantification de la production de GSTM1 après inhibition des 3 voies de signalisation étudiées. 145

Figure 54: schéma représentant les conclusions retirées..... 155
Figure 55: Quantification par NTA des VE isolées par 4 protocoles différents..... 159
Figure 56: Quantification par NTA des VE isolées par SEC ou ODG. 161
Figure 57: Caractérisation par western blot des VE isolées par SEC ou ODG à partir du surnageant des cellules BEAS-2B exposées aux $PM_{2.5}$. 162
Figure 58: Quantification par NTA des VE isolées par SEC à partir du surnageant des cellules BEAS-2B exposées aux $PM_{2.5}$..... 164
Figure 59: Caractérisation par western blot des VE isolées par SEC à partir du surnageant des cellules BEAS-2B exposées aux $PM_{2.5}$. 165
Figure 60: Quantification par NTA des VE isolées par SEC à partir du surnageant des cellules BEAS-2B exposées aux $PM_{2.5}$ et à leurs extraits..... 166
Figure 61: Caractérisation par western blot des VE isolées par SEC à partir du surnageant des cellules BEAS-2B exposées aux $PM_{2.5}$ et à leurs extraits. 167
Figure 62: Quantification par NTA des VE isolées par SEC à partir du surnageant des cellules BEAS-2B prétraitées ou non par les 3 inhibiteurs puis exposées ou non aux $PM_{2.5}$. 169
Figure 63: Caractérisation par western blot des VE isolées par SEC à partir du surnageant des cellules BEAS-2B traitées par les inhibiteurs et exposées ou non aux $PM_{2.5}$. 171
Figure 64: Schéma représentatif des conclusions retirées : Voies de signalisation impliquées dans la sécrétiuon des VE suite à l'exposition des cellules BEAS-2B aux $PM_{2.5}$. 179

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques et sources des principaux polluants atmosphériques. 31
Tableau 2: Valeurs recommandées pour les particules atmosphériques par l'OMS et l'UE en 2021. 38
Tableau 3: Liste des protéines communément trouvées dans les exosomes. 57
Tableau 4: Concentrations des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) contenus dans les $PM_{2.5}$ collectées à Dunkerque. 100
Tableau 5: Concentration des ions et des métaux principaux détectés au sein des $PM_{2.5}$ collectées à Dunkerque. 101
Tableau 6: Liste des composés utilisés comme contrôle positif selon le paramètre étudié. 103
Tableau 7: Concentrations optimales choisies pour chaque inhibiteur. 106
Tableau 8: Référence des amorces TaqMan utilisées dans l'étude de l'expression des gènes impliqués dans la voie AhR et dans l'inflammation. 110
Tableau 9: Liste des marqueurs vésiculaires testés par western blot. 119

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AhR	Aryl hydrocarbon receptor
Alix	ALG-2interacting protein X
Ap-1	Activator protein 1
ARN	Acide ribonucléique
ARNT	AhR nuclear translocator
AVC	Accident vasculaire cérébral
BALF	Bronchoalveolar lavage fluid
BaP	Benzo[a]pyrène
BC	Black carbon
BPCO	Bronchopneumopathie chronique obstructive
CAT	Catalase
CCM	Concentrated conditional medium
CI	Cardiopathie ischémique
CIRC	Centre internationale de recherche sur le cancer
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CO	Monoxyde de carbone
COV	Composé organique volatil
CSE	Cigarette smoke extract
CYP	Cytochrome P450
Cys	Cystéine
Dae	Diamètre aérodynamique équivalent
DAMP	Danger-associated molecular pattern
DCF	2',7'-Dichlorofluorescéine
DEP	Diesel exhausted particle
DMSO	Dimethyl sulfoxyde
EH	Extrait hydrosoluble
Ehm	Epoxyde hydrolase microsomale
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMP	Endothelial microparticle
EO	Extrait organique
ERA	Element de reponse antioxydante
ERK	Extracellular signal-regulated protein kinase
ESCAPE	European study of cohorts for air pollution effects
ESCRT	Endosomal sorting complex required for transport
GPx	Glutathion peroxydase
GRx	Glutathion reductase
GST	Glutathion S-tranférase
H_2DCFDA	2',7'-Dichlorodihydrofluorescéine diacétate
H_2DCF	2',7'-Dichlorodihydrofluorescéine
H_2O_2	Peroxyde d'hydrogène
HAP	Hydrocarbure aromatique polycyclique
HMOX	Hème oxygénase

$HO^{\cdot}$	Radical hydroxyl
HSP	Heat shock protein
ICC	Insuffisance cardiaque congestive
IKK	I kappa B kinase
IL	Interleukine
ILV	Intraluminal vesicles
IM	Infractus de myocarde
IRAK	IL-1R- associated protein kinase
Keap-1	Kelch-like-ECH associated protein
LB	Lymphocyte B
LDH	Lactate déshydrogénase
LPS	Lipopolysaccharide
MA	Macrophage alvéolaire
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MDA	Malondialdéhyde
MET	Microscopie electronique à transmission
MV	Microvésicule
MVE	Multivesicular endosomes
MyD88	Myeloid differentiation 88
NAC	N-acétyl cystéine
NFkB	Nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells
NH_3	Ammoniac
NO_x	Oxydes d'azote
NQO1	NADPH quinone oxydoreductase 1
Nrf2	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
NTA	Nanosight particle tracking analysis
OMS	Organisation mondiale de la santé
$O_2^{\cdot -}$	Ion superoxyde
P23	Protéine 23
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PBS	Phosphate buffer solution
PC	Phosphatidylcholine
PCR	Polymerase chain reaction
PI3P	Phosphatidylinositol-3-phosphate
PM	Particulate matter
PMN	polynucleic neutrophils
PRR	Pattern recognition receptor
PS	Phosphatidylsérine
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SEC	Size exclusion chromatography
SM	Sphingomyéline
SOD	Superoxyde dismutase
SO_x	Oxydes de soufre
Sph	Sphingolipide

SULT	Sulfotransférase
RE	Réticulum endoplasmique
ROS	Reactive oxygen species
TAK	TGF-β activated kinase
TGF-β	Tumor growth factor β
TF	Tissue factor
TLR	Toll like receptor
TNF	Tumor necrosis factor
TRAF	Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6
Tsg101	Tumor suppressor gene
UE	Union européenne
UGT	UDP-glucuronyl transférase
VE	Vésicule extracellulaire
VEGF	Vascular endothelial frowth factor
WB	Western blot
XAP2	HBV X-associated protein 2

Introduction générale

La pollution atmosphérique n'est pas un phénomène recent, bien qu'il soit difficile de dater son apparition. Au milieu du XXème siècle, une corrélation entre la mauvaise qualité de l'air et les maladies humaines a été reconnue. En 1930, du dioxyde de soufre provenant des émissions d'usines locales s'est mélangé à un brouillard au-dessus de la vallée de la Meuse en Belgique, causant la mort de 60 personnes à cause des maladies respiratoires (Nemery et al., 2001). En décembre 1952, un brouillard dense contenant du dioxyde de soufre et des particules de fumée s'est abattu sur Londres, connu comme "le Smog de Londre", entraînant une surmortalité de plus de 3 000 personnes en 3 semaines et de 12 000 personnes jusqu'en février 1953 (Bell and Davis, 2001).

Selon l'OMS, l'exposition à la pollution atmosphérique est responsable d'environ 7 millions de décès prématurés par an dans le monde (WHO, 2018). Ce taux de mortalité pourrait doubler d'ici 2050 si des mesures à grande échelle et des solutions locales ne sont pas adoptées, confirmant ainsi que la pollution atmosphérique est désormais le plus grand risque sanitaire environnemental au monde, causant plus de décès que le paludisme et le sida (Lelieveld et al., 2019, 2015; Piqueras and Vizenor, 2016).

La pollution de l'air extérieur consiste en un mélange de constituants, gazeux ou particulaires, provenant de nombreuses sources naturelles mais surtout anthropiques comme le transport, la production d'électricité, les processus industriels, la combustion de la biomasse, le chauffage domestique et la cuisson (Nurkiewicz et al., 2010; Thurston, 2017). En effet, les 15000 litres d'air que nous respirons quotidiennement pour subvenir aux besoins de notre organisme contiennent des substances chimiques et particulaires diverses. Les $PM_{2.5}$ (particules au diamètre aérodynamique inférieur ou égal à 2,5 µm) sont un composant de premier ordre dans le mélange formant la pollution de l'air extérieur. Bien que leur diamètre soit faible, ces particules possèdent une grande surface spécifique et peuvent donc transporter centains produits chimiques toxiques différents, passer à travers la filtration des poils nasaux, se déposer dans la région alvéolaire du poumon, transloquer des poumons dans la circulation systémique et se distribuer dans le corps, augmentant le risque de maladies cardiovasculaires et respiratoires (Pražnikar and Pražnikar, 2012; Stanek and Brown, 2019). A la lumière de preuves solides et suffisantes de leur cancérogénicité chez l'homme, le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) a classé, en 2013, la pollution de l'air extérieur comme

cancérogène certain pour l'homme, à cause de sa teneur élevée en particule en suspenssion qui est directement associée à une augmentation de l'incidence du cancer du poumon (Loomis et al., 2013). Par ailleurs, les gaz d'échappement des véhicules diesel, qui constitue une source principale de PM, ont déjà été classés comme cancérogènes groupe 1 pour l'homme en 2012 (Benbrahim-Tallaa et al., 2012). Par conséquent, il est généralement accepté que les $PM_{2.5}$ constituent le polluant le plus pertinent pour l'étude des effets de la pollution de l'air extérieur sur la santé, notamment en ce qui concerne le cancer (Hamra et al., 2014).

La composition chimique des $PM_{2.5}$ est complexe et hétérogène en composés organiques, inorganiques et biologiques avec une grande variabilité spatio-temporelle (Maignant, 2013). Cela suggère l'existence de phénomènes d'additivité, de synergie ou d'antagonisme entre les différents composés vis-à-vis des effets toxiques induits (Lepers et al., 2013). À ce sujet, il existe de nombreuses études toxicologiques qui fournissent des preuves d'associations positives entre les composés chimiques des $PM_{2.5}$ (par exemple, les métaux solubles, les ions, les endotoxines, les composés carbonés) à travers divers paramètres toxiques (réponse pro-inflammatoire et pro-oxydante), bien que les rôles exacts de chaque fraction restent à déterminer pleinement.

En complément des propriétés pro-oxydantes et pro-inflammatoires connues des $PM_{2.5}$, il faut signaler que l'exposition à ce type de particules entraine la sécrétion de vésicules extracellulaires (VE) (Bonzini et al., 2017). Les VE sont des entités de signalisation sécrétées par tout type de cellules et constituent une population hétérogène (Willms et al., 2018). Bien que leur nomenclature reste controversée, il est généralement reconnu qu'il en existe deux types principaux : les exosomes (30-150 nm) et les microvésicules (100-1000 nm) (Doyle and Wang, 2019). En général, les VE transportent une cargaison complexe constituée notamment des protéines, des lipides et des ARN qui en font de puissantes entités de communication intercellulaire (Maas et al., 2017). La nature et l'abondance du contenu des VE sont spécifiques du type de cellule sécrétrice et sont souvent influencées par son état physiologique ou pathologique (van Niel et al., 2018). La réponse cellulaire induite par les VE s'avère souvent plus influencée par la qualité des VE, déterminée par leur origine cellulaire et leur composition, que par leur quantité (Yáñez-Mó et al., 2015). Par conséquent, parallèlement à leur rôle comme véritables acteurs de la communication intercellulaire, les VE peuvent être envisagées comme de nouveaux biomarqueurs potentiels de toxicité des polluants environnementaux comme les PM, et jouer un rôle prépondérant dans le déclenchement des processus pathologiques

respiratoires. Cependant, il existe un manque de connaissances sur les voies de signalisation toxiques induites par les $PM_{2.5}$ impliquées dans la sécrétion des VE.

Individuellement ou ensemble, ces mécanismes toxiques induisent une altération des mécanismes de défense des poumons et une susceptibilité accrue aux infections pulmonaires à la suite d'une exposition aux $PM_{2.5}$ (R. Li et al., 2018; T. Li et al., 2018; L. Yang et al., 2020). Les connaissances sur les voies de signalisation spécifiques induites par les PM et impliquées dans leurs effets toxiques, notamment le stress oxydant, l'inflammation, l'activation métabolique et la sécrétion des VE, sont considérablement compliquées par le fait que la composition de ces particules varie considérablement en fonction de l'emplacement géographique et de la saison. La taille, la composition et l'origine des PM interagissent de manière complexe et dépendante avec la réactivité propre des modèles cellulaires étudiés pour déclencher des effets néfastes des PM sur la santé.

Dans ce projet de thése, les $PM_{2.5}$ étudiées ont été échantillonnées de mars à juillet 2011, dans le centre ville de Dunkerque, dans le nord de la France, un site urbain influencé par le transport maritime et les émissions de procédés industriels. Les cellules épithéliales bronchiques humaines non cancéreuses, BEAS-2B, ont été utilisées dans cette étude. Dans cet optique, les principaux objectifs que nous allons poursuivre dans ce travail sont:

- Etudier la toxicité des $PM_{2.5}$ et leurs extraits organiques et hydrosolubles sur les cellules BEAS-2B (activation métabolique, inflammation, stress oxydant) ;
- Identifier les voies de signalisation toxiques induites par les $PM_{2.5}$ en utilisant des inhibiteurs spécifiques pour chaque voie étudiée; identifier l'interaction qui existe entre ces voies ;
- Déterminer la fraction de $PM_{2.5}$ (organique, inorganique et biologique) la plus impliquée dans l'induction de la sécrétion des VE en exposant les cellules BEAS-2B aux $PM_{2.5}$ et à leurs deux extraits organique et hydrosoluble;
- Identifier la voie de signalisation toxique activée par $PM_{2.5}$ qui est responsable du déclenchement de la sécrétion des VE en utilisant des inhibiteurs spécifiques.

Ce manuscrit de thèse sera décomposé en plusieurs chapitres, dont le premier est consacré à l'étude bibliographique. Ce chapitre permet de familiariser le lecteur avec la problématique de la pollution de l'air. Dans un premier temps, nous proposons d'avoir un aperçu global (i) sur la pollution atmosphérique et ces effets sur le système respiratoire, (ii) sur les vésicules

extracellulaires et leur rôle dans les pathologies repiratoires ainsi que (iii) sur les mécanismes et les voies de signalisation toxiques induites par les $PM_{2.5}$.

Suite à cette étude bibliographique, nous poursuivons par une section de description de l'ensemble des méthodes et des techniques utilisées pour la réalisation de ce projet ainsi que les outils de traitement des analyses des résultats. Certaines techniques utilisées ont été developpées et optimisées dans le cadre de ma thèse.

Dans le troisième chapitre, une analyse des résultats de la toxicité des $PM_{2.5}$ a été mise en oeuvre. Les effets toxiques des $PM_{2.5}$ sur les cellules épitheliales bronchiques sont appréhendés en étudiant la réponse cellulaire *via* l'étude de la viabilité et la mortalité cellulaire, l'induction des réponses pro-oxydante et pro-inflammatoire et l'évaluation de l'expression génique de plusieurs enzymes de métabolisation des HAP. D'autre part, le rôle des voies de signalisation spécifiques impliquées dans l'induction du stress oxydant, de l'inflammation et de l'activation métabolique par les $PM_{2.5}$ a été recherché. En plus, l'interférence existante entre ces voies de signalisation étudiées a été également mise en évidence.

Le quatrième chapitre, quant à lui, regroupe les résultats concernant l'étude des fractions et des voies de signalisation impliquées dans l'induction de la sécrétion des VE par les cellules BEAS-2B après exposition aux $PM_{2.5}$. Dans ce chapitre, les relations entre les fractions des $PM_{2.5}$ et la libération des VE y sont étudiées pour la première fois. La première détermination de la voie de signalisation toxique impliquée dans le déclenchement de la libération des VE par les PM y est également présentée. Il faut noter que les chapitres 3 et 4 comportent la même structure : une introduction générale, la présentation des principaux résultats suivi d'une disscussion et d'une conclusion.

Enfin, dans une conclusion, une synthèse générale rappelle les résultats de ce travail ainsi que les perspectives qui en découlent. L'annexe vient en dernière partie pour figurer les articles publiés ou soumis dans des journaux scientifiques.

Chapitre I

Revue bibliographique

Ce premier chapitre sera subdivisé en plusieurs parties. La première partie de cette revue bibliographique est consacrée à la description des caractéristiques de la pollution atmosphérique en générale, et de la pollution particulaire en particulier. Elle sera dédiée à la description des polluants particulaires atmosphériques, leur classification, leur source, leur composition ainsi que leur impact sur le système respiratoire.

La deuxième partie sera consacrée à une description détaillée des vésicules extracellulaires (VE). Plus particulièrement, la découverte des VE, leur biogénèse, leur origine, leur composition, leur absorbtion par les cellules réceptrices ainsi que leur rôle dans les pathologies respiratoires vont être abordés.

Enfin, la troisième partie sera destinée à l'explication des mécanismes toxiques induits par les $PM_{2.5}$ notamment le stress oxydant, l'inflammation et l'activation métabolique. Egalement, cette partie présente les effets des PM sur la sécrétion des vésicules extracellulaires.

Cette revue bibliographique sera suivie de la problématique et des objectifs visés dans notre étude.

Chapitre I : Revue bibliographique

Partie A : La pollution atmosphérique particulaire

1. La pollution de l'air

1.1. Définition

La pollution atmosphérique est définie comme une altération de la qualité de l'air intérieur ou extérieur, caractérisée par la présence de plusieurs substances étrangères dans l'atmosphère, ou par la variation significative des concentrations des composants qui y sont présents naturellement. Les conséquences de la pollution de l'air sont nombreuses et entraînent des changements préjudiciables à la qualité de vie (comme la détérioration de la couche d'ozone ou le réchauffement de la planète).

Chaque jour, environ 15 mètres cubes d'air pénètrent dans nos voies respiratoires et sont constitués d'un mélange de composés chimiques toxiques émis par diverses sources, tant anthropiques que naturelles. Dans le monde, le nombre de décès prématurés attribués à l'exposition à la pollution atmosphérique est estimé à environ 7 millions chaque année, en particulier dans les régions les plus pauvres du monde (WHO, 2016). Plus de 92% de la population mondiale est exposée à des niveaux de qualité de l'air dépassant les recommandations fixées par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Par conséquent, la pollution de l'air extérieur est un problème majeur de santé publique touchant l'ensemble des populations des pays développés et en voie de développement (WHO, 2016). Selon le niveau d'exposition et le type de polluant inhalé, les effets de la pollution atmosphérique peuvent varier, allant de simples symptômes comme la toux et l'irritation des voies respiratoires à des affections aiguës **(Figure 1)**.

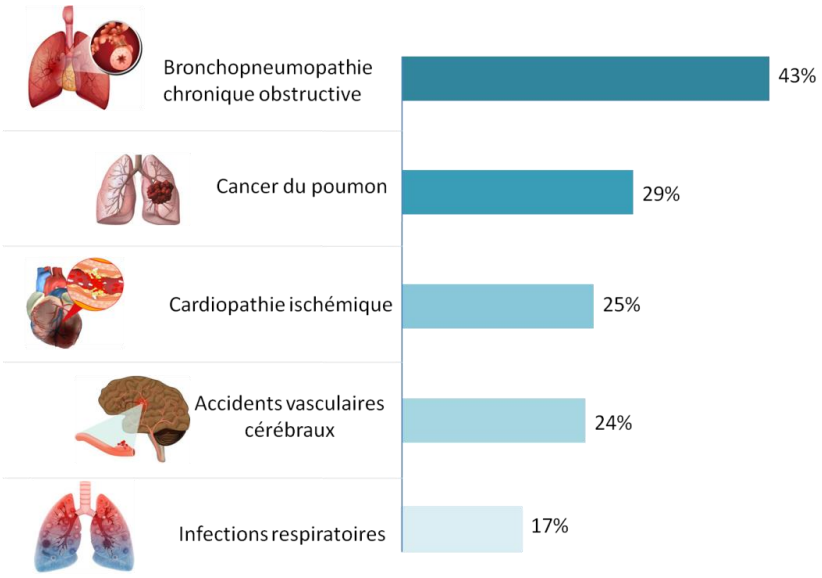


Figure 1: Distribution des pourcentages de décès dus aux maladies pulmonaires et cardiovasculaires causées par la pollution atmosphérique.
Parmi les décès causés par la pollution de l'air ambiant, 43% sont dus à des bronchopneumopathies chroniques obstructives, 29% au cancer du poumon, 25% à des cardiopathies ischémiques, 24% à des accidents vasculaires cérébraux et 17% à des infections respiratoires.

1.2. Principaux polluants atmosphériques

Certains composés chimiques n'existent pas naturellement dans l'air ou ne s'y trouvent qu'à de faibles niveaux de concentration. Emis à forte concentration dans l'atmosphère par les activités naturelles ou anthropiques, les composés inorganiques (comme les oxydes d'azote (NO_X), les oxydes de soufre (SO_X), l'ozone et les métaux), les composés organiques (tels les que les composés organiques volatils (COV) et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)) ainsi que les particules atmosphériques sont les polluants atmosphériques les plus répandus (Manisalidis et al., 2020). Ces composés sont considérés comme des polluants de l'air pouvant modifier les caractéristiques de l'atmosphère d'une part, et avoir des effets nocifs pour la santé et pour l'environnement d'autre part (Li et al., 2019; Nielsen et al., 2017; Valavanidis et al., 2008a). Le **Tableau 1** résume les principales caractéristiques des principaux polluants de l'air ambiant ainsi que leurs sources d'émission naturelles et anthropiques.

Tableau 1 : Caractéristiques et sources des principaux polluants atmosphériques.

Polluants atmosphériques	Caractéristiques des polluants	Sources naturelles	Sources anthropiques	Références
Monoxyde de carbone (CO)	Gaz incolore et inodore très toxique	Océans, feux de forêt, volcans, gaz des marais et des orages	Combustion incomplète du carbone, échappements des moteurs des véhicules, procédures industriels	(Johnson-Arbor et al., 2014; Reboul et al., 2017)
Oxydes d'azote (NO_2, NO)	Gaz incolore hautement réactif (NO_2 est l'oxyde d'azote le plus toxique)	Sols sous végétation, océans, réactions chimiques atmosphériques	Agriculture, combustion des combustibles fossiles, procédés industriels	(Denman et al., 2007; Meulenbelt, 2012)
Ammoniac (NH_3)	Gaz incolore avec une odeur piquante, peut être dissout dans l'eau	Sols sous végétation, océans, agriculture, animaux sauvages	Production d'énergie, agriculture, engrais chimiques	(Behera et al., 2013)
Dioxyde de soufre (SO_2)	Gaz incolore, dense, toxique avec une odeur forte et désagréable	Eruptions volcaniques, réaction du sulfure d'hydrogène avec l'oxygène	Combustion des combustibles fossiles, industries, production d'électricité, transport	(Lu et al., 2011)
Composés organiques volatils	Molécules formées au minimum d'atomes d'hydrogène et de carbone, caractérisées par leur grande volatilité	Feux de forêt, éruptions volcaniques, élevages de bovins, plantes	Combustion des combustibles fossiles, usines et industries, chauffage résidentiel, raffinage du pétrole, trafic maritime, véhicules routiers	(Cicolella, 2008)
Hydrocarbures aromatiques polycycliques	Molécules comprenant au moins deux cycles aromatiques fusionnés, cancérogènes pour l'homme	Eruptions volcaniques, feux de forêt, pertes naturelles ou infiltrations de gisements de pétrole ou de charbon	Chauffage résidentiel, production de noir de carbone, trafic maritime, échappement de véhicules	(Abdel-Shafy and Mansour, 2016; Jameson, 2019)
Métaux lourds	Métaux de densité, poids ou numéro atomiques relativement élevés	Eruptions volcaniques, pulvérisations de sel de mer, feux de forêt	Production d'électricité et de chaleur, combustion des combustibles	(Wan et al., 2016)
Particules atmosphériques	Suspension de particules liquides ou solides dans l'air	Poussière, éruption volcanique, feux de forêt	Activités industrielles, trafic routier, agriculture, trafic maritime	(Bahadar Zeb et al., 2018; Park et al., 2018)

Nos travaux de recherche se focalisent sur l'étude de la toxicité de la pollution atmosphérique particulaire, qui sera détaillée dans les paragraphes suivants.

2. La pollution particulaire

2.1. Définition

Particulate matter (PM, matière particulaire en français) est un terme désignant un mélange hétérogène complexe de particules solides et liquides en suspension dans l'air, dont la taille et la composition chimique varient dans le temps et l'espace (Kim et al., 2015). La taille, la composition et l'origine des particules sont des éléments déterminants dans leur toxicité et leur pathogénicité (Ni et al., 2020).

2.2. Taille des PM

Les particules en suspension dans l'air ont des formes irrégulières et leur comportement aérodynamique est exprimé par analogie au diamètre d'une particule sphérique idéalisée nommé diamètre aérodynamique équivalent (Dae). Les particules sont en effet échantillonnées et décrites sur la base de leur Dae. Bien que les PM puissent être définies ou classifiées de plusieurs façons (p. ex. processus de formation) (Nurkiewicz et al., 2010; Thurston, 2017), le Dae est la caractéristique la plus utilisée car il décrit à la fois la capacité de transport de la particule dans l'atmosphère mais aussi son pouvoir de pénétration dans l'appareil respiratoire **(Figure 2)** (Lawrence et al., 2016; Oberdörster et al., 2005; Stanek and Brown, 2019; Yao et al., 2016).

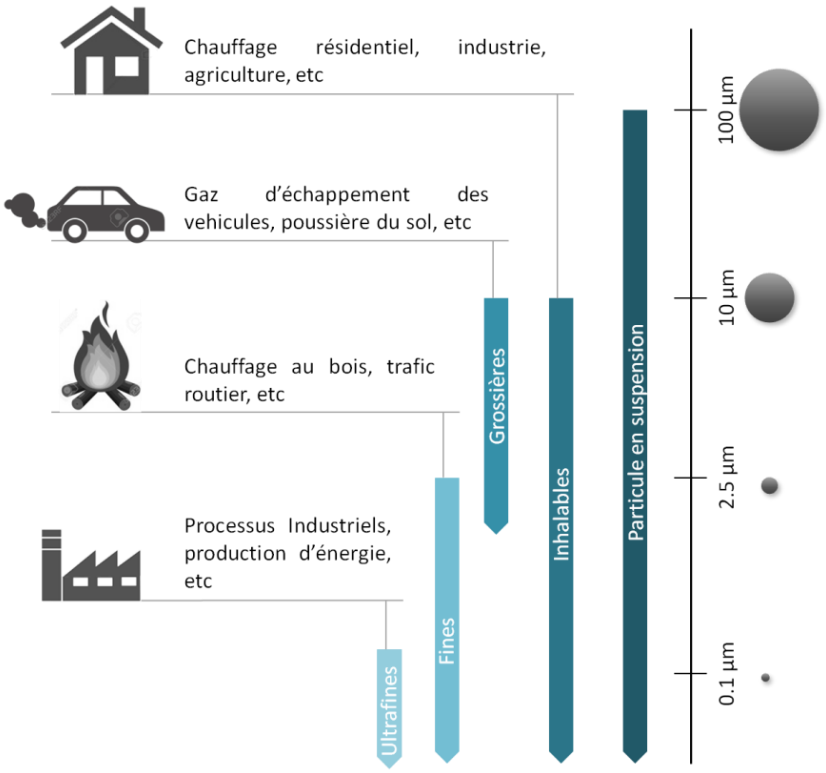


Figure 2: Classification granulométrique des particules atmosphériques.

2.3. Sources des PM

Les particules atmosphériques trouvent leur origine aussi bien dans les émissions naturelles que dans les émissions anthropiques. Par exemple, la **Figure 3** montre la répartition des emission de PM_{10} et de $PM_{2.5}$ par secteur en Ile-de-France en 2018. Ces sources influencent leur composition et leur taille, et par conséquent, leur effet toxique.

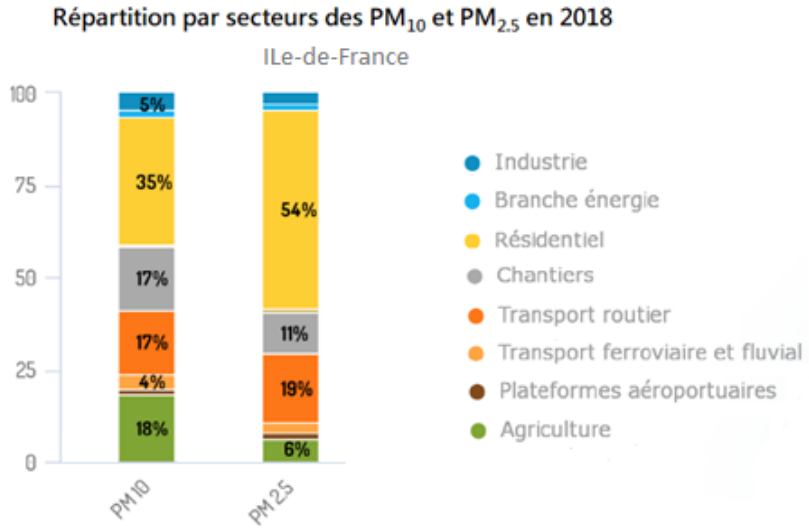


Figure 3: Sources d'émission de PM_{10} et de $PM_{2.5}$ en Ile-de-France en 2018 (AirParif, 2020).

2.3.1. Sources naturelles

Poussières

Les poussières générées et transportées par l'action du vent sont produites principalement dans les régions arides et semi-arides. Les principales sources de poussières sont situées en Afrique du Nord, les sources sahariennes étant les plus actives au monde. Les émissions de poussières du désert ont un impact significatif sur les niveaux de particules dans le bassin méditerranéen car elles sont responsables d'un pourcentage significatif (jusqu'à 70%) des dépassements quotidiens des normes fixées pour les PM.

Eruptions volcaniques

Les éruptions volcaniques représentent une source majeure de pollution de l'air. Les oxydes de soufre émis par les volcans réagissent avec la lumière du soleil, les gaz atmosphériques et les aérosols, et se transforment en particules fines (Boichu et al., 2019). Les aérosols de sulfate volcanique (comme l'acide sulfurique, du sulfate d'ammonium, etc.) sont les composants dominants des PM générées par ces éruptions. Ces particules ont un impact préjudiciable sur la qualité de l'air et la santé humaine (Reikard, 2019).

Incendies et feux de forêt

Les feux de biomasse, causés par la combustion de forêts et de broussailles, constituent un facteur naturel majeur de la pollution atmosphérique particulaire. Ils produisent plus de particules fines et ultrafines que de particules grossières. La composition chimique complexe des particules présentes dans la fumée des feux de forêt dépend du type de biomasse brûlée et des conditions de combustion. Généralement, les COV et les HAP sont les constituants majeurs de ces particules (Black et al., 2017).

2.3.2. Sources anthropiques

Trafic routier

Le trafic routier est l'une des principales sources d'émission de PM dans les zones urbaines. Cette catégorie de source comprend différents types d'émissions provenant des véhicules (Harrison, 2020). En plus des émissions de particules provenant des gaz d'échappement et des émissions de précurseurs de particules gazeuses organiques et inorganiques provenant de la

combustion, les véhicules émettent des quantités importantes de particules par l'usure des freins et des pneus, et contribuent également à la remise en suspension dans l'air de particules déjà déposées sur la route (Guevara et al., 2013).

Trafic maritime

Le trafic maritime est une composante essentielle de l'économie européenne. Par rapport aux autres modes de transport (par exemple, les camions, les trains), le trafic maritime est plus économe en carburant (Guevara, 2016). Ce type de transport est considéré comme un contributeur important aux particules primaires dans les zones côtières et, par conséquent, à l'altération de la qualité de l'air sur les côtes européennes, en particulier en mer du Nord et dans le bassin méditerranéen (Ledoux et al., 2018; Viana et al., 2014).

Processus industriels et production d'énergie

Les industries constituent une des sources hétérogènes d'émission de PM comprenant principalement les émissions provenant de la combustion du pétrole et du charbon dans les centrales électriques, et de différents types d'industries (p.ex. pétrochimie, métallurgie, céramique, pharmaceutique, matériel informatique) (Belis et al., 2013). L'industrie et la production d'électricité représentent respectivement 18% et 15% des niveaux mondiaux de PM_{10} et $PM_{2.5}$ en milieu urbain, respectivement (European Environment Agency, 2015; Karagulian et al., 2015).

Chauffage résidentiel

La combustion de la biomasse dans les petites installations de chauffage est actuellement une source importante d'émissions de PM. En 2013, les émissions rejetées par les petits appareils de combustion résidentiels étaient estimées comme étant la plus grande source de $PM_{2.5}$ (52%) et de PM_{10} (38%) en Europe (European Environment Agency, 2015). La contribution élevée de la combustion résidentielle de bois est principalement due au fait que les conditions de combustion sont souvent inefficaces (c'est-à-dire des températures de combustion basses, ce qui entraîne une combustion incomplète) (M. Guevara, 2016).

Agriculture

Au cours des dernières années, les activités agricoles, notamment l'épandage d'engrais, la gestion du fumier et l'élevage ont attiré l'attention des scientifiques car elles sont les principales sources d'émission de NH_3 (environ 90%), ainsi que des émetteurs importants de PM_{10}, avec

une contribution allant jusqu'à 14% des émissions dans certaines régions européennes en 2013 (European Environment Agency, 2015). Dans le secteur agricole, les principales activités qui contribuent à la formation des PM comprennent le stockage, la manipulation et le transport des produits agricoles, la gestion du fumier, le brûlage des déchets agricoles, la préparation des terres et la récolte (Mar et al., 2016).

2.4. Composition chimique des PM

Les PM forment un mélange complexe et hétérogène d'espèces chimiques organiques et inorganiques, ainsi que d'une fraction biologique, qui varie considérablement et dépend de nombreux facteurs, tels que les sources, le climat, la saison et le type de pollution urbaine ou industrielle (Valavanidis et al., 2008b). Ces particules englobent de nombreux composants chimiques et caractéristiques physiques différents, dont beaucoup ont été cités comme contribuant potentiellement à la toxicité. La fraction organique est principalement représentée par les HAP et les COV, alors que les métaux de transition (p.ex. fer, nickel, vanadium, cuivre), les ions (p.ex. SO_4^{2-}, NO_3^-, NH_4^+) et les suies (*Black carbon*, BC) sont plus abondants dans la fraction inorganique. Quant à la fraction biologique, elle est généralement formée des endotoxines bactériennes, virus, débris animaux et végétaux. Les minéraux (p.ex. quartz, amiante, poussières) peuvent également être trouvés au sein des PM (Kelly and Fussell, 2012; Song et al., 2020; Valavanidis et al., 2008a; Yang et al., 2018). A titre d'exemple, la **Figure 4** présente la composition chimique moyenne des $PM_{2.5}$ mesurées en France sur les 6 stations d'observatoire MERA (LSCQA, 2020).

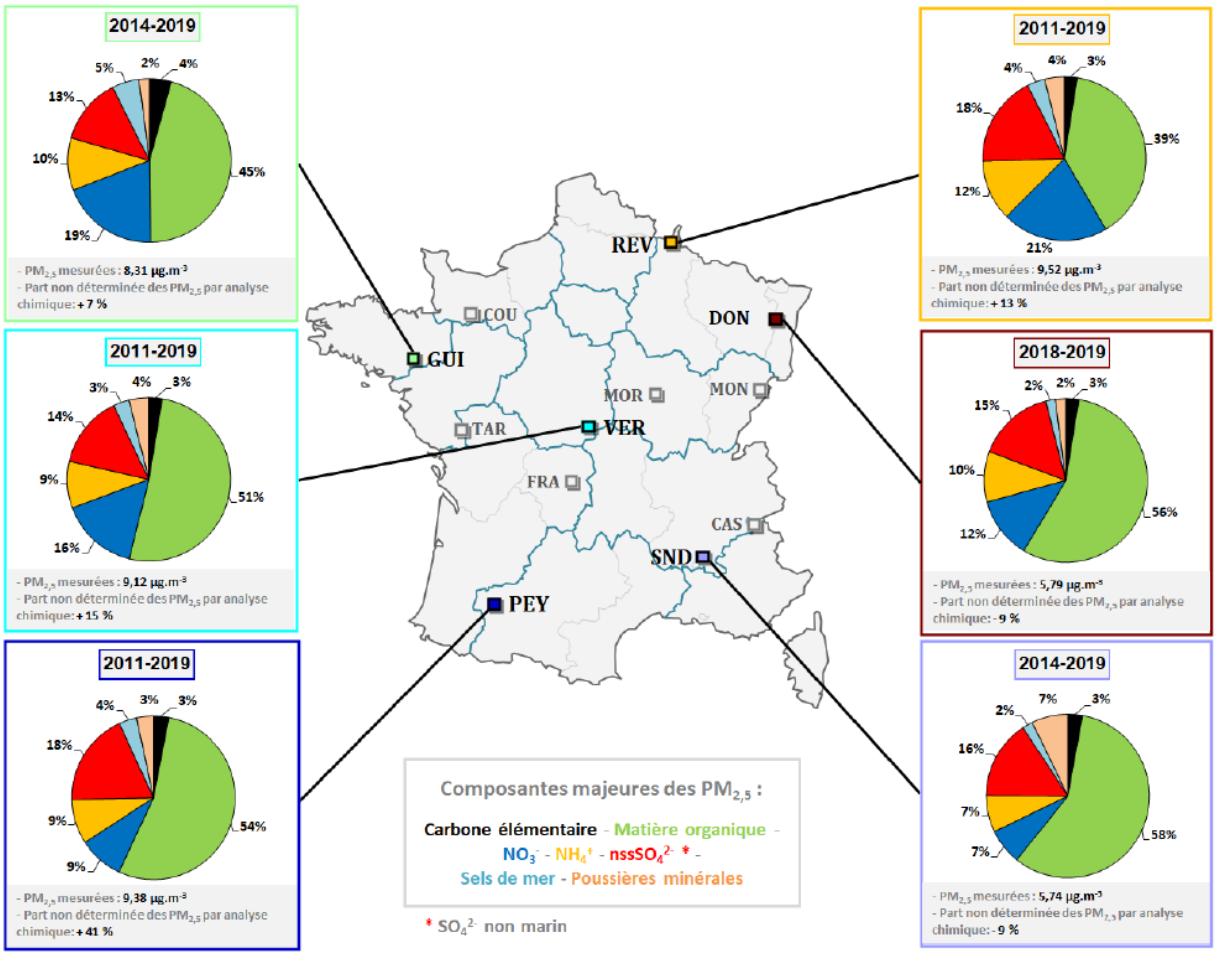


Figure 4: Composition relative moyenne des $PM_{2.5}$ en France observée aux stations de réseau MERA entre 2011 et 2019 (LSCQA, 2020).
SO_4^{2-}, ion sulfate; NO_3^-, ion nitrate; NH_4^+, ion ammonium.

En termes de métaux, les émissions d'usure des pneus et des freins ainsi que les émissions de gaz d'échappement sont les plus grandes sources anthropiques de fer, de zinc, du cuivre et de plomb dans les zones urbaines (Zalakeviciute et al., 2020). Ces deux sources d'émission contribuent également de manière significative aux émissions d'autres métaux traces, tels que l'arsenic, le nickel et le baryum (Manigrasso et al., 2020; Viana et al., 2008). En outre, les poussières minérales, d'origine terrigène (p.ex. l'érosion des sols et les poussières désertiques), ou bien d'origine anthropique (p.ex. les processus d'abrasion) et formées d'aluminium, silicium, fer et calcium, et les sels de mer, principalement constitués de chlorure de sodium (NaCl), contribuent également à la composition des $PM_{2.5}$.

Les particules atmosphériques contiennent également un large éventail de substances chimiques organiques (p.ex. oléfines, aldéhydes, cétones, composés nitrés). Les analyses chimiques de particules provenant de la combustion ont montré qu'elles étaient composées de

masses agrégées de particules carbonées, qui contiennent des radicaux libres persistants de structure quinoïde et semi-quinoïde. Les HAP et les nitro-HAP sont des produits de processus de combustion incomplets notamment issus des gaz d'échappement des véhicules thermiques (Srivastava et al., 2018; Valavanidis et al., 2006). La combustion de biomasse apporte également une contribution importante à la concentration en benzo[a]pyrène (BaP) (Belis et al., 2013).

2.5. Recommandation de l'OMS

Afin de progresser vers des niveaux de qualité de l'air n'entraînant pas d'incidence négative notable ni de risque pour la santé humaine et l'environnement, l'OMS fournissent des directives visant à réduire les effets de la pollution de l'air sur la santé, et sont destinées à être appliquées dans le monde entier. Publiées pour la première fois en 1987 et actualisées en 1997, ces valeurs sont fondées sur l'évaluation des données scientifiques actuelles par des experts du domaine. Les concentrations de polluants atmosphériques doivent être mesurées sur des sites de surveillance qui sont représentatifs de l'exposition de la population.

Dans l'Union Européenne (UE), d'importants progrès ont été réalisés ces vingt dernières années en matière d'émissions atmosphériques anthropiques et de qualité de l'air, en particulier grâce à une politique spécifique de l'UE. A cet égard, des plafonds d'émissions annuelles totales de nombreux polluants ont été fixés par directive du Parlement européen visant à réduire la pollution atmosphérique d'ici 2030 et ses risques sanitaires (Union Européenne, 2016). Les valeurs seuil de PM_{10} et de $PM_{2.5}$ recommandées par l'OMS et par l'UE sont synthétisées dans le **Tableau 2**.

Tableau 2: Valeurs recommandées pour les particules atmosphériques par l'OMS et l'UE en 2021.

Particules	Durée d'exposition	Valeur recommandée par l'OMS	Valeur limite de l'UE
PM_{10}	Annuelle	15 $\mu g/m^3$	40 $\mu g/m^3$
	24 heures	45 $\mu g/m^3$	50 $\mu g/m^3$
$PM_{2.5}$	Annuelle	5 $\mu g/m^3$	25 $\mu g/m^3$
	24 heures	15 $\mu g/m^3$	Pas de valeur

PM ; particulate matter ; OMS, organisation mondiale de la santé ; UE, Union Européenne

2.6. Impact sanitaire des particules atmosphériques

Respirer de l'air pollué peut causer des problèmes de santé. Les conséquences sanitaires les mieux connues de la pollution atmosphérique sont celles affectant les voies respiratoires, mais d'autres systèmes peuvent être atteints. Après un rappel de la physiologie du système respiratoire, l'impact sanitaire des particules atmosphériques sera décrit.

2.6.1. Physiologie de l'appareil respiratoire

L'appareil respiratoire constitue une interface majeure entre l'organisme et l'environnement extérieur, ce qui lui confère un intérêt particulier en toxicologie des polluants atmosphériques (Zaas and Schwartz, 2005). En effet, cet appareil est une cible privilégiée des polluants gazeux et particulaires présents dans l'air.

Sur le plan fonctionnel, le système respiratoire peut être séparé en deux zones : les zones conductrices (du larynx aux bronchioles) forment un chemin pour la conduction des gaz inhalés et la zone respiratoire (du canal alvéolaire aux alvéoles) où l'échange gazeux a lieu (Greeley, 2016). Anatomiquement, les voies respiratoires sont divisées en voies respiratoires supérieures (organe extérieur au thorax - cavité nasale, pharynx et larynx) et inférieures (organe à l'intérieur du thorax - trachée, bronches, bronchioles, canal alvéolaire et alvéoles), comme le montre la **Figure 5** (Patwa and Shah, 2015). Il est important de noter que le type de cellules change d'un organe à un autre pour assurer les échanges gazeux et s'adapter à la fonction de chacun des organes du système respiratoire (BéruBé et al., 2010).

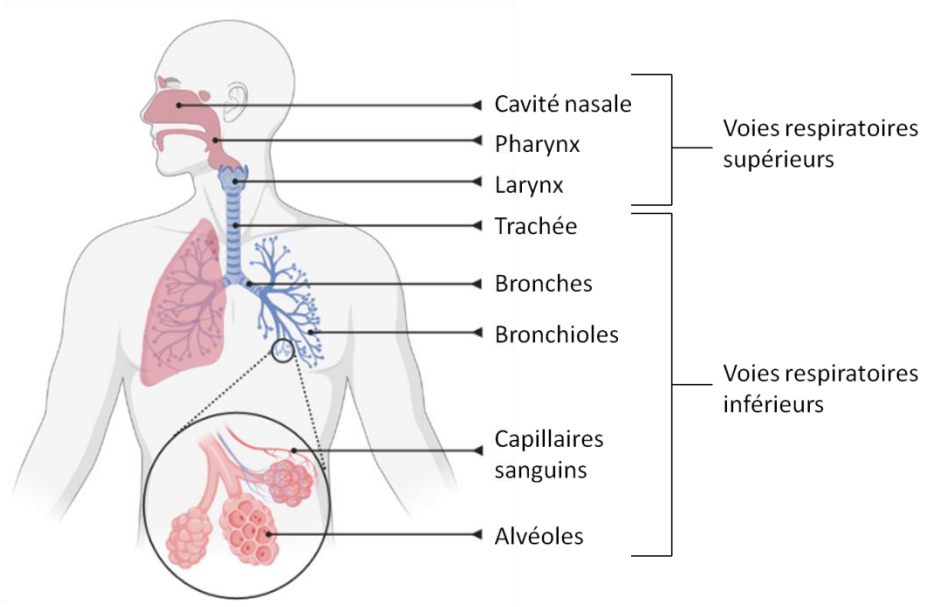


Figure 5: Anatomie de l'appareil respiratoire

Nez et cavité nasale

Le nez et la cavité nasale, la partie la plus céphalique des voies respiratoires, est tapissée d'un épithélium olfactif associé à un épithélium respiratoire, cylindrique, cilié et pseudostratifié. Grâce aux poils qui les tapissent, ces cavités assurent la filtration des poussières en suspension dans l'air (Oneal et al., 1999).

Pharynx

Le pharynx constitue un passage en forme de cône menant des cavités buccales et nasales de la tête à l'œsophage et au larynx. Le nasopharynx est tapissé d'un épithélium respiratoire cilié avec des cellules muqueuses, tandis que l'oropharynx et le laryngopharynx sont tapissés d'un épithélium pavimenteux non kératinisé (Plopper and Harkema, 2005).

Larynx

Le larynx sert de conduit pour le passage de l'air entre le pharynx et la trachée (Kirby, 2014). Il est tapissé d'un épithélium cilié pseudostratifié, avec des cellules contenant de la mucine intercalées avec des bulbes apicaux, similaire à l'épithélium respiratoire des voies nasales (Greeley, 2016).

Arbre trachéobronchique

L'arbre trachéobronchique est un système complexe qui transporte les gaz de la trachée jusqu'aux acini, les unités d'échange gazeux du poumon. Il est divisé en 23 générations de ramifications dichotomiques (Patwa and Shah, 2015). De la trachée aux bronchioles terminales (génération 15-16), les voies aériennes sont purement conductrices. Les bronchioles terminales (génération 16) se divisent en bronchioles respiratoires de transition (générations 17-19) car elles présentent des alvéoles occasionnelles au niveau des parois. Ces bronchioles respiratoires se divisent ensuite en canaux alvéolaires (générations 20-22) qui sont entièrement tapissés d'alvéoles. Cette région appelée acinus (générations 16-23) est composée des voies respiratoires et forme les tissus fonctionnels (unités d'échange de gaz) du poumon (Patwa and Shah, 2015).

Trachée

La trachée est tapissée d'un épithélium respiratoire renfermant de très nombreuses cellules caliciformes sécrétrices de mucus et des cellules ciliaires, qui déplacent les particules étrangères vers le haut et hors des voies respiratoires (Widdicombe, 2019).

Bronches

La trachée se ramifie dans les bronches primaires droite et gauche au niveau de la carène. Ces bronches sont également bordées d'un épithélium cylindrique cilié pseudo-stratifié en colonne contenant des cellules caliciformes **(Figure 6)**. Des anneaux de cartilage, appelé cartilage hyalin, soutiennent la structure des bronches et empêchent leur effondrement. Les bronches continuent à se ramifier en un arbre bronchique permettant la conduction de l'air. En outre, la muqueuse emprisonne les débris et les agents pathogènes (Chanez and Bourdin, 2008; Greeley, 2016; Harkema et al., 2013)

Bronchioles

Les bronchioles sont bordées d'un simple épithélium cilié cuboïde dont le principal type de cellule est la cellule de Club, anciennement appelée cellule de Clara **(Figure 6)**. Les bronchioles respiratoires sont la dernière division des bronchioles, formées des structures alvéolaires tapissées de cellules ciliées et de cellules de Club, alors que les structures cellulaires et acellulaires ressemblent à celles des canaux alvéolaires et des alvéoles (Harkema et al., 2013).

Canaux alvéolaires et alvéoles

Les alvéoles sont tapissées par des pneumocytes de type I et de type II, reposant sur une membrane basale en contact étroit avec les capillaires **(Figure 6)** (Greeley, 2016). Ce sont des cellules aplaties, incapables de se diviser, qui ne contiennent que quelques organites et qui servent de fine barrière entre le sang et l'air. Les cellules de type II participent à la dépollution et à la réparation en proliférant et en migrant vers les zones endommagées. Ces cellules sont capables de se diviser et de se différencier en cellules de type I. (Andreeva et al., 2007). Il existe également une population résidente de macrophages alvéolaires (phagocytes). Ils sont les premiers à rencontrer les agents pathogènes et les polluants et contribuent à orchestrer l'initiation et la résolution de la réponse immunitaire dans le poumon (Joshi et al., 2018).

La **Figure 6** représente la structure de l'épithélium respiratoire des bronches, bronchioles ainsi que celui des alvéoles.

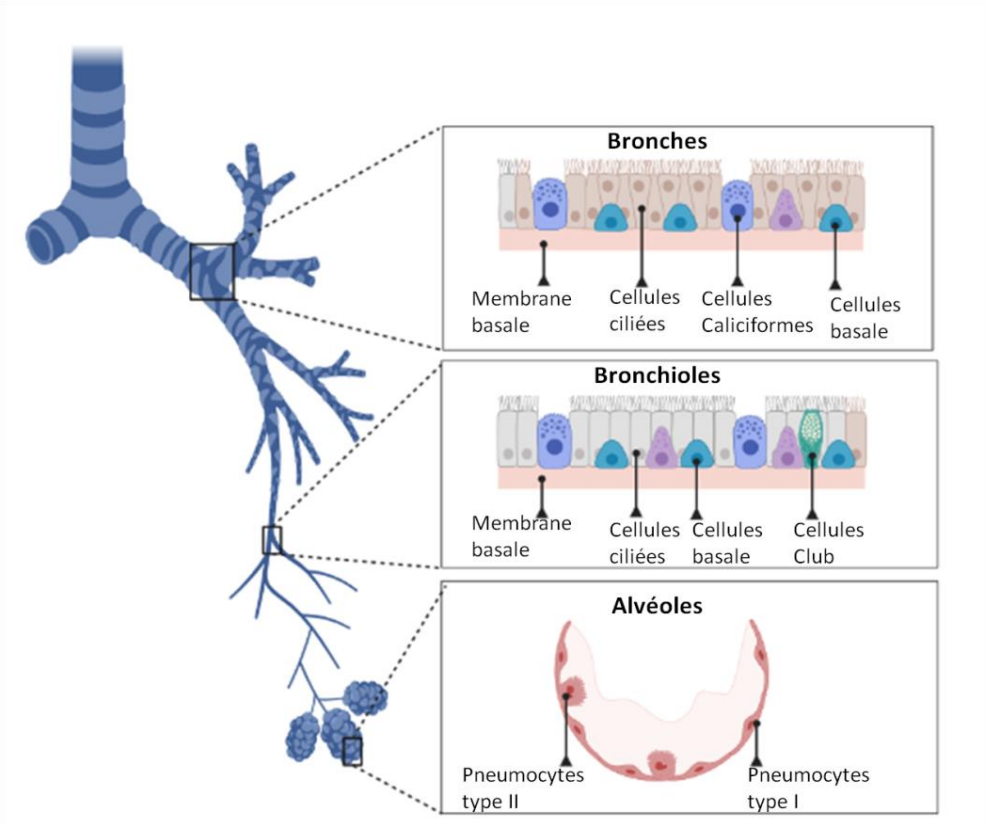


Figure 6: Structure de l'épithélium respiratoire.

2.6.2. Pénétration et dépôt des PM dans l'appareil respiratoire

En fonction de leur taille, les PM pénètrent plus ou moins profondément dans les voies respiratoires où elles peuvent exercer leurs effets toxiques. Trois principaux mécanismes de dépôt des PM dans les poumons sont décrits : l'impaction, la sédimentation et la diffusion, selon la taille des particules inhalées (Pražnikar and Pražnikar, 2012). L'impaction est le dépôt inertiel d'une particule sur la surface des voies respiratoires, principalement au niveau des grandes voies conductrices. La probabilité d'impaction augmente avec l'augmentation de la taille des particules. La sédimentation gravitationnelle est un mécanisme important pour le dépôt de particules dans les petites voies aériennes de conduction où la vitesse de l'air est faible. Le dépôt dû à la gravité augmente également avec l'augmentation de la taille des particules. Enfin, la diffusion affecte les particules de taille submicronique qui acquièrent un mouvement aléatoire. Elle se produira principalement dans les petites voies respiratoires et les alvéoles. Contrairement aux deux mécanismes précédents, la diffusion est donc inversement proportionnelle à la taille des particules (Pilcer and Amighi, 2010; Pražnikar and Pražnikar, 2012).

La **Figure 7** montre la capacité des PM à pénétrer dans le système respiratoire selon leur taille. Les particules grossières ($PM_{2.5-10}$) se déposent dans la trachée, les bronches et les bronchioles par un processus d'impaction ou de sédimentation. En revanche, les deux fractions fine ($PM_{2.5}$) et ultrafine ($PM_{0.1}$) peuvent se déposer dans les canaux alvéolaires et les alvéoles par des processus de sédimentation et de diffusion (Falcon-Rodriguez et al., 2016; Xing et al., 2016). Les particules ultrafines ne sont pas éliminées efficacement par les macrophages et sont donc susceptibles d'être absorbées par les cellules épithéliales et de se déplacer vers des sites extrapulmonaires (p.ex. circulation lymphatique et sanguine), libérant les contaminant chimique et biologique adsorbés à leur surface (Oberdörster et al., 2002).

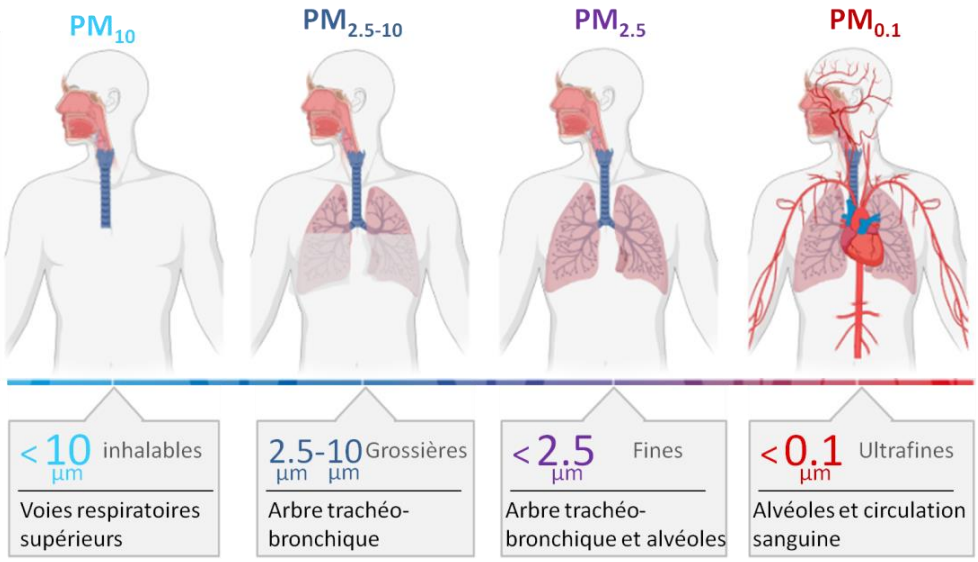


Figure 7: Pénétration et dépôt des PM dans les voies respiratoires

2.6.3. Epidémiologies des maladies respiratoires causées par les PM

En 2018, l'OMS a estimé que l'exposition à la pollution atmosphérique est à l'origine d'environ 7 millions de décès prématurés dans le monde chaque année, voire même 8 millions selon une étude plus récente (Lelieveld et al., 2019; WHO, 2018). La pollution atmosphérique par les PM est responsable d'une augmentation des admissions à l'hôpital et des visites aux urgences (Kim et al., 2015). En 2015, les particules figuraient au sixième rang de la liste des 10 facteurs les plus dangereux contribuant à la diminution de la durée de vie dans le monde (Forouzanfar et al., 2016). L'impact de l'exposition aux particules sur la santé est décrit dans la **Figure 8** ainsi que dans les paragraphes suivants.

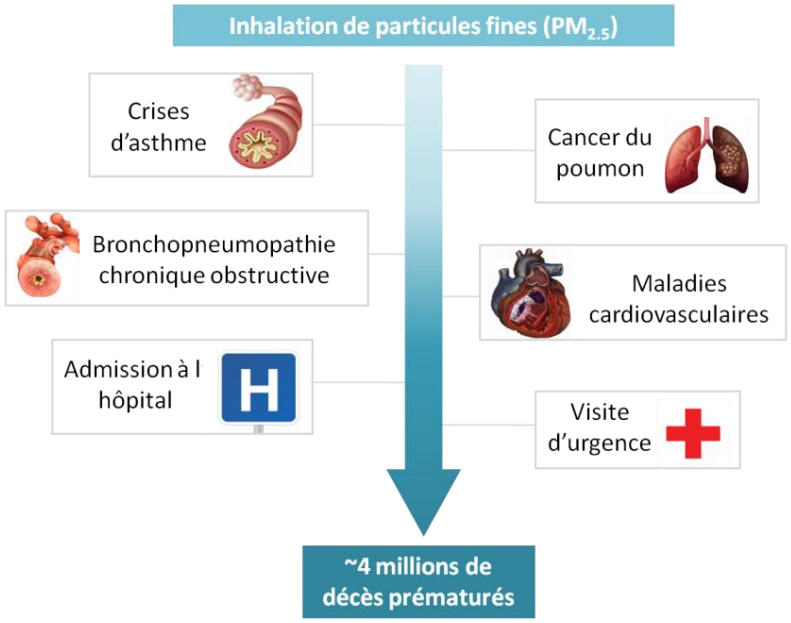


Figure 8: Impact sanitaire de l'exposition aux particules fines.

Asthme

L'asthme est un problème de santé publique majeur, qui se caractérise par une hyperréactivité des voies respiratoires, une obstruction et une inflammation chronique (Barnes, 2014; Castillo et al., 2017; Virchow and Barnes, 2012). Anenberg et ses collègues ont montré qu'environ 16 millions enfants sont atteints d'asthme à cause des concentrations élevées de particules, notamment les $PM_{2.5}$ (Anenberg et al., 2018). Selon des rapports scientifiques publiés récemment, le taux d'admission à l'hôpital et de visites aux urgences dues à l'asthme augmente de 1,02% pour 10 µg/m^3 d'augmentation de la concentration de $PM_{2.5}$ (Buteau et al., 2019; Lim et al., 2016). Selon une étude réalisée en Chine, chaque augmentation de 10 µg/m^3 de la concentration de $PM_{2.5}$ était significativement associée à une augmentation de 0,67%, 0,65% et 0,49% du nombre total d'admission à l'hôpital, de consultations externes et de visites aux urgences, respectivement (Tian et al., 2017). En terme de mortalité, une augmentation de 1,07% (95% CI, 1,01–1,12) de taux de mortalité due à l'asthme est constaté pour chaque augmentation de 10 µg/m^3 de $PM_{2.5}$ (Liu et al., 2019).

Bronchopneumopathie chronique obstructive

De nombreuses études ont montré que le taux d'hospitalisation des patients souffrant de BPCO augmente de 2,7% en cas d'augmentation de la concentration de PM_{10} de 10 µg/m^3 (Gan et al., 2013; Kyung and Jeong, 2020; Schraufnagel et al., 2019; Sunyer and Basagaña, 2001). Des études récentes ont montré que l'hospitalisation due à la BPCO est davantage associée aux concentrations atmosphériques de $PM_{2.5}$ qu'à celles de PM_{10}. Ceci est particulièrement

significatif pour la période de 14 à 90 jours précédant l'admission à l'hôpital (Atkinson et al., 2014; Zieliński et al., 2018). En outre, la mortalité due à la BPCO augmente de 1,1% (95% CI, 0,8–1,4) lorsque la concentration de PM_{10} augmente de 10 µg/m^3 (Kyung and Jeong, 2020).

Cancer du poumon

En 2013, l'OMS et le CIRC ont classé les particules comme cancérogènes pour l'homme (Cohen et al., 2013; Loomis et al., 2013). Comme pour la BPCO, il existe une corrélation positive entre la concentration atmosphérique des particules et le développement du cancer du poumon (Huang et al., 2017). Selon une étude européenne appelée ESCAPE (*European Study of Cohorts for Air Pollution Effects*), le risque de développement du cancer du poumon augmente de 1,22 pour une augmentation de la concentration de PM_{10} de 10 µg/m^3, et de 1,18 pour une augmentation de 5 µg/m^3 de $PM_{2.5}$ (MacIntyre et al., 2014; Raaschou-Nielsen et al., 2013). Selon Kim et al., les PM_{10} et les $PM_{2.5}$ augmentent sensiblement le taux de mortalité due au cancer du poumon. Une augmentation de 1,17% (95% CI: 1,11–1,24), et de 1,09% (95% CI: 1,04–1,14) a été observée pour chaque augmentation de 10 µg/m^3 des niveaux de $PM_{2,5}$ et de PM_{10}, respectivement (H. Kim et al., 2018)

Maladies cardiovasculaires

De nombreuses études épidémiologiques ont démontré les associations entre l'exposition à court et à long termes à des concentrations élevées de PM et la morbidité accrue par MCV, notamment l'infarctus du myocarde (IM), l'insuffisance cardiaque congestive (ICC), les cardiopathies ischémiques (CI) et l'accident vasculaire cérébral (AVC). Il a été rapporté que la pollution atmosphérique par les PM est responsable de 19% de tous les décès dus aux MCV, de 23 % dus aux CI et de 21% dus aux AVC. Une étude longitudinale a identifié une augmentation de 1,89% des MCV, de 2,25% des IM et de 1,85% d'ICC pour une augmentation de 10 µg/m^3 de la concentration de $PM_{2.5}$ (An et al., 2018). En Chine, une étude sur une période d'observation de 8 ans a révélé qu'une augmentation de 10 µg/m^3 de la concentration de PM_{10} et de $PM_{2.5}$ entraînait une augmentation de 0,23% et 0,74%, des admissions à l'hôpital pour des maladies coronariennes, respectivement (Ye et al., 2016). Pour chaque augmentation de 10 µg/m^3 des PM_{10}, la mortalité par les MCV, les CI, les ICC et les AVC a augmenté de 1,23, 1,37, 1,11 et 1,23%, respectivement. Tandis que, une augmentation de mortalité de 1,22% par les MCV, de 1,42% par les CI et de 1,24 % par les AVC ont été associés à une augmentation de 10 µg/m^3 de $PM_{2.5}$ (An et al., 2018).

Partie B : Vésicules extracellulaires

1. Découverte des vésicules extracellulaires

Les vésicules extracellulaires (VE) sont évoquées dans la littérature depuis plus de 40 ans. En 1967, Wolf a montré que les plaquettes sanguines libèrent des fragments membranaires riches en lipides, identifiables par microscopie électronique et purifiables par ultracentrifugation. Ces fragments circulaires sont appelés « poussières de plaquettes » (*platelet dust* en anglais) qui sont la première mise en évidence des « microvésicules » (MV) (Wolf, 1967). Puis en 1975, Dalton a décrit pour la première fois les MV libérées par les cellules épithéliales et les lymphocytes, qui possèdent la même structure que les vésicules retrouvées dans la lumière des endosomes multivésiculaires (MVE) (Dalton, 1975).

En 1981, prés de 15 ans après la découverte des MV, Trams et al., décrivent un deuxième type de VE appelé « exosomes ». Ce terme est utilisé pour désigner des VE sécrétées *in vitro* par diverses lignées cellulaires. Deux types de VE ont été décrits dans cette étude : le premier regroupe de VE possédant une taille environ 40 nm, tandis que le deuxième représente les VE ayant une taille comprise entre 500 et 1000 nm. Ces deux types de VE sont caractérisés par une activité 5-nucléasique, mais elles diffèrent énormément par la composition lipidique de leur membrane plasmique, suggérant une origine plus complexe qu'un simple bourgeonnement de la membrane plasmique de la cellule mère (Trams et al., 1981). En 1983, une étude a mis en évidence l'origine endosomale de ces exosomes. L'exocytose de ces VE est observée suite à la fusion du MVE avec la membrane plasmique des réticulocytes, grâce aux approches de microscopie électronique **(Figure 9)** (Harding et al., 1983).

Dans les années 1980, Pan et Johnstone ont montré que les exosomes peuvent être secrétés, non seulement par les réticulocytes, mais aussi par d'autres types de cellules mises en culture (Pan and Johnstone, 1983). A cette époque, il était communément admis que la sécrétion de ces exosomes permettait aux cellules de se débarrasser des protéines et des enzymes devenues inutiles telles que les protéines kinases et les récepteurs à la transferrine (Harding et al., 1983; Pan and Johnstone, 1983). C'est avec les publications de Raposo et ses collaborateurs que l'intérêt pour les exosomes se développe réellement. En effet, alors qu'ils étaient considérés depuis longtemps comme des débris cellulaires, cette équipe a décrit les exosomes, pour la première fois, comme des entités fonctionnelles. Les exosomes libérés par les lymphocytes B (LB) contiennent des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II

capables de lier des antigènes. Comme les LB, ces exosomes peuvent de ce fait induire une réponse des cellules T (Raposo et al., 1996). Suite à cette découverte, les exosomes apparaissent pour la première fois comme un moyen de communication intercellulaire. L'étude des VE s'est ensuite généralisée à tout type de cellules comme les cellules souches, les cellules tumorales, les cellules hématopoïétiques, ainsi que les cellules épithéliales dont nous parlerons ensuite.

A l'époque actuelle, les VE se divisent en deux sous-familles appelées microvésicules et exosomes. Ces deux types de VE partagent de nombreux points communs mais diffèrent notamment par leur mode de formation, leur taille et leur composition moléculaire. Cette partie décrira également les implications physiopathologiques des VE.

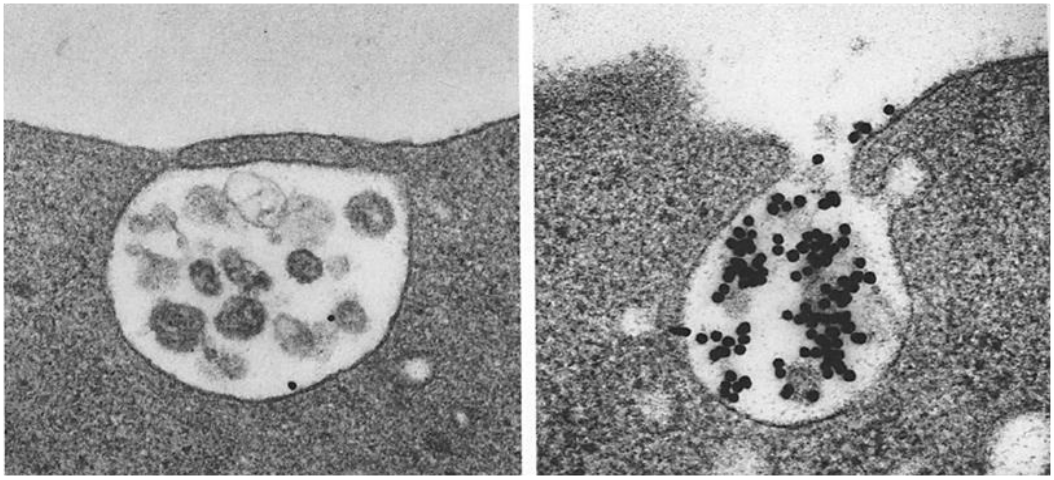


Figure 9 : Exocytose des vésicules endosomales après fusion d'un corps multivésiculaire avec la membrane plasmique (Harding et al., 1983).

2. Les exosomes

2.1. Définition des exosomes

A ce jour, les exosomes sont les VE les plus étudiées et les plus décrites dans la littérature. Bien que leur taille varie selon la cellule d'origine, le terme « exosomes » désigne généralement les VE les plus petites caractérisées par un diamètre compris entre 30 et 100 nm, une densité variant de 1,13 à 1,21 g/mL et une sédimentation à 100 000 g (Kowal et al., 2016; Théry et al., 2009; van Niel et al., 2018). Les exosomes ont comme origine majeure les endosomes tardifs ou les MVE et sont caractérisés par des marqueurs protéiques tels que les tétraspanines CD63 et CD9, Alix, Tsg 101, HSP90 (*Heat Shock Protein*) ou encore Rab27a/b (Colombo et al., 2014; Théry et al., 2009). Comme tout type de VE, les exosomes peuvent être détectés dans divers fluides corporels tels que le sang et le plasma (Yuana et al., 2013), la salive (Ogawa et al., 2008),

les sécrétions nasales (Lässer et al., 2011), le fluide broncho-alvéolaire (Héliot et al., 2017), l'urine (Pisitkun et al., 2004), le liquide céphalo-rachidien (Vella et al., 2008), le liquide synovial (Skriner et al., 2006), le lait maternel (Admyre et al., 2006), le sperme (Poliakov et al., 2009), la bile (Masyuk et al., 2010) et le liquide amniotique (Keller et al., 2006). Pour l'isolement des exosomes, l'ultracentrifugation (100 000 à 200 000 g) et la filtration, le gradient de densité, l'immuno-précipitation, et la précipitation par liaison à des polymères spécifiques sont les méthodes les plus utilisées (Zhang et al., 2019).

2.2. Biogénèse des exosomes

Les exosomes sont d'origine endosomale. Les endosomes précoces se transforment en endosomes tardifs, qui forment ensuite des MVE par un certain nombre de mécanismes. Au cours de ce processus, la membrane endosomale s'invagine dans la lumière des MVE entraînant la formation de vésicules intraluminales (ILV). Certaines protéines sont incorporées dans la membrane invaginante, tandis que les composants cytosoliques sont engloutis et enfermés dans les ILV (Colombo et al., 2014; Stoorvogel et al., 2002). Dans la plupart des cellules, les MVE fusionnent avec les lysosomes, un compartiment acide, où leur contenu en ILV est dégradé par l'hydrolase lysosomale. Cependant, les MVE peuvent également fusionner avec la membrane plasmique et libérer leur contenu en ILV dans le milieu extracellulaire sous forme d'exosomes **(Figure 10)** (Colombo et al., 2014; Hanson and Cashikar, 2012). La formation et la détermination de la composition des ILV, futurs exosomes, font intervenir différents mécanismes : la machinerie ESCRT *(Endosomal Sorting Complex Required for Transport)*, les tétraspanines et les céramides (Keller et al., 2007).

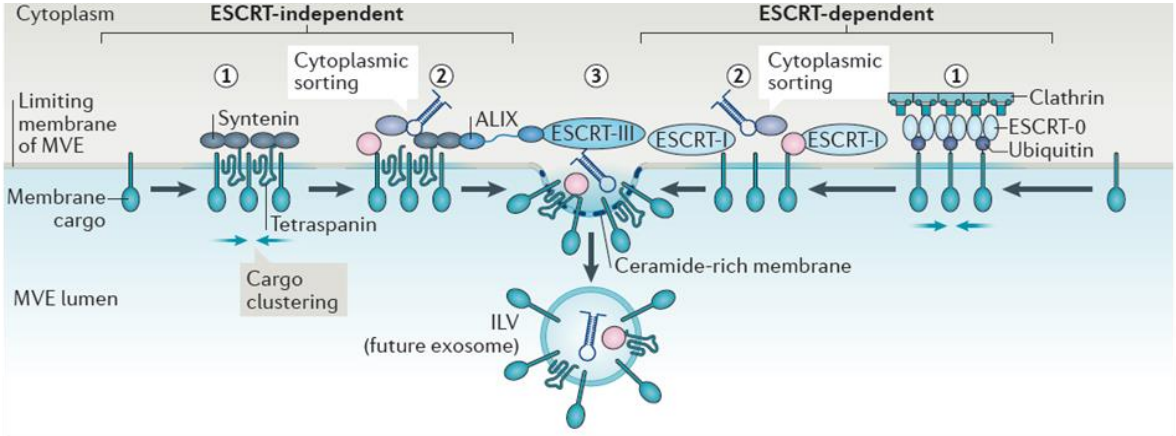


Figure 10: Biogénèse et sécrétion des exosomes (van Niel et al., 2018).
La biogenèse des exosomes nécessite la formation de microdomaines regroupant les cargaisons dans la membrane limitant l'endosome multivésiculaire (MVE). Ces microdomaines aboutissent à la formation des futurs exosomes appelés vésicules intraluminales (ILV) dans la lumière des MVE. Des mécanismes ESCRT-dépendants ou ESCRT-indépendants (régulés par des tétraspanines ou les céramides) peuvent intervenir dans la biogenèse des exosomes. *ESCRT, Endosomal SortingComplex Required for Transport; ALIX, ALG-2 interacting protein X.*

2.2.1. Rôle de la machinerie ESCRT

Le complexe ESCRT-0 initie la voie MVE. Il se localise au niveau des endosomes grâce à l'interaction avec un phospholipide, le phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P). Sur les endosomes, l'ESCRT-0 se lie à des fragments d'ubiquitine qui sont fixés à des protéines membranaires destinées à la dégradation, et exécute ainsi la première étape de tri dans la voie MVE (Schmidt and Teis, 2012). Le facteur de croissance des hépatocytes Hrs (appartenat à l'ESCRT-0) recrute le Tsg 101 du complexe ESCRT-I, ce qui est essentiel pour lancer le tri des cargaisons en fonction des MVE (Henne et al., 2011). La sous unité Vsp28 du complexe ESCRT-I permet son interaction avec le domaine GLUE *(GRAM- like, ubiquitin binding in EAP45)* du complexe ESCRT-II.

Les molécules de cargaison pourraient être transférées d'un complexe ESCRT à un autre. Alternativement, les complexes ESCRT-0, -I et -II pourraient interagir simultanément avec différentes protéines membranaires et ainsi générer un microdomaine ou un domaine de tri à la surface des MVE. Après maturation, ce domaine se transforme en un site de formation des ILV. L'interaction de l'ESCRT-I avec ESCRT-II déclenche le processus de bourgeonnement de la membrane endosomale (Catalano and O'Driscoll, 2020; Henne et al., 2011; Schmidt and Teis, 2012).

Le complexe ESCRT-III recrute des déubiquitinases, qui servent de médiateurs pour la désubiquitination des cargaisons et donc le recyclage de l'ubiquitine avant la formation des

vésicules (Henne et al., 2011; Schmidt and Teis, 2012). L'ESCRT-III est nécessaire pour la scission des ILV dans la lumière des MVE (van Niel et al., 2018). Enfin, le complexe Vps4 intervient également pour achever chaque cycle de tri des cargaisons des MVE et de formation des ILV (**Figure 11**) (Frydrychowicz et al., 2015)

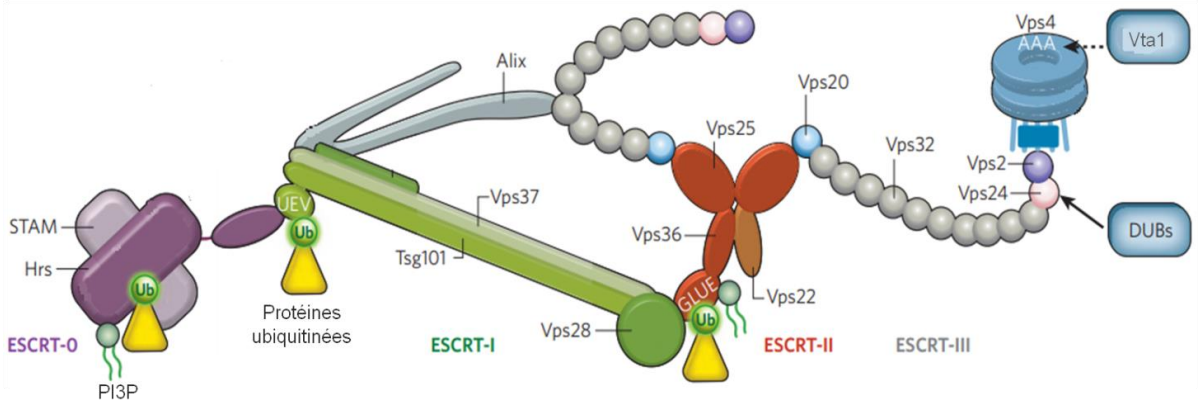


Figure 11: Composition et interactions moléculaires de la machinerie ESCRT (Raiborg and Stenmark, 2009).

ESCRT, Endosomal SortingComplex Required for Transport ; STAM, Signal transducing adapter molecule 1; PI3P, Phosphatidylinositol 3-phosphate; Hrs, hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate; Tsg 101, tumor susceptibility gene 101; UEV, ubiquitin E2 variant; GLUE, GRAM- like, ubiquitin binding in EAP45 ; ALIX, ALG-2 interacting protein X.

Une mutation dans l'ensemble du complexe ESCRT n'aboutit pas à l'inhibition totale de la formation des ILV, suggérant l'intervention d'autres mécanismes dans la biogénèse des exosomes.

2.2.2. Rôle des tétraspanines

Il est intéressant de noter qu'en absence d'ESCRT, des MVE et des exosomes peuvent être formés, de sorte que les cellules dans lesquelles les quatre sous-unités du complexe ESCRT ont été mutées ou non exprimées sont capables de générer des VE-CD63^{+} (Andreu and Yáñez-Mó, 2014). Les tétraspanines qui sont des protéines transmembranaires, sont impliquées dans la libération des exosomes indépendante de l'ESCRT. Il a été démontré que l'expression des tétraspanines CD9 et CD82 favorise la libération des exosomes par les cellules HEK293. Par ailleurs, il a été démontré que les cellules dendritiques de la moelle osseuse (*Bone Marrow Dendritic Cells,* BMDC) de souris, dont le CD9 n'est pas exprimé, sécrètent moins d'exosomes (Hessvik and Llorente, 2018). Récemment, il a été démontré que la tétraspanine CD63 joue également un rôle dans la biogenèse des exosomes (Hessvik and Llorente, 2018).

2.2.3. Rôle des céramides

En plus des protéines, les lipides sont également des acteurs essentiels du transport vésiculaire (Brügger and Bankaitis, 2012), et les deux types de molécules collaborent étroitement aux mécanismes de formation vésiculaire tels que la déformation, la fission et la fusion de la membrane (McMahon and Boucrot, 2015). La courbure membranaire dépend fortement de la forme des lipides membranaires individuels, qui dépend de la taille du groupe de tête, de la longueur et de la saturation des chaînes acyles. Plusieurs études ont montré l'implication des lipides dans la formation des exosomes en ciblant des enzymes spécifiques modifiant les lipides. L'inhibition de la sphingomyélinase 2 neutre (nSMase2), une enzyme qui génère du céramide à partir de la sphingomyéline (Sph), a montré qu'elle réduisait la libération des exosomes des cellules Oli-neu et PC-3 (Trajkovic et al., 2008). Ce mécanisme n'est pas élucidé, mais il pourrait être dû à la formation de microdomaines de céramides coalescents dans des domaines plus larges, favorisant le bourgeonnement des membranes (Trajkovic et al., 2008). Il convient de mentionner que le rôle de la céramide dans la libération d'exosomes n'est pas général, car il n'a été reproduit que dans certaines des lignées cellulaires où il a été testé (Kosaka et al., 2010; Mittelbrunn et al., 2011; Phuyal et al., 2014; van Niel et al., 2011).

La biogénèse des exosomes a souvent été décrite comme un mécanisme soit dépendant, soit indépendant de l'ESCRT (Raposo and Stoorvogel, 2013), mais ces voies de libération ne peuvent pas être entièrement séparées (Maas et al., 2017). Elles peuvent fonctionner en synergie, et différentes sous-populations d'exosomes peuvent dépendre de ces différents mécanismes. De plus, le type de cellule et/ou l'homéostasie cellulaire pourraient être des facteurs importants dans la machinerie qui contrôle la sécrétion des exosomes.

3. Microvésicules

3.1. Définition des microvésicules

Dans ce manuscrit, le terme « microvésicules » regroupe l'ensemble des VE provenant de la membrane plasmique, bien que de nombreux autres termes soient reportés dans la littérature (microparticules, ectosomes, exovésicules, …). Ce sont des termes utilisés pour décrire les vésicules intactes, submicroniques, riches en phospholipides, libérées directement de la surface par bourgeonnement extérieur de la membrane plasmique **(Figure 12)** (Raposo and Stoorvogel, 2013). En fonction du type cellulaire, la densité des MV est comprise entre 1,02 et 1,22. Il s'agit d'une population hétérogène de forme irrégulière et de taille variable allant de 100 à 1000 nm

(Abels and Breakefield, 2016; Badimon et al., 2016; Revenfeld et al., 2014). De nombreuses études datées des années 1990, ont décrit les MV dérivées des lymphocytes, des granulocytes, des monocytes, des cellules endothéliales ainsi que des cellules tumorales (Hamilton et al., 1990; Satta et al., 1994).

Généralement, les MV sont libérées par les cellules lors de leur activation qui provoque un déséquilibre dans l'asymétrie de la membrane cellulaire, entrainant la sécrétion de MV possédant une bicouche de phospholipides constituée de phosphatidylsérines (PS) sur leur feuillet membranaire externe. En plus des marqueurs membranaires de la cellule d'origine, les PS sont devenus une caractéristique dominante dans l'identification des MV (Inal et al., 2013). La composition interne des MV est partiellement similaire à celle des autres types de VE et reflète celle de leur cellule parentale (Revenfeld et al., 2014). Comme tout type de VE, les MV peuvent être détectées dans divers fluides corporels. La centrifugation à des vitesses comprises entre 14 000 et 20 000 g est la méthode la plus adaptée pour l'isolement des MV (Mateescu et al., 2017; Menck et al., 2017)

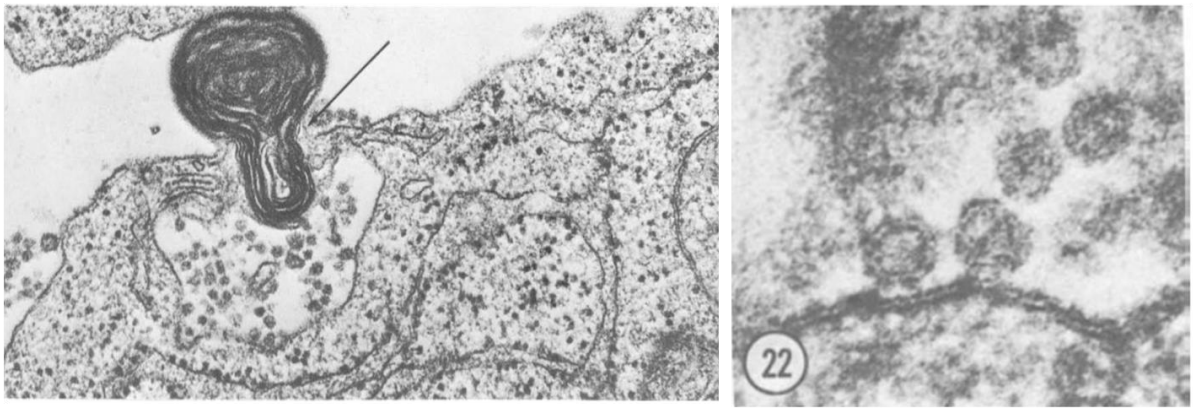


Figure 12: Première observation du bourgeonnement de la membrane plasmique et de la sécrétion des microvésicules (Dalton, 1975)

3.2. Biogénèse des microvésicules

Les MV sont libérées des cellules dans des conditions physiologiques, en particulier pendant la croissance cellulaire. La libération est accrue lorsque les cellules sont activées en raison d'une lésion cellulaire, de stimulants pro-inflammatoires, d'une hypoxie ou d'un stress oxydant (Inal et al., 2013). La formation des MV fait intervenir plusieurs mécanismes qui seront détaillés dans les paragraphes suivants **(Figure 13)**.

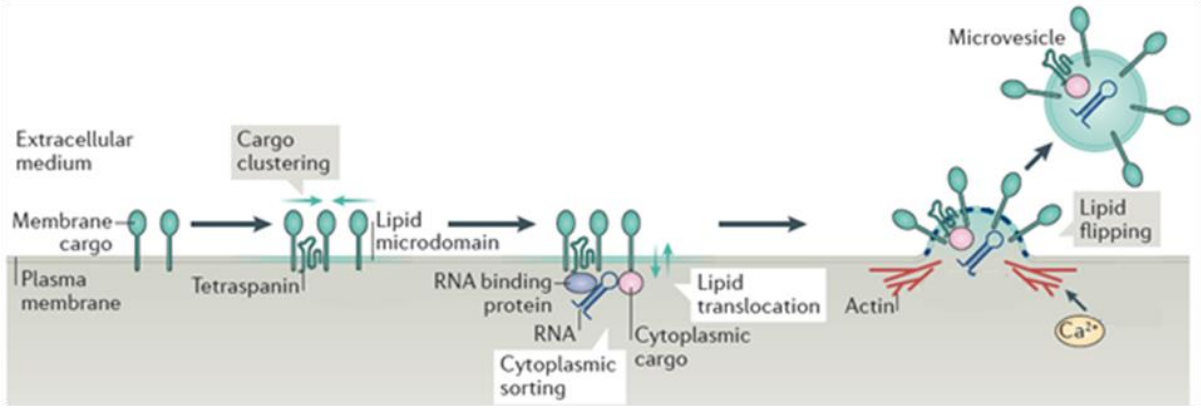


Figure 13: Biogénèse des microvésicules (van Niel et al., 2018).
Les microvésicules sont sécrétées vers le milieu extracellulaire après formation des microdomaines dans la membrane plasmique qui regroupent les lipides, les protéines et les ARN destinés à être encapsulés et transportés par les MV. Une augmentation du calcium intracellulaire stimule une machinerie enzymatique qui conduit à l'externalisation de la phosphatidylsérine (PS) vers le feuillet externe de la membrane plasmique. La perte de l'asymétrie de la membrane qui en résulte provoque une surcharge transitoire des phospholipides aboutissant à la formation des MV. *RNA, Ribonucleic acid.*

3.2.1. Asymétrie de la membrane plasmique

Les phospholipides de la membrane plasmique sont répartis de manière asymétrique entre les deux feuillets. La présence de glycérophospholipides et de sphingolipides contribue à cette asymétrie. Parmi les glycérophospholipides, la phosphatidylcholine (PC) se trouve principalement dans le feuillet externe (extracytosolique), et les aminophospholipides comme la phosphatidylsérine (PS) et la phosphatidyléthanolamine (PE), ainsi que des lipides mineurs comme le phosphatidylinositol et l'acide phosphatidique, sont confinés dans le feuillet interne (feuillet cytosolique). Les sphingolipides (Sph), la sphingomyéline (SM) et les glycosphingolipides, sont abondants dans le feuillet externe **(Figure 14)**. Il convient de noter que la PS et la PE sont chargées négativement, tandis que la SM et la PC sont chargées positivement. La translocation des lipides d'un feuillet à l'autre est appelée "flip-flop", le "flip" étant le mouvement du feuillet extracytosolique au feuillet cytosolique, et "flop" étant l'inverse.

L'asymétrie de la membrane plasmique est maintenue grâce à l'activité d'enzymes transmembranaires particulières (Ikeda et al., 2006). Les ATPases de type P de la sous-famille P4 catalysent le transport des phospholipides entre les deux feuillets de la membrane plasmique **(Figure 14)**. Ces transporteurs sont appelés flippases et floppases. La flippase permet le transport actif des lipides, surtout de la PS, du feuillet externe vers le feuillet cytosolique (vers l'intérieur). Par contre, la floppase contribue au transport actif non spécifique des phospholipides du feuillet interne vers le feuillet externe. La scramblase catalyse un mouvement indépendant

de l'ATP et bidirectionnel (flip-flop) de nombreux lipides à travers la membrane plasmique (Montigny et al., 2016).

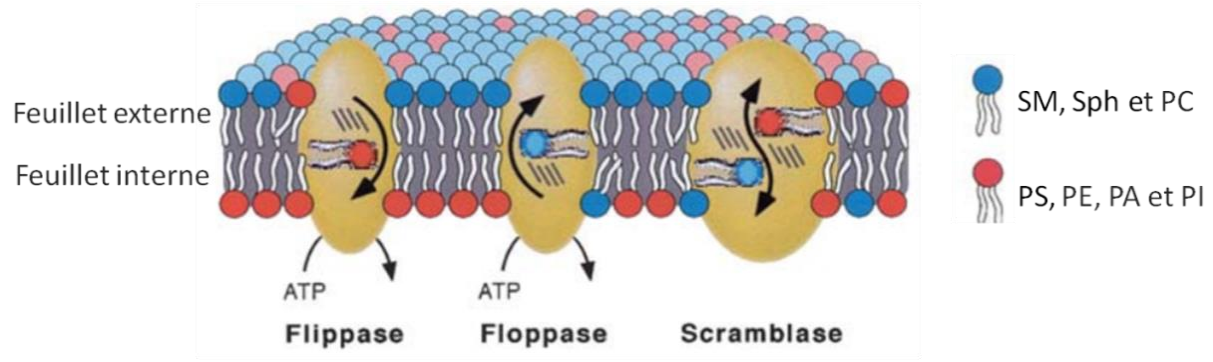


Figure 14: Échange de phospholipides régulé par les transporteurs entre les deux feuillets lipidiques de la membrane cellulaire (Zwaal et al., 2005).
Sph, sphingolipides ; SM, sphingomyéline ; PC, phosphatidylcholine ; PS, phosphatidylsérine ; PE, phosphatidyléthanolamine ; PI, phosphatidylinositol ; PA, acide phosphatidique.

3.2.2. Externalisation de la PS dépendante du Ca^{2+}

Lors de l'activation cellulaire, la formation des MV est initiée par une augmentation du taux de calcium (Ca^{2+}) intracellulaire conduisant à un réarrangement des phospholipides membranaires (Pasquet et al., 1996). La flippase est inhibée par l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire. Les deux autres enzymes, floppase et scramblase, sont activées. A l'inverse de la flippase, la floppase induit la translocation de la PS (chargées négativement) du feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane plasmique, tout en équilibrant les charges de phospholipides des 2 feuillets de la membrane (Ståhl et al., 2019).

3.2.3. Remodelage du cytosquelette Ca^{2+}-dépendant et génération des MV

En plus de son effet sur l'activité des transporteurs membranaires, le Ca^{2+} intracellulaire provoque le remodelage des protéines du cytosquelette. L'augmentation du calcium intracellulaire active la calpaïne, une protéase sensible au calcium, conduisant à la dégradation des protéines membranaires du cytosquelette intracellulaire comme la filamine et la myosine (Pasquet et al., 1996). En outre, la gélosine est une autre protéase sensible à la hausse du Ca^{2+}. Son activation induit la dégradation des protéines chaperon des filaments d'actine, permettant son remodelage. La déstabilisation du cytosquelette provoque la perte de son adhésion à la membrane plasmique (Hartwig et al., 1989).

La modification de l'asymétrie membranaire ainsi que la déstabilisation du cytosquelette induisent des courbures naturelles de la membrane plasmique **(Figure 15)**. Par conséquent, les MV se forment dans des microdomaines de la membrane plasmique connus sous le nom de radeaux lipidiques ou domaines caveolae (del Conde, 2005).

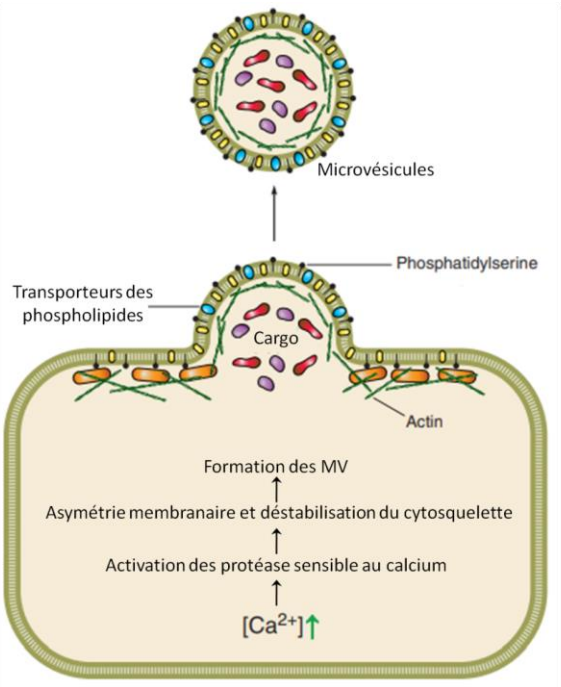


Figure 15: Rôle du calcium dans la sécrétion des MV (Turturici et al., 2014).

4. Composition des VE en lipides, protéines et acides nucléiques

Comme mentionné précédemment, les VE sont des petites entités membranaires formées d'une bicouche lipidique dont la composition en lipides, protéines et acides nucléiques diffère selon leur origine. Ainsi, les exosomes contiennent un large répertoire de ces molécules qui reflète leur origine endosomale. En revanche, la composition des MV se rapproche davantage de celle de la membrane plasmique. En outre, la composition moléculaire des VE dépend largement du type cellulaire dont elles sont issues **(Figure 16)**.

Pour améliorer la compréhension de la complexité des VE, des bases de données, regroupant les résultats de différentes études réalisées, ont été créées. Exocarta a été incorporé dans une base de données plus complète appelée Vesiclepedia, qui comprend également des données sur tout type de VE (http://microvesicles.org) (Kalra et al., 2012) et est continuellement mise à jour avec l'aide de la communauté scientifique qui effectue des recherches sur les VE. Ces bases de données contiennent des informations non seulement sur les protéines, mais aussi

sur les acides nucléiques et les lipides, ainsi que sur les procédures de purification utilisées. Leur mise à jour continue en fait un outil essentiel pour améliorer la compréhension de la complexité des VE (Colombo et al., 2014).

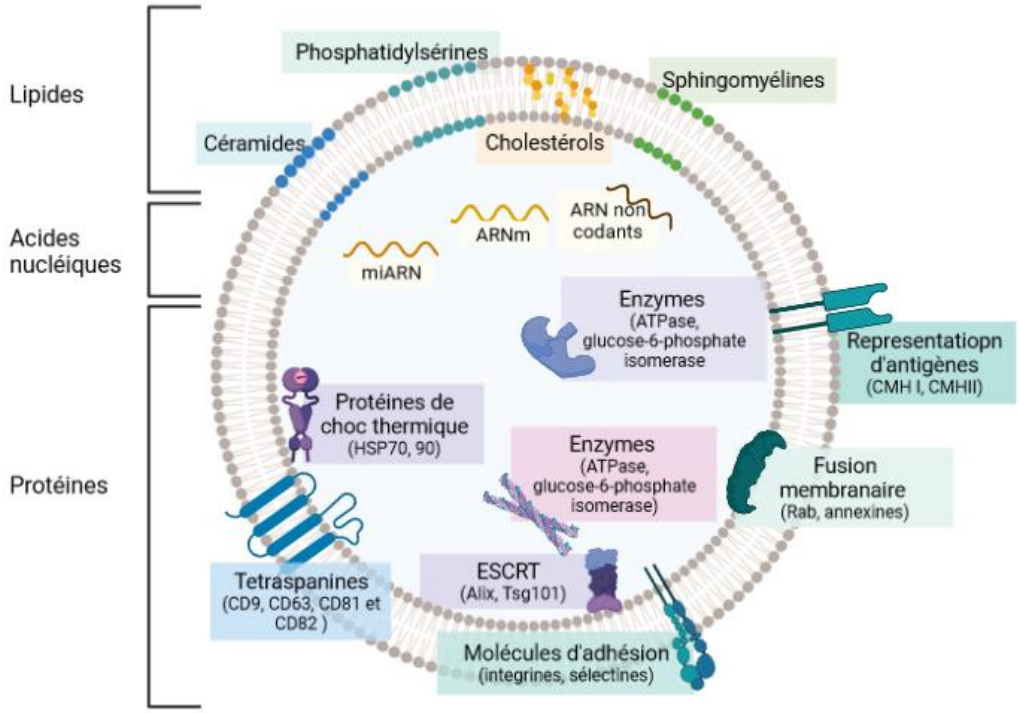


Figure 16: Représentation schématique de la composition des VE.
Parmi les exemples de tétraspanines que l'on trouve couramment dans les VE, citons les CD63, CD81 et CD9. Notez que chacun des composants énumérés peut en fait être présent dans certains sous-types de VE et pas dans d'autres. *ARF, Adenosine diphosphate-Ribosylation Factor ; ESCRT, endosomal sorting complex required for transport ; LAMP, Lysosomal-associated membrane protein 1 ; CMH, major histocompatibility complex; MFGE8, Milk fat globule-EGF factor 8 protein ; RAB, Ras-associated binding protein; TfR, transferrin receptor.*

4.1. Composition lipidique

L'étude de la composition lipidique des exosomes et des MV n'est pas aussi développée que celle des protéines, toutefois, de nombreux lipides ont été identifiés. A ce jour, environ 280 espèces de lipides appartenant à 18 classes différentes ont été identifiés (Llorente et al., 2013). Plusieurs études montrent un enrichissement des exosomes de 2 à 3 fois en cholestérol, SM et glycosphingolipides. Les exosomes contiennent généralement moins de PC que leurs cellules parentales, et seules de petites modifications ont été signalées pour la PS dans la plupart des études (Skotland et al., 2017). Tout comme les exosomes, les MV contiennent du cholestérol, des SM ainsi que des gangliosides et des phospholipides. L'asymétrie présente dans la membrane plasmique des cellules vivantes n'est pas conservée dans les MV, qui sont

caractérisées par l'exposition de la PS sur leur feuillet externe, ce qui n'est pas le cas pour les exosomes (Ståhl et al., 2019).

4.2. Composition protéique

Les protéines constituant les VE ont tout d'abord été identifiées par des techniques utilisant des anticorps comme l'immunomicroscopie électronique et le western blot. Le développement des techniques d'analyse protéomique dans les années 1990 a rapidement permis l'identification à grande échelle de protéines non prédéterminées dans les préparations de VE (Colombo et al., 2014). Certaines protéines sont ubiquitaires comme le CD63, c'est-à-dire qu'elles sont généralement retrouvées dans tous les VE et appartient aux protéines impliquées dans leur biogenèse. Les autres dépendent du type cellulaire, du statut physiopathologique ou encore des conditions de production. Un résumé des composants protéiques trouvés dans les exosomes est présenté dans le **Tableau 3**.

Tableau 3: Liste des protéines communément trouvées dans les exosomes.

Catégorie des protéines	Exemples	Références
Tétraspanines	CD9, CD63, CD81, etc.	Jankovičová et al., 2020
Biogénèse des MVB	Alix, Tsg101, ESCRT, etc.	McAndrews and Kalluri, 2019
Protéines de choc thermique	HSP70, HSP90	Wyciszkiewicz et al., 2019
Molécule d'adhésion	Integrines, molécule d'adhésion intracellulaire 1, etc.	Shimaoka et al., 2019
Protéines du cytosquelette	Actin, tubuline, myosine, cofiline-1, etc.	Zhang et al., 2019
Fusion membranaire	Protéines de la famille Rab, annexines, dynamine et syntaxin-3	Zhang et al., 2019
Enzymes de métabolisation	ATPase, glucose-6-phosphate isomérase, pyruvate kinase, etc.	Göran Ronquist, 2019
Facteurs de croissances et cytokines	TNF-α, IL-6, VEGF, etc.	(Joo et al., 2020)

MVE, multivesicular endosome; CD, clusters of différenciation; ALIX, ALG-2 interacting protein X ; Tsg101, tumor susceptibility gene 101; ESCRT, Endosomal Sorting Complex Required for Transport ; HSP, heat shock protein ; TNF-α, Tumor necrosis factor-α ; IL, interleukin ; VEGF, Vascular endothelial growth factor.

Tout comme les exosomes, les MV renferment un large spectre de protéines bioactives dépendant du type et du stimulus cellulaires comme des récepteurs, des molécules d'adhésion et de fusion. Puisqu'elles englobent une partie du cytoplasme, elles sont également riches en

chimiokines, cytokines, facteurs de croissance, protéines du cytosquelette, protéines de signalisation et enzymes de métabolisation (van Niel et al., 2018).

4.3. Composition en acides nucléiques

Outre les lipides et les protéines, une grande variété d'ADN (ADNdb, ADNs, ADNmt) et d'ARN (ARNm, ARNmi, ARNc) a été identifiée dans les exosomes et enregistrée dans les bases de données (Kalra et al., 2012). Tout comme les protéines, les ARN des exosomes sont enrichis de manière sélective et non pas de manière aléatoire. Les mécanismes impliqués dans la sélection de la cargaison des exosomes en acides nucléiques ne sont pas clairement identifiés (Valadi et al., 2007). Depuis 2007, de nouvelles perspectives ont été ouvertes le jour de la première description des ARNm dans les exosomes par l'équipe de Lötvall (Valadi et al., 2007). Dans cette étude, l'équipe a identifié la présence de 1 272 ARNm exosomaux fonctionnels qui peuvent être traduits par les cellules réceptrices, les mastocytes (Valadi et al., 2007), appuyant le fait que les exosomes constituent un vecteur de l'information génétique. En 2008, Skog et ces collaborateurs montrent que les MV et les exosomes sécrétés par les cellules de glioblastome renferment 27 000 ARNm fonctionnels, dont 4 700 sont exclusivement présents dans les VE et pas dans la cellule d'origine, confirmant l'implication des mécanismes de sélection des ARN au sein des VE (Skog et al., 2008). Egalement, la composition en ARNm a été étudiée pour les exosomes sécrétés par divers types cellulaires tels que les cellules tumorales (Xiao et al., 2012), les cellules immunitaires (Mitsuhashi et al., 2013) et les cellules souches (Tomasoni et al., 2013). Tout comme les ARNm, la première description des miARN dans les exosomes est réalisée par la même équipe, et publiée en 2007. Cette équipe a identifié la présence de 121 miARN dans les exosomes secrétés par les mastocytes (Valadi et al., 2007). Goldie et al. ont démontré que, parmi les petits ARN, la proportion de miARN est plus élevée dans les exosomes que dans leurs cellules parentales (Goldie et al., 2014). En outre, les profils en miARN des exosomes diffèrent de ceux des cellules parentales, ce qui fait que les cellules semblent posséder un mécanisme actif de sélection des miARN dans les exosomes (Zhang et al., 2015). Quel que soit le type cellulaire, certaines familles de miARN sont préférentiellement incorporées dans les exosomes, telles que miR-320 et miR-150 (Rana et al., 2013; Skog et al., 2008; Squadrito et al., 2014; Taylor and Gercel-Taylor, 2008). Les miARN s'incorporent non seulement dans les exosomes, mais aussi dans les MV. Une étude datée de 2006 publiée par Hunter, montre en effet la co-expression de 71 miARN dans les MV du plasma et leurs cellules d'origine. Parmi ceux-ci, 33 miARN sont spécifiquement exprimés dans les MV et pas dans les cellules parentales.

5. Interaction des VE avec les cellules cibles

Une fois libérées dans l'espace extracellulaire, les VE ciblent des cellules voisines ou à distance pour transmettre leur contenu et favoriser les changements phénotypiques affectant leur état physiologique ou pathologique (van Niel et al., 2018). À ce jour, plusieurs mécanismes ont été proposés pour décrire l'interaction des VE avec la cellule réceptrice, notamment : (1) la fusion des vésicules avec la membrane plasmique de la cellule réceptrice ; (2) l'endocytose et la libération de leur cargaison et (3) l'interaction ligand/récepteur **(Figure 17)**, mais les mécanismes précis par lesquels les VE interagissent avec leurs cellules cibles et transmettent leur contenu à celle-ci demeurent largement inconnus (Maas et al., 2017; Mulcahy et al., 2014; Russell et al., 2019).

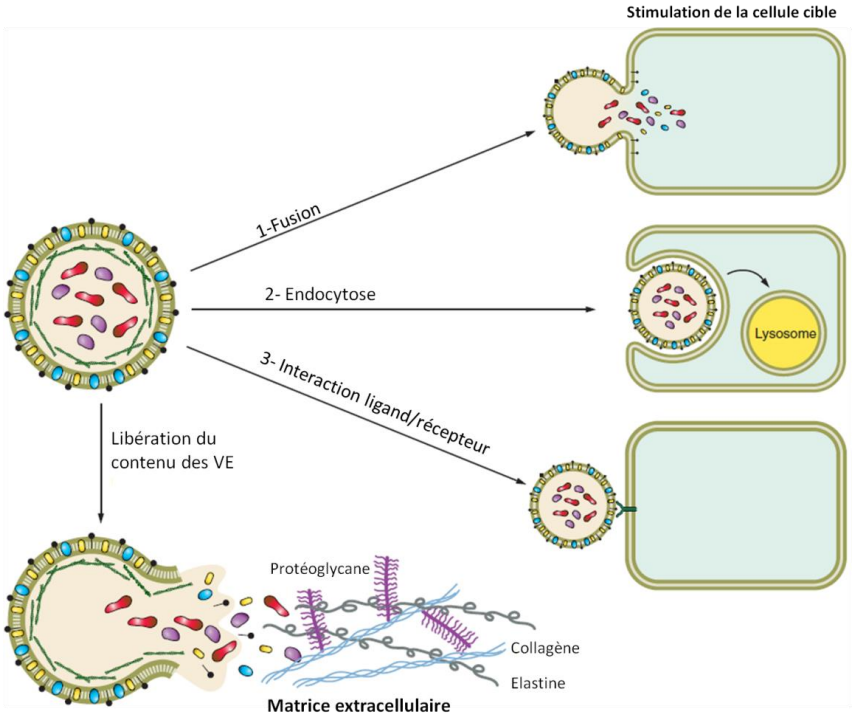


Figure 17: Mécanismes par lesquels les VE interagissent avec les cellules cibles (Turturici et al., 2014).

5.1. Liaison des VE à leurs cellules cibles

Le mode d'interaction des VE avec la membrane plasmique des cellules réceptrices et les mécanismes qui interviennent dans le transfert de leurs cargaisons ne sont pas entièrement élucidés. Ces processus sont complexes et dépendent de l'origine des VE ainsi que du type de la cellule réceptrice, et ils semblent être liés aux effets et aux processus en aval initiés par ces VE (Mulcahy et al., 2014).

La spécificité des cellules cibles est susceptible d'être déterminée par des interactions spécifiques entre les protéines enrichies à la surface des VE et les récepteurs de la membrane plasmique des cellules réceptrices (Prada and Meldolesi, 2016). Il convient de noter que la cellule réceptrice peut également être la cellule productrice elle-même, générant des réponses autocrines (Matsumoto et al., 2017). Plusieurs médiateurs de ces interactions sont connus, notamment les tétraspanines, les intégrines, les lipides, les lectines, les protéoglycanes de sulfate d'héparane et les composants de la matrice extracellulaire. Par exemple, les intégrines sur les VE peuvent interagir avec des molécules d'adhésion telles que les molécules d'adhésion intercellulaire à la surface des cellules réceptrices. En outre, il a été démontré que l'interaction des intégrines avec les protéines de la matrice extracellulaire, principalement la fibronectine et la laminine, joue un rôle important dans la liaison des exosomes et des MV aux cellules réceptrices (van Niel et al., 2018).

5.2. Internalisation et devenir intracellulaire des VE

Une fois liées aux cellules réceptrices, les VE peuvent rester sur la membrane plasmique ou être internalisées par endocytose dépendante ou indépendante des clathrines, comme la macropinocytose et la phagocytose, ainsi que par endocytose *via* les cavéoles et les radeaux lipidiques (Feng et al., 2010; Tian et al., 2014). La composition lipidique de la membrane plasmique des cellules réceptrices, telle que la présence de radeaux lipidiques, contribue à l'internalisation des VE. Il est important de noter que la dégradation des radeaux lipidiques par la diminution du cholestérol réduit l'internalisation des VE (van Niel et al., 2018).

6. Vésicules extracellulaires pulmonaires

6.1. Cellules pulmonaires productrices de VE

En plus de leur rôle en conditions physiologiques, les VE pulmonaires sont également impliquées dans des processus pathologiques (Wahlund et al., 2017). Différents types de cellules respiratoires peuvent libérer des populations hétérogènes de VE **(Figure 18)** (Fujita et al., 2015c; Haggadone and Peters-Golden, 2018) .

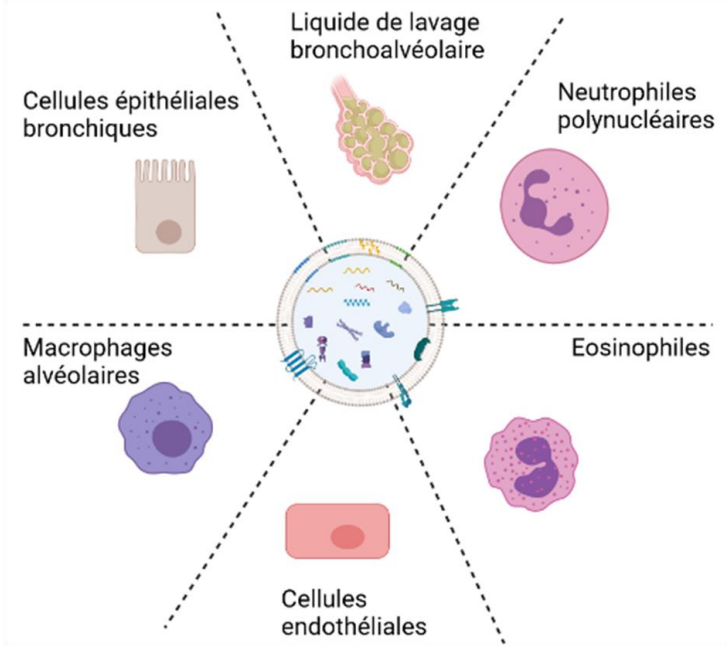


Figure 18: Cellules productrices de vésicules extracellulaires pulmonaires.

Cellules épithéliales bronchiques

Etant la principale cible des substances nocives inhalées, les cellules épithéliales bronchiques constituent une barrière efficace contre les molécules toxiques et une interface entre l'environnement interne et externe (Puchelle et al., 2006). Ces cellules ont été considérées comme étant la principale source de VE pulmonaires ayant une taille entre 30 et 100 nm (Kadota et al., 2016; Kulshreshtha et al., 2013). Cette hypothèse était basée sur l'expression de CD63 ou CD81 dans les cellules épithéliales, mais pour une certitude totale de l'origine cellulaire, les analyses devraient inclure la détection de marqueurs spécifiques de ces cellules dans les exosomes (Wahlund et al., 2017). Des études ont montré que l'inhalation des agents toxiques, tels que la fumée de la cigarette ou les PM, est associée à une augmentation du nombre des VE sécrétées par les cellules épithéliales bronchiques (Benedikter et al., 2017; Rodosthenous et al., 2015). De plus, Kulshreshtha et al, ont rapportés que la stimulation *in vivo* des cellules épithéliales par l'IL-13 induit la libération des exosomes jouant un rôle dans la prolifération des cellules monocytiques et dans le développement de l'asthme (Kulshreshtha et al., 2013).

Macrophages alvéolaires

Les MA résident dans la lumière alvéolaire (où ils sont continuellement exposés aux substances toxiques inhalées), facilitent l'élimination des matières particulaires (PM et micro-organismes) et aident à maintenir l'homéostasie du microenvironnement pulmonaire. Ces MA sont

incorporés dans le liquide luminal contenant des médiateurs endogènes sécrétés localement qui peuvent influencer leur différenciation et leur phénotype inflammatoire (Joshi et al., 2018). Pour maintenir l'homéostasie sur la surface alvéolaire, les MA établissent donc un dialogue complexe avec les autres cellules pulmonaires (immunitaires, épithéliales et endothéliales). En plus des facteurs solubles sécrétés, les MA sont capables de produire des VE impliquées dans ce dialogue, que ce soit dans des conditions normales, dans des conditions pathologiques, ou lors d'une exposition à des substances toxiques inhalées (Haggadone and Peters-Golden, 2018). Dans les cas de BPCO, le nombre de macrophages dans les poumons est en forte augmentation, et ils contribuent probablement à une augmentation de la sécrétion des VE. Les VE des MA transportent la protéine appelée SOCS (*suppressor of cytokine signaling*), et inhibent l'activation de STAT (*signal transducer and activator of transcription*) induite par IFNγ. Cela suggère un rôle des VE dans la régulation des processus inflammatoires pulmonaires (Wahlund et al., 2017).

Cellules endothéliales

La sécrétion des VE endothéliales peut être affectée lors d'une maladie pulmonaire, suite à des lésions des capillaires pulmonaires. Le nombre des MV circulantes dérivées de l'endothélium augmente chez les fumeurs présentant des signes d'emphysème précoce (Gordon et al., 2011), et les patients atteints de BPCO ont un nombre de MV endothéliales élevé avec une expression accrue des marqueurs endothéliaux (Takahashi et al., 2012).

Eosinophiles

Lors de leur activation par des récepteurs Fc ou des cytokines, les éosinophiles libèrent des cytokines et des granules au contenu fortement pro-inflammatoire (Barnes, 2008; Lambrecht and Hammad, 2015). Fernvik et al. ont constaté que les éosinophiles ont un pool intracellulaire enrichi en tétraspanine CD9, qui est considérablement réduit lors de leur activation (Fernvik et al., 1995), probablement en raison de la sécrétion de VE enrichies en CD9 (Kowal et al., 2016). Le nombre d'exosomes sécrétés par les éosinophiles augmente lors de leur stimulation avec l'IFNγ, et les éosinophiles de patients asthmatiques libèrent un nombre élevé d'exosomes qui peuvent jouer un rôle important dans la progression de l'asthme et être éventuellement considérés comme des biomarqueurs (Mazzeo et al., 2015).

Neutrophiles polymorphonucléaires

Les lésions des tissus pulmonaires causées par l'exposition à des produits chimiques toxiques peuvent entraîner la libération de signaux pro-inflammatoires par les cellules résidentes

déclenchant le recrutement des neutrophiles polymorphonucléaires (PMN) par extravasation de la circulation sanguine vers le site de la lésion. Les PMN sont également capables de produire différents types de VE. Tout d'abord, lors de leur extravasation et ensuite, lorsqu'ils arrivent sur le site inflammatoire, ils génèrent des microvésicules qui exercent des fonctions anti-inflammatoires en limitant les réponses immunitaires excessives des cellules voisines (Eken et al., 2013, 2010; Hong, 2018). Très récemment, il a été démontré que, dans les maladies pulmonaires inflammatoires chroniques, les PMN sécrètent des exosomes pathogènes pouvant contourner la barrière pulmonaire pour favoriser la destruction de la matrice extracellulaire dans les poumons (Genschmer et al., 2019).

Liquide de lavage bronchoalvéolaire

Enfin, de nombreuses preuves récentes mettent en évidence que les VE contenues dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire (BALF) sont impliquées dans diverses pathologies pulmonaires, comme le mentionnent Carnino et al. (Carnino et al., 2019). En outre, la compréhension de leur composition permet maintenant de les utiliser comme biomarqueurs pour de nombreuses maladies pulmonaires (J. E. Kim et al., 2018; McVey et al., 2016). Les premiers résultats publiés à cet égard concernent l'asthme, et soulignent que les profil des VE de BALF montrent des différences importantes entre les sujets sains et asthmatiques (homme ou souris), qui pourraient être cruciales dans la réponse inflammatoire conduisant à l'asthme (Francisco-Garcia et al., 2019; Hough et al., 2018; Nagano et al., 2019; Torregrosa Paredes et al., 2012). D'autres résultats de ce type concernent le cancer du poumon où, là encore, la teneur en VE dans le BALF augmente, ce qui suggère leur association à la croissance du cancer du poumon et la possibilité de les utiliser comme biomarqueurs de progression de cette maladie (Domagala-Kulawik, 2020; J. E. Kim et al., 2018; Zhang et al., 2019).

6.2. Maladies pulmonaires associées aux VE

Comme elles sont considérées comme véritables acteurs de communication intercellulaire, les VE jouent un rôle crucial, voir très important, dans le déclenchement des processus pathologiques, aboutissant au développement des maladies, surtout pulmonaires. Plusieurs études ont montré que le contenu des VE en miR, surtout en miR-223, induit l'activation des macrophages qui produisent, à leur tour, des VE contenant des molécules pro-inflammatoires (Ismail et al., 2013; Kulshreshtha et al., 2013; Fujita et al., 2015c; Nagano et al., 2019). Ces molécules agissent également comme des activateurs de la voie NF-κB dans les cellules

réceptrices, aboutissant à un état d'inflammation et au développement des maladies respiratoires comme l'asthme. De plus, l'exposition à des irritants ou à des polluant atmosphérique comme l'extrait de la fumée de cigarette (Cigarette smoke extract, CSE) induit l'expression de miR-210 dans les VE des cellules épithéliales bronchiques humaines, qui favorise la différenciation des myofibroblastes dans les fibroblastes pulmonaires primaires, ce qui suggère que les VE peuvent contribuer au développement fibrotique dans la BPCO (Fujita et al., 2015c; Ryu et al., 2018). Outre l'asthme et la BPCO, les études sur les VE sont en pleine expansion dans le domaine du cancer, notamment en vue de leur utilisation comme biomarqueurs de diagnostic (Vanni et al., 2017). Le contenu des exosomes sécrétés par les cellules cancéreuses, notamment en miR, possède la capacité à modifier le microenvironnement de la tumeur, à favoriser les métastases et l'angiogenèse et à moduler les réponses immunitaires (Kubo, 2018; Fujita et al., 2013, 2014, 2015d). L'étude de la composition de ces VE dérivés de cellules épithéliales bronchiques humaines exposées aux polluants atmosphérique, montre une diminution des niveaux d'expression de six miARN appartenant à la famille let-7, à savoir let-7a, -7b, -7c, -7f, -7g, et -7i après exposition (Fujita et al., 2015a, 2015b), ce qui est également identifié dans les tissus cancéreux du poumon. Egalement, les altérations de ces miARN suppresseurs de tumeurs contribuent au développement de tumeurs pulmonaires (Ryu et al., 2018).

Il y a quelques années, les VE sont apparues comme une source alternative pour la découverte de biomarqueurs, non seulement dans les maladies pulmonaires, mais aussi dans diverses MCV. En effet, certaines VE expriment le facteur tissulaire (TF), qui est capable de déclencher la production de thrombine par la voie de coagulation extrinsèque. La présence de PS et d'autres phospholipides chargés négativement dans la membrane des VE permet l'assemblage des facteurs de coagulation à la surface des VE et favorise ainsi davantage la génération de thrombine. (Benedikter et al., 2018b). Cordazzo et ses collaborateurs ont montré que l'exposition des monocytes et des macrophages à court et à long terme à la CSE entraîne une libération élevée de VE-PS^+ et TF^+, qui est associée à une activité procoagulante accrue (Cordazzo et al., 2014). Egalement, l'exposition aux PM provoque des changements de profil en miARN des VE qui devraient favoriser la coagulation (Pavanello et al., 2016; Pergoli et al., 2017).

Bien que les connaissances sur les mécanismes de la biogénèse des VE soient de plus en plus dévéloppés, l'implication des voies de signalisations toxiques induites par les PM dans la sécrétion des VE n'est pas étudiée à ce jour. Dans la partie suivante, ces voies de signalisations

toxiques des PM sont décrites afin de comprendre leurs effets sur les cellules d'une part, et d'établir un lien entre l'exposition aux PM et la sécrétion des VE d'une autre part.

Partie C : Toxicité des PM et Vésicules extracellulaire

1. Stress oxydant

1.1. Définition du stress oxydant

Le stress oxydant est un phénomène résultant d'un déséquilibre entre la production et l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (*reactive oxygen species*, ROS) et la capacité d'un système biologique à détoxifier les intermédiaires réactifs ou à réparer les dommages qui en résultent (Sies, 2019). En outre, les maladies cancéreuses, pulmonaires, cardiovasculaires et neurodégénératives sont causées par l'accumulation de dommages moléculaires dans l'ADN, les protéines et les lipides induite par une augmentation du stress oxydant en raison de la diminution progressive de l'élimination des ROS intracellulaires (Reuter et al., 2010).

1.2. Espèces réactives de l'oxygène

Le terme ROS est un terme général utilisé pour désigner toutes les molécules réactives comprenant au moins un atome oxygène, y compris les espèces radicalaires et non radicalaires, qui participent à l'initiation et/ou à la propagation des réactions en chaîne (Burton and Jauniaux, 2011; Sachdeva et al., 2014). Ces espèces sont produites, non seulement en réponse du métabolisme cellulaire normale, mais aussi suite à un stress environnemental (exposition à la pollution de l'air, au fumé de cigarette, aux xénobiotiques, etc.). Les ROS comprennent les radicaux anioniques superoxydes ($O_2^{\bullet -}$), les radicaux hydroxyles réactifs ($HO^{\bullet}$), les radicaux hydroperoxyles ($HO_2^{\bullet}$) et d'autres espèces non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'acide hypochloreux (HOCl) et l'oxygène singulet ($^1O_2$) (Lushchak, 2014). Les systèmes de défense antioxydants assurent le maintien de faible niveau non toxique des ROS.

1.3. Systèmes de défense antioxydants

Les antioxydants, que ça soient enzymatiques ou non, sont des molécules capable de rendre stables les radicaux libres et les ROS en réduisant leur énergie ou en neutralisant leurs charges, diminuant ainsi leur capacité à endommager une molécule cible (Nicol et al., 2000).

Les antioxydants non enzymatiques sont des molécules comme la vitamine A, C ou E, le glutathion, les béta carotènes, les flavones et hydroquinones, non synthétisés par l'organisme mais apportés par alimentation. Présents à très faible concentration, ces molécules inhibent les réactions d'oxydation, réduisant ainsi la capacité des ROS à endommager les molécules cibles.

Les systèmes antioxydants enzymatiques endogènes, comme la superoxyde dismutase (SOD2), la glutathion peroxydase (GPx), la catalase (CAT) et la glutathion réductase (GR), jouent un rôle crucial dans le maintien de fonctions cellulaires optimales (Birben et al., 2012). La SOD, première ligne de défense contre les radicaux libres, catalyse la réduction de l'$O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2, espèce moins réactive. H_2O_2 est ensuite réduit en eau et en oxygène par l'action de la CAT ou de la GPx, une sélénoprotéine tétramère. L'action de la GPx oxyde le glutathion (GSH) en sa forme oxydée (GSSG). La GR, une enzyme flavoprotéique, régénère le GSH à partir du GSSG, avec le NADPH comme source de pouvoir réducteur (Burton and Jauniaux, 2011). Le mécanisme est détaillé dans la **Figure 19**.

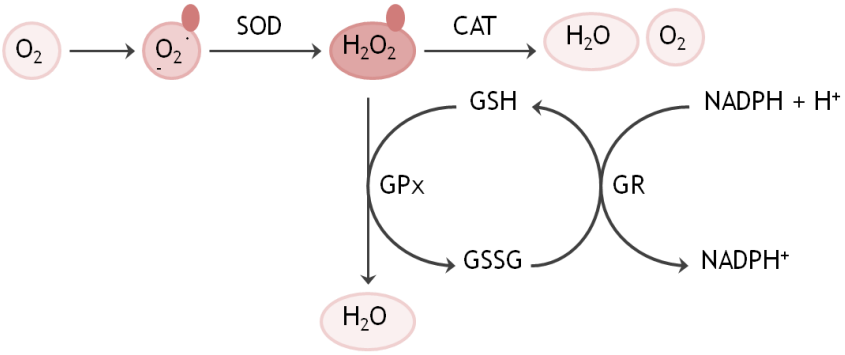


Figure 19: Mécanisme de défense enzymatique contre le stress oxydant.
O_2, dioxygène ; l'$O_2^{\bullet-}$; superoxydes ; SOD, superoxyde dismutase ; H_2O_2, peroxyde d'hudrogène ; CAT, catalase ; H2O, eau ; GPx, glutathion reductase ; GSH, glutathion réduit ; GSSG, glutathion oxydé ; GR, glutathion réductase ; NADPH, nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.

1.4. Mécanismes de defense antioxydant dépendant du Nrf2

Le facteur nucléaire érythroïde-2 (Nrf2) induit la transcription des enzymes antioxydantes comme la NADPH quinone oxydoréductase (NQO1), l'hème oxygénase (HMOX), la glutathione S-transférase Mu 1(GSTM1) (Hayes and McMahon, 2009). Dans les conditions physiologiques normales, la protéine Keap-1 (*Kelch-like-ECH associated protein*) est associée à Nrf2 dans le cytoplasme pour induire sa dégradation protéosomique. De plus, comme le métabolisme cellulaire normal produit des faibles quantités de ROS, Nrf2 possède toujours un niveau d'expression basal.

En cas de stress oxydant ou d'exposition à des activateurs de Nrf2 **(Figure 20)**, ce dernier se dissocie de Keap-1 en raison de l'oxydation des résidus cystéine de Keap1, ce qui empêche finalement l'ubiquitination de Nrf2 et sa dégradation protéasomique. Ensuite, Nrf2 se transloque dans le noyau, s'hétérodimérise avec des protéines Maf et c-jun, tout en formant un

complexe capable de se lié à l'élément de réponse aux antioxydants (ERA) et induit l'expression des gènes codant pour des protéines impliquées dans les défenses antioxydantes.

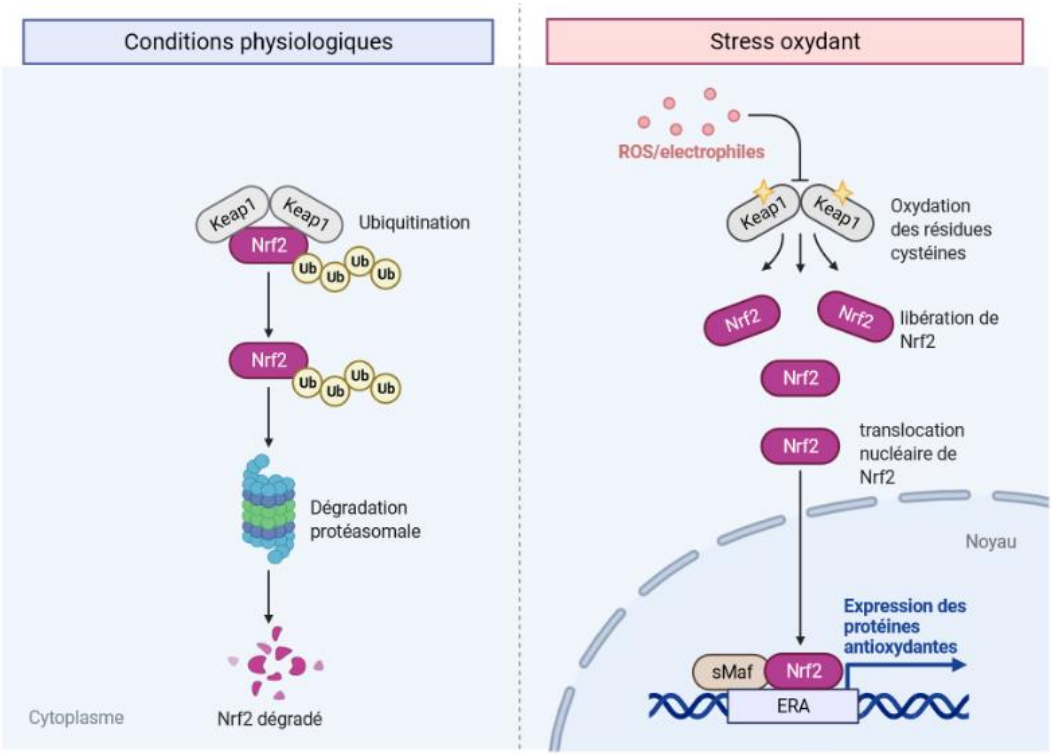


Figure 20: Voie de signalisation de Nrf2.
Sous les conditions normales, Nrf2 est séquestré par Keap1 qui induit sa dégradation protéasomale. L'augmentation du niveau des ROS conduit à l'oxydation des résidus cystéines sur Keap1 permettant la dégradation protéosomique de Keap1 et la translocation de Nrf2 dans le noyau. Complexé aux autres protéines comme la Maf, le Nrf2 se lie au niveau des régions spécifiques de l'ADN et induit l'expression des gènes d'enzymes de défense antioxydante.

1.5. Effets toxiques du stress oxydant

Bien que les ROS exercent des effets bénéfiques sur les réponses cellulaires et la fonction immunitaire à des niveaux faibles/modérés, ils peuvent également endommager toutes les structures cellulaires à des concentrations élevées, entraînant un certain nombre de maladies. Malgré que leur structure soit différente, les radicaux libres partagent de nombreuses propriétés communes, notamment la présence d'électrons non appariés sur leur orbite externe et leur grande capacité à oxyder d'autres molécules pour gagner des électrons et se stabiliser (Li et al., 2016). En effet, les radicaux libres sont hautement réactifs et peuvent facilement participer aux réactions chimiques avec pratiquement tous les composants cellulaires dans le corps humain, notamment les lipides, les protéines et les acides nucléiques. Les dommages oxydatifs qui en résultent provoquent des lésions cellulaires directes (Pryor et al., 2006; Risom et al., 2005).

1.5.1. Peroxydation lipidique

Les lipides insaturés sont les macromolécules biologiques les plus sensibles aux dommages causés par les radicaux libres. En éliminant l'hydrogène de la chaîne latérale hydrocarbonée d'un acide gras, les ROS, spécifiquement les radicaux hydroxyles, créent un radical centré sur le carbone (C˙). En présence d'oxygène, celui-ci peut réagir pour former un radical peroxyle (-C-O-O˙), qui à son tour est capable d'éliminer l'hydrogène d'un acide gras adjacent, propageant ainsi la réaction (Su et al., 2019). Divers produits toxiques sont ainsi formés suite à la peroxydation des lipides, tels que le malondialdéhyde (MDA), le 4-hydroxynonénal et divers 2-alcénals **(Figure 21)** (Li et al., 2016).

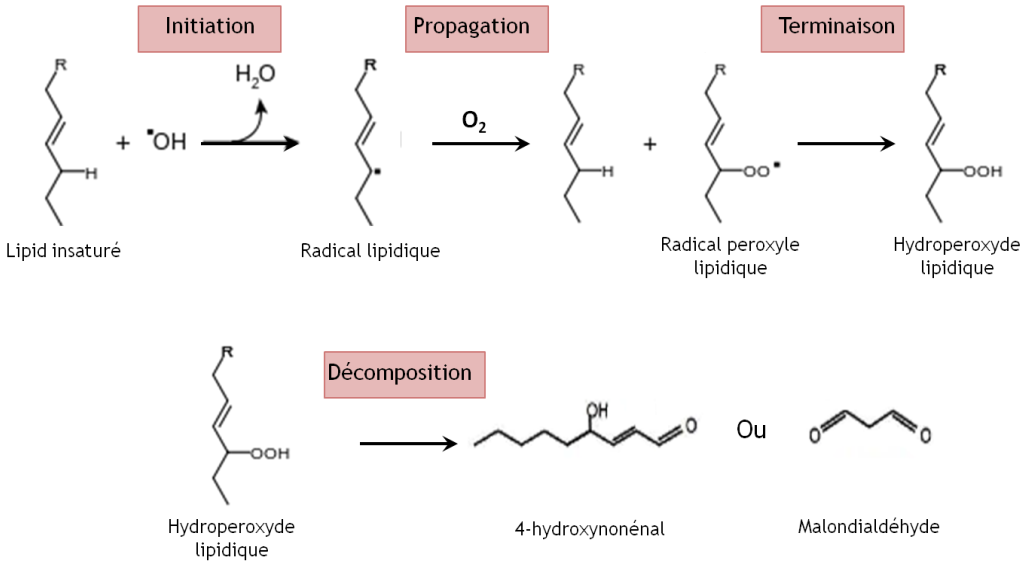


Figure 21: Mécanisme de peroxydation des lipides membranaires insaturés provoquée par les radicaux libre et les ROS (Sachdeva et al., 2014).

D'autre part, la production excessive de ROS provoque également une augmentation du taux de calcium intracellulaire ainsi que l'activation de la voie MAP Kinase (Korbecki et al., 2013). L'afflux de calcium entraîne l'activation de la protéine kinase C qui phosphoryle un résidu sérine d'une enzyme cytosolique, la phospholipase A2, ce qui provoque la production d'acide arachidonique. L'activation parallèle des MAP kinases par Src conduit à la transcription de la cyclooxygénase 2 qui utilise l'acide arachidonique pour produire des prostaglandines. Ce type de peroxydation des lipides est susceptible de provoquer une inflammation (Larigot, 2018).

1.5.2. Modification des protéines

Les protéines sont sensibles aux modifications oxydatives des chaînes latérales des acides aminés qui altèrent leur structure. Parmi les acides aminés, la cystéine (Cys) est plus susceptible

d'être oxydée par les ROS en raison de sa propriété nucléophile (Ahmad, 2017). La Cys fournit les groupements thiol des protéines qui existent soit sous forme libre réduite (Cys-SH), soit oxydés (Cys-S-S-Cys) formant un pont disulfure avec un autre groupe thiol de la même protéine (pont disulfure intramoléculaire) ou d'une autre protéine (pont disulfure intermoléculaire) (Poole, 2015). Ces liaisons disulfures sont formées d'une manière hautement régulée au cours de la biosynthèse des protéines, et sont essentielles pour une structure protéique tridimensionnelle correcte et, par conséquent, pour la fonction des protéines. Les ROS sont susceptibles de réagir avec les thiolates ou les thiols **(Figure 22)**. Cette attaque électrophile conduit à la formation de liaisons disulfures ectopiques pouvant affecter fortement la conformation et la fonctionnalité des protéines riches en cystéines (Antelmann and Helmann, 2011; Benedikter et al., 2018a).

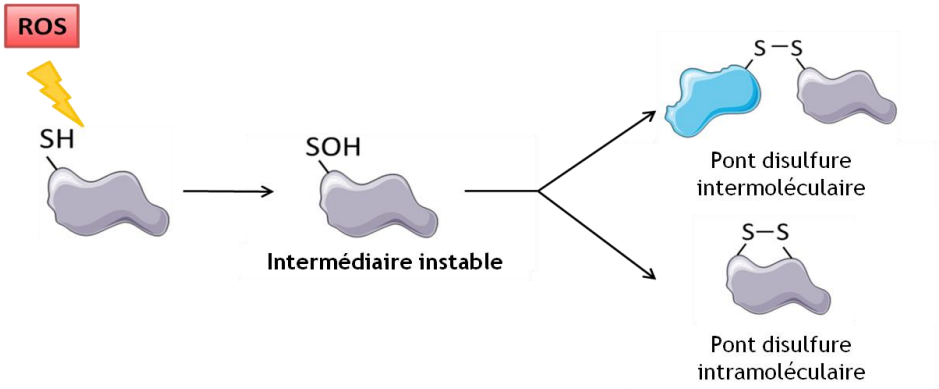


Figure 22: Représentation schématique des modifications des résidus thiols des protéines par les ROS (Benedikter et al., 2018a**).**

1.5.3. Oxydation de l'ADN

Bien que l'ADN soit une molécule stable et bien protégée, les ROS peuvent interagir avec lui et causer plusieurs types de dommages tels que les délétions, les décalages de cadre de lecture, l'oxydation des bases, les cassures doubles ou simple brin, les liaisons transversales ADN-protéines et les arrangements chromosomiques. L'ADN est principalement attaqué par les radicaux HO˙. Par exemple, HO˙ peut s'ajouter à la guanine pour produire de la 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine (8-OHdG) (Srinivas et al., 2019; Valavanidis et al., 2009). Comme les dommages oxydatifs de l'ADN peuvent affecter le cycle cellulaire et entraîner des mutations, il a été suggéré que l'altération de l'ADN est en partie responsable de la cancérogenèse (Gupta et al., 2012; Valko et al., 2004).

1.6. Stress oxydant et PM

La capacité des PM inhalables à générer des ROS et d'autres oxydants ou des radicaux libres après pénétration dans le système respiratoire jusqu'à atteindre les alvéoles pulmonaires est considérée comme le principal facteur impliqué dans leur potentiel pathogène.

1.6.1. Stress oxydant induit par les PM entières

Un grand nombre d'études *in vitro* et *in vivo* soutiennent l'idée que les PM peuvent induire un stress oxydant pulmonaire. Les particules induisent l'activation des macrophages alvéolaires et des neutrophiles qui libèrent des ROS hautement réactifs dans le poumon. Egalement, les PM contiennent des spores de champignons et des endotoxines qui peuvent déclencher la production des ROS (Haberzettl et al., 2014). De nombreuses études *in vitro* ont montré que l'exposition aux PM induit la formation de ROS, notamment de $HO^{\cdot}$ et par conséquent de 8-OHdG dans des lignées de cellules épithéliales pulmonaires (André et al., 2011; Dergham et al., 2015, 2012; Knaapen et al., 2002). Selon Sato et al., la formation des adduits 8-OHdG, considéré comme biomarqueur des lésions oxydatives de l'ADN, est d'ailleurs augmentée chez les souris exposées aux particules d'échappement de diesel (DEP), et corrélée avec la formation de tumeurs pulmonaires chez les souris exposées (Sato et al., 2000). D'autre études ont mis en évidence la capacité des $PM_{2.5}$ à déclencher la génération de ROS, pouvant participer à des réactions en chaines et à induire la production du MDA, confirmant l'implication des PM dans l'induction des peroxydations lipidiques (Ambroz et al., 2016; Kouassi et al., 2010; Pereira et al., 2007).

L'exposition *in vitro* aux PM induit l'expression des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires (TNF-α, IL-6, IL,8, etc) suite à l'activation du facteur de transcription NF-κB (*Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) (Li et al., 2009; Shukla et al., 2000). Pour se défendre contre les dommages oxydatifs, les cellules augmentent la production des enzymes antioxydantes par l'activation de Nrf2. Selon l'étude réalisée par Li et ses collaborateurs, les particules semblent inhiber les enzymes protectrices sous la régulation de NrF2 impliquées dans les réponses liées au stress oxydant, ce qui entraîne l'activation de cascades de signalisation intracellulaires supplémentaires augmentant ainsi l'expression des gènes des cytokines et des chimiokines pro-inflammatoires (Li et al., 2009). Ce mécanisme est conforté par des études *in vivo* montrant que l'augmentation de la production de ROS après exposition aux PM induit une surexpression des gènes induits par NF-κB, comme TNF-α, TGF-β, IFN-ɣ et IL-6 (González-Flecha, 2004).

1.6.2. Stress oxydant induit par la fraction organique des PM

La composition complexe des PM, notamment en HAP et métaux, joue un rôle crucial dans leur pouvoir oxydant. Les HAP et les nitro-HAP adsorbés à la surface des particules peuvent générer des ROS. Valavanidis et al. ont démontré que les quinoïdes à cycle redox et les HAP agissent en synergie pour produire des ROS (Valavanidis et al., 2005). Dans la fraction organique provenant des processus de combustion incomplète, les principaux composés réactifs et toxiques sont les HAP substitués (par exemple, le méthyl naphtalène) et non substitués, le nitro-HAP (1-nitropyrène et 3-nitro-fluoranthène) et les dinitro-HAP (dinitropyrène) (Finlayson-Pitts, 1997; Squadrito et al., 2001). Ces composés peuvent induire des lésions oxydatives et des altération de l'ADN *via* la génération de ROS (Abbas et al., 2018; Libalova et al., 2018).

D'autres observations ont montré que les DEP, en raison de leur composition et de leur taille fine et ultrafine, peuvent induire d'importants dommages oxydatifs. Une étude a rapporté que la fraction organique des DEP, principalement constituée de HAP et de quinones, subit une activation métabolique dans les poumons et est capable de générer des ROS et des HAP réactifs, jouant un rôle important dans l'induction des dommages cellulaires et provoquant une peroxydation lipidique et des lésions oxydatives à l'ADN (Lodovici and Bigagli, 2011; Ma and Ma, 2002).

1.6.3. Stress oxydant induit par les métaux de transitions des PM

Les métaux de transition tels que le fer, le plomb, le mercure, le cadmium, l'argent, le nickel, le vanadium, le chrome, le cobalt, le manganèse et le cuivre sont détectables dans les $PM_{2.5}$ et les particules ultrafines et sont capables de générer des ROS par la réaction Fenton (Pratviel, 2012). En tant que constituants critiques des PM, les métaux de transition sont supposés être impliqués dans un certain nombre de processus pathologiques du système respiratoire par le biais de dommages causés par les radicaux libres et les ROS. Par exemple, le Fe(II) catalyse la réduction de H_2O_2 en $HO^{\bullet}$, capables de réagir avec n'importe quelle base nucléique ainsi qu'avec les entités 2-désoxyribose provoquant des rupture de l'ADN et des mutations irréversibles (Pratviel, 2012). D'autres métaux de transition [Cr(II), Pb(II) et Cd(II)] peuvent également participer à des réactions en chaine induisant la peroxydation des lipides *via* la génération de la formation de $HO^{\bullet}$ (Benedet and Shibamoto, 2008).

1.7. Stress oxydant et VE

Des études récentes ont montré un lien entre stress oxydant et VE. Il a notamment été montré que le stress oxydant peut avoir un effet sur la régulation de la libération des VE ou sur la modification de leur contenu, surtout en protéines et en miARN (Szabó-Taylor et al., 2015).

1.7.1. Effet du stress oxydant sur la sécrétion des VE

Les conditions pro-oxydantes semblent induire la libération des VE (Benedikter et al., 2018a). Il convient de souligner que les cellules tumorales et les cellules sénescentes produisent également un nombre plus élevé de VE, et que ces deux types de cellules ont un équilibre redox altéré avec des niveaux élevés de ROS (Bodega et al., 2019; Burger et al., 2012; Huber et al., 2005).

Un certain nombre d'études *in vitro* ont montré que la sécrétion des VE est induite par les ROS et que le traitement des cellules par des antioxydants à base de thiol tels que la NAC inhibe ce processus (Benedikter et al., 2017; Carver and Yang, 2016), ce qui suggère que l'attaque des résidus thiols des protéines est l'un des mécanismes par lesquels les ROS induisent la sécrétion des VE. En outre, Larson et al. ont montré que le traitement des hépatocytes de rats par l'hydroperoxyde de tert-butyle induit la sécrétion des VE, surtout des MV, d'une manière dépendante du calcium, et de la protéase dépendante du calcium, la calpaïne. La calpeptine, un inhibiteur de la calpaïne, inhibe le bourgeonnement de la membrane cellulaire et la sécrétion des MV (Larson et al., 2014; Miyoshi et al., 1996; Szabó-Taylor et al., 2015).

1.7.2. Effet du stress oxydant sur la composition des VE

Des études *in vitro* et *in vivo* ont confirmé que les VE sécrétées en conditions oxydatives peuvent exercer des activités prothrombotiques (Li et al., 2010; Lim et al., 2010; Novelli et al., 2014; Vatsyayan et al., 2013). Cet effet a été attribué au PS et au TF associés aux VE (Benedikter et al., 2018a; Furlan-Freguia et al., 2011; Li et al., 2010; Lim et al., 2010; Novelli et al., 2014; Vatsyayan et al., 2013). Les membranes riches en PS fournissent une surface chargée négativement pour l'assemblage des facteurs de coagulation et favorisent ainsi la coagulation (Owens and Mackman, 2011). L'expression et l'activité du TF sont augmentées dans les VE sécrétées par les cellules stimulées par des composés réactifs au thiol, ce qui suggère que les modifications redox induites par les ROS sont des régulateurs importants de la quantité et de l'activité du TF associé aux VE (Benedikter et al., 2018a).

Outre les phospholipides et les protéines, les VE peuvent également encapsuler des miARN impliquées dans la régulation du stress oxydant. En particulier, les miR-126, ainsi que les miR-21, miR-128, miR-144, miR-34a-5p, miR-1915-3p et miR-638, sont tous impliqués dans le stress oxydant et ont été trouvés dans les VE (Bodega et al., 2019).

2. Inflammation

Les études toxicologiques, cherchant à comprendre par quel(s) mécanisme(s) les particules exercent leurs effets, ont permis de mettre en évidence l'apparition d'une réponse inflammatoire.

2.1. Généralités sur le système immunitaire

Le système immunitaire est un système biologique complexe qui englobe l'ensemble des mécanismes de défenses de l'organisme. Ce système assure la lutte ponctuelle aussi bien contre des organismes pathogènes que des molécules toxiques ou des cellules cancéreuses. On distingue le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif.

2.1.1. Le système immunitaire inné

Les réponses immunitaires innées impliquent tous les mécanismes de défense immunitaire qui ne nécessitent pas de mémoire immunologique spécifique à l'antigène. Il agit rapidement sans spécificité et de manière répétée jusqu'à résolution de l'agression (Biron, 2016). Les cellules phagocytaires telles que les macrophages sont capables de phagocyter et de détruire ces pathogènes. Bien que les cellules immunitaires innées, comme les macrophages, les neutrophiles et les cellules dendritiques (CD), jouent un rôle important, les cellules non professionnelles telles que les cellules épithéliales contribuent également à l''immunité innée (Biron, 2016; Porcelli, 2017). Les récepteurs de reconnaissance de motifs appelés PRR (*pattern recognition receptor*), sont exprimés non seulement sur les cellules immunitaires professionnelles mais aussi dans diverses cellules immunitaires non professionnelles, et sont responsables de la détection de la présence de micro-organismes. Pour ce faire, ils reconnaissent les structures conservées chez les espèces microbiennes, appelées motifs moléculaires associés aux agents pathogènes ou PAMP (*pathogen-associated molecular patterns*), ou également des molécules à motifs moléculaires associés à des dommages ou DAMP (*damage-associated molecular pattern*) en tant que signaux de danger endogènes qui alertent le système immunitaire inné en cas de mort cellulaire non programmée, d'invasion

microbienne et en réponse au stress (Gold et al., 2005; Takeuchi and Akira, 2010; Tang et al., 2012). La détection des PAMP ou des DAMP par ces récepteurs régule la transcription des gènes impliqués dans les réponses inflammatoires tels que les cytokines pro-inflammatoires, etc. (Takeuchi and Akira, 2010; Tang et al., 2012). L'activation du système immunitaire inné entraîne également l'initiation du système immunitaire adaptatif **(Figure 23)** (Porcelli, 2017).

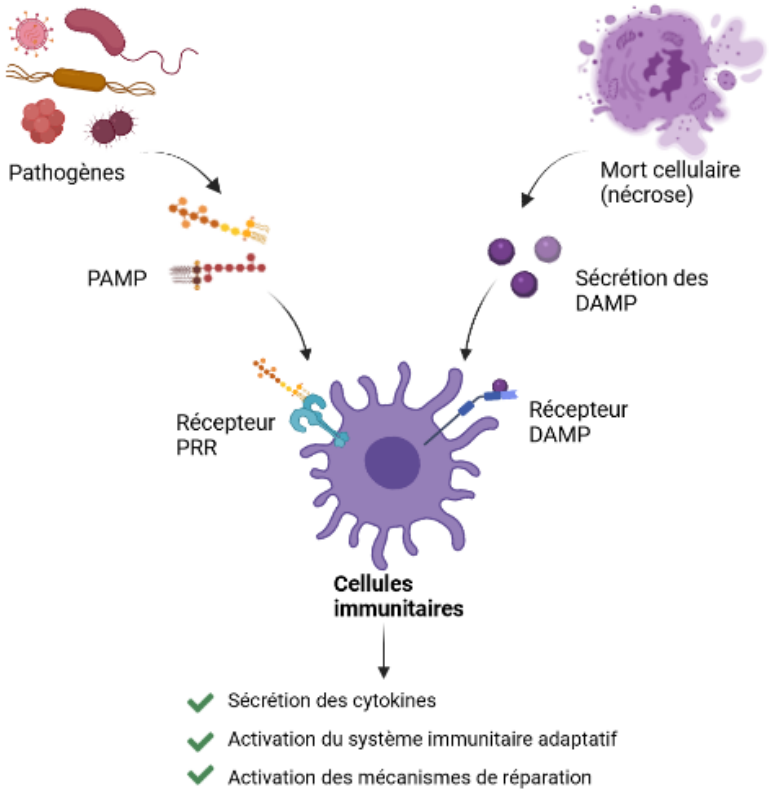


Figure 23: Réponse immunitaire induite après fixation des PAMP et des DAMP sur les récepteurs PRR exprimés à la surface de diverses cellules immunitaires (Kono and Rock, 2008).
Les cellules immunitaires expriment à leur surface des PRR (*pattern recognition receptor)* qui reconnaissent les PAMP *(pathogen-associated molecular patterns*) et les DAMP (*Danger-associated molecular patterns*), induisant l'activation du système immunitaire inné.

2.1.2. Le système immunitaire adaptatif

Le système immunitaire adaptatif intervient en complément du système immunitaire inné. C'est une réponse immunitaire plus longue qui se met en place au bout de 4 à 7 jours suivant l'infection, et qui est spécifique du pathogène. Deux types de cellules sont impliqués, les lymphocytes B et T. Les lymphocytes B participent à la réponse immunitaire humorale produisant des anticorps dirigés spécifiquement contre les antigènes du pathogène. Les lymphocytes T sont impliqués dans la réponse immunitaire adaptative dite cellulaire. Ils se différencient en lymphocytes T cytotoxiques qui lysent les cellules infectées, et en lymphocytes

T auxiliaires capables d'amplifier les réactions d'élimination du pathogène et de sécréter des cytokines inflammatoires participant à la régulation de l'ensemble du système immunitaire.

2.2. Activation de l'inflammation

2.2.1. Les PAMP et DAMP comme activateurs de l'inflammation

PAMP

Les PAMP sont des molécules issues des pathogènes, en d'autres termes, ce sont des composants des micro-organismes qui favorisent les signaux associés à l'immunité innée (Janeway and Medzhitov, 2002). Les principaux PAMP sont les acides nucléiques microbiens, les lipoprotéines, les glycoprotéines de surface et les composants membranaires (peptidoglycanes, lipopolysaccharide, etc) (Rock et al., 2011). Ils sont reconnus par les récepteurs PRR, principalement par les récepteurs TLR (*toll like receptor*) (Creagh and O'Neill, 2006; Janeway and Medzhitov, 2002; Takeuchi and Akira, 2010).

DAMP

Les DAMP sont des molécules endogènes de danger qui sont libérées par les cellules endommagées ou mortes et qui activent le système immunitaire inné en interagissant avec les PRR (Roh and Sohn, 2018). Suite à l'interaction entre les DAMP et leurs récepteurs (par exemple, les TLR), l'activation des protéines kinases MAPK et du NF-κB s'ensuit, ce qui induit et amplifie la réponse inflammatoire **(Figure 24)** (Tang et al., 2012).

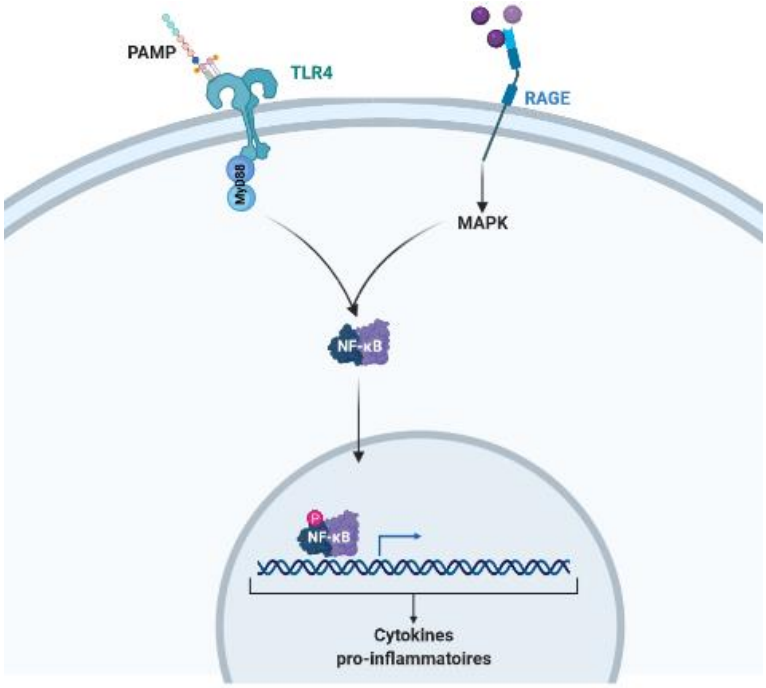


Figure 24: Voies de signalisation impliquées dans l'inflammation induite par les DAMP.
DAMP, Danger-associated molecular patterns; RAGE, Receptor for Advanced Glycation End products; TLR, Toll Like Recepto ; MyD88, Myeloid differentiation 88; NF-κB ; nuclear factor-kappa B; MAPK, mitogen-activated protein kinase kinase.

2.2.2. Récepteurs et corécepteurs de l'inflammation

Les PAMP et les DAMP sont reconnus par différents récepteurs présents sur les cellules immunitaires et induisent la production de facteurs inflammatoires. Parmi ces récepteurs, on peut citer : les récepteurs de lectine de type C, les récepteurs RAGE, ainsi que les récepteurs TLR. Ces derniers font l'objet de notre étude et sont décrits dans le paragraphe suivant.

Récepteurs TLR

Les TLR sont des protéines membranaires appartenant à une superfamille plus large de récepteurs de l'interleukine-1 (IL-1R). Cette famille de protéines est généralement formée d'une partie extracellulaire riche en résidus leucine, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine intracellulaire (ou cytoplasmique). Le domaine extracellulaire, formé de 24 à 29 molécules LRR, est directement impliqué dans la reconnaissance des PAMP et des DAMP. Dans leur région cytoplasmique, les TLR et les membres de la famille des IL-1R partagent une portion conservée d'acides aminés connue sous le nom de domaine Toll/IL-1R (TIR). Ce domaine est impliqué dans la transduction du signal intracellulaire (Akira, 2003). Ces récepteurs sont exprimés dans des cellules immunitaires innées telles que les CD et les macrophages, ainsi que dans des cellules non immunitaires telles que les cellules épithéliales (Kawasaki and Kawai, 2014).

Chez l'homme, 10 TLR fonctionnels ont été identifiés, et le TLR11 est présent sous forme de pseudogène. Des études Knock Out chez les souris, ont mis en évidence le rôle de chaque récepteur dans la reconnaissance des ligands qui se déroule non seulement au niveau de la membrane plasmique, mais aussi dans différents compartiments cellulaires (Kawai and Akira, 2010). En se basant sur leur localisation cellulaire et en fonction de la nature des ligands reconnus, les 10 TLRs recensés chez l'homme sont actuellement classés en 2 groupes:

- Le premier regroupe les TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 et TLR10. Ils sont localisés à la surface cellulaire, et reconnaissent des composants des parois bactériennes comme les lipides et les lipopolysaccharides (LPS) (Kawai and Akira, 2010).
- Le deuxième groupe est composé de TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 qui sont exprimés dans les vésicules intracellulaires et reconnaissent des acides nucléiques microbiens ou viraux (Celhar et al., 2012).

2.2.3. Reconnaissance des PAMP par les TLR

Les TLR localisés à la surface cellulaire reconnaissent principalement les composants de la membrane microbienne tels que les lipides, les lipoprotéines et les protéines. Le TLR4 reconnaît les LPS bactériens. Le TLR2 ainsi que le TLR1 ou le TLR6 reconnaissent une grande variété de PAMP, notamment les lipoprotéines, les peptidoglycanes, les acides lipotechoïques, le zymosan et le mannane (Kawai and Akira, 2010). Le TLR5 reconnaît la flagelline bactérienne (Akira et al., 2006). Le TLR10 humain collabore avec le TLR2 pour reconnaître les ligands de la listeria (Regan et al., 2013). Le TLR10 peut également détecter l'infection par le virus de la grippe A **(Figure 25)** (Lee et al., 2014).

Les TLR intracellulaires reconnaissent les acides nucléiques provenant des bactéries et des virus (Blasius and Beutler, 2010). Le TLR3 reconnaît l'ARN double brin (ARNdb) viral, les ARN interférents et les ARN dérivés de cellules endommagées. Le TLR7 reconnaît l'ARN simple brin des virus et l'ARN de la bactérie streptocoque B (Kawasaki and Kawai, 2014). Le TLR8 humain répond à l'ARN viral et bactérien (Guiducci et al., 2013). Le TLR9 reconnaît l'ADN bactérien et viral qui est riche en motifs d'ADN CpG non méthylé **(Figure 25)** (Coban et al., 2010).

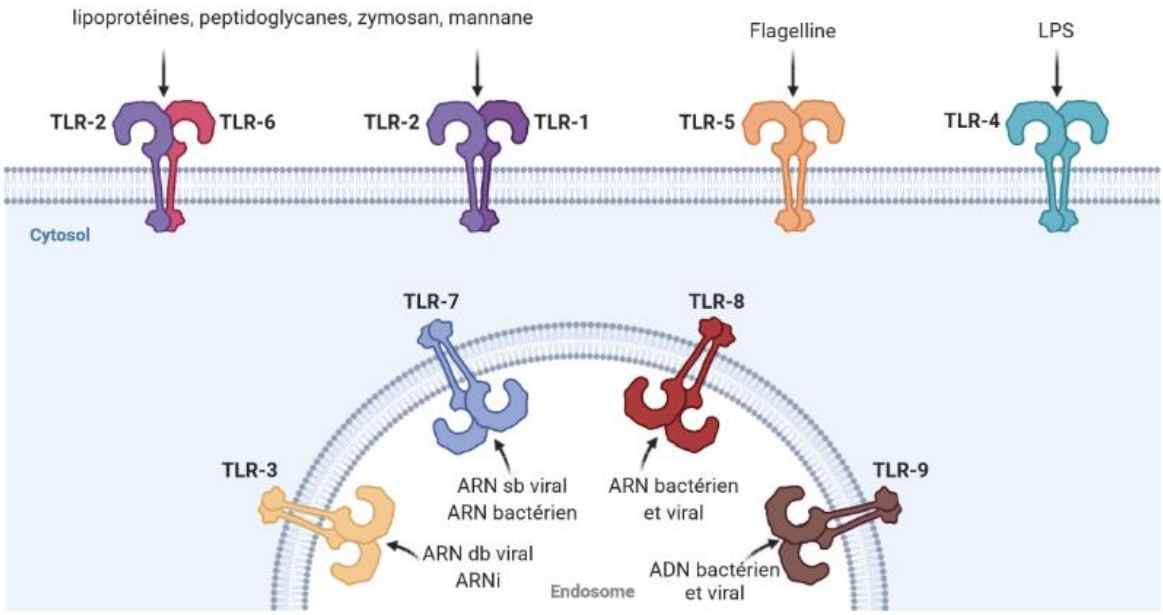


Figure 25: Classification des récepteurs de la famille des TLR en fonction de leur localisation et de la nature des ligands reconnus.

TLR, Toll Like Receptor; LPS, lipopolysaccharides ; ARN db, acide ribonucléique double brins, ARN sb; *acide ribonucléique simple brin; DNA, acide désoxyribonucléique.*

Dans notre projet de recherche nous sommes uniquement intéressés au TLR4. Sa voie de signalisation et son rôle dans l'inflammation seront détaillés dans les paragraphes suivants.

2.2.4. Signalisation du TLR4

<u>Signalisation du TLR4 dépendante de MyD88</u>

La liaison du LPS au TLR4 induit le recrutement de la protéine MyD88 sur la partie TIR du domaine intracellulaire du TLR4. MyD88 possède également un domaine TIR. L'association TIR (du TLR4) -TIR (du MyD88) induit le recrutement de la protéine IRAK formant un complexe avec MyD88 appelé Myddosome (Lu et al., 2008). Au cours de la formation du Myddosome, IRAK4 active IRAK1, qui est ensuite autophosphorylé en plusieurs sites et libéré de MyD88. L'IRAK1 s'associe à l'ubiquitine ligase TRAF6 qui, à son tour, favorise la polyubiquitination du complexe de la protéine kinase TAK1 (Pa and O'Neill, 2004). TAK1 forme un complexe avec les sous-unités de TAB1, TAB2 et TAB3, qui interagissent avec les chaînes de polyubiquitine générées par TRAF6 pour entraîner l'activation de TAK1. Ce dernier active alors deux voies différentes qui conduisent à l'activation du complexe IKK : TAK1 se lie au complexe IKK par des chaînes d'ubiquitine, ce qui lui permet de phosphoryler et d'activer la sous unité IKKβ du complexe IKK. Le complexe IKK phosphoryle la protéine

inhibitrice NF-κB, IκBα, qui subit une dégradation du protéasome, permettant à NF-κB de se transloquer dans le noyau pour induire l'expression de gènes pro-inflammatoires (Takeda and Akira, 2004). L'activation de la TAK1 entraîne également l'activation des membres de la famille MAPK tels que ERK1/2, p38 et JNK, qui interviennent dans l'activation des facteurs de transcription de la famille AP-1 ou la stabilisation de l'ARNm pour réguler les réponses inflammatoires **(Figure 26)** (Płóciennikowska et al., 2015).

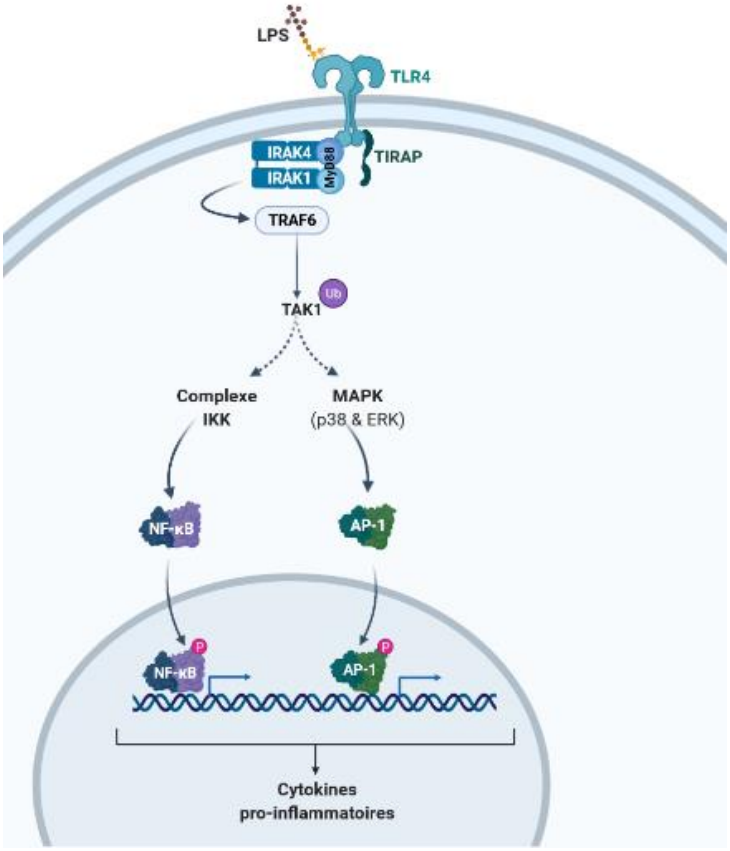


Figure 26: Signalisation de TLR4 dépendante de MyD88.
TLR4, Toll like receptor 4; MyD88, Myeloid differentiation 88 ; IRAK, IL-1RI-associated protein kinases; TAK1, transforming growth factor (TGF)-β-activated kinase; TRAF6, tumor necrosis factor receptor-associated factor 6; IKK, I Kappa B kinase; NF-κB ; nuclear factor-kappa B; MAPK, mitogen-activated protein kinase kinase; ERK, extracellular signal-regulated protein kinase; AP-1, Activator protein 1.

Signalisation du TLR4 indépendante de MyD88

La protéine TRIF (*TIR domain containing adaptator interferon beta*) possède également un domaine TIR et trois domaines de liaisons à TRAF6 ; elle peut donc induire directement son recrutement (Płóciennikowska et al., 2015). Celui-ci amène à l'activation de NF-κB de manière similaire à la voie MyD88 dépendante mais également à l'activation de la voie IRF3 (*interferon regulatory transcription factor 3*) induisant la synthèse de différents interférons. La

stimulation de la voie TLR4-MyD88 indépendante induit une réponse plus tardive que la voie MyD88 dépendante (Kawai and Akira, 2011).

2.3. PM, Stress oxydant et inflammation

Comme mentionné précédemment, la production de ROS peut augmenter rapidement après une exposition aux particules, tandis que l'inflammation se développe au fil du temps, suggérant que le stress oxydant est déclenché en premier lors d'une exposition à des doses élevées de particules. Cela a été démontré sur des cellules en culture où l'augmentation de la production de ROS a pu être détectée dans un délai de 0,5 à 1 heure après une exposition à des particules de pollution atmosphérique, alors qu'une augmentation de la sécrétion de cytokines a été détectée entre 16 et 24 heures (Becker et al., 1996).

La recherche en toxicologie chez l'homme et les modèles animaux montre que l'exposition aux PM peut entraîner une inflammation à la fois locale et systémique (Ogino et al., 2017). Les particules liées au trafic pénètrent dans les poumons et provoquent une réponse inflammatoire locale menée par les macrophages alvéolaires et les cellules épithéliales bronchiques qui produisent une variété de médiateurs qui peuvent être regroupés en cytokines chimiotactiques (IL8, CCL2 et CCL5), cytokines multifonctionnelles (IL1β, IL6 et TNF), facteurs de stimulation des colonies et facteurs de croissance (Bai and Sun, 2015; Mills et al., 1999). Au niveau cellulaire, l'apparition de cette réponse inflammatoire est déclenchée par une libération d'IL-1β et de TNF-α puisqu'ils qui ont tendance à être exprimés sous forme inactive dans les cellules au repos et peuvent être libérés sans l'activation de la machinerie transcriptionnelle (Schwarze et al., 2013). Par la suite, l'IL-1β et le TNF-α régulent l'expression de diverses cytokines et chimiokines secondaires, dont l'IL-6 et l'IL-8.

2.3.1. Les PM induisent l'inflammation *via* le stress oxydant

Lorsque les cellules exposées sont incapables de rectifier le stress oxydant par l'élimination des particules ou la production accrue d'antioxydants, une inflammation s'ensuit. Ce phénomène est principalement coordonné par l'activation des protéines kinases activées par des agents mitogènes (MAPK), la phosphorylation de l'inhibiteur de κB (IκB) et donc l'activation de NF-κB, et une expression accrue d'une multitude de médiateurs inflammatoires, dont l'interleukine (IL)-1β, IL-6 et IL-8, ainsi que la métallopeptidase-9 et la cyclooxygénase-2 (Cooper and Loxham, 2019).

2.3.2. Les PM induisent l'inflammation indépendamment du stress oxydant

La signalisation NF-κB est au cœur de la machinerie inflammatoire humaine et peut être activée par les ligands des récepteurs TLR comme les LPS (dont certains peuvent être attachés aux PM). Le LPS, en tant que composant de la paroi cellulaire des bactéries gram-négatives, peut être un contaminant présent dans les PM, qui peuvent ainsi induire la production de facteurs pro-inflammatoires et immuno-modulateurs par l'intermédiaire du TLR4 (J. Yang et al., 2020).

Les médiateurs pro-inflammatoires localisés qui résultent de l'activation de NF-κB passent ensuite dans le système circulatoire et alimentent un état inflammatoire périphérique de bas grade. L'activation du TLR4 par le LPS des PM peut représenter une autre voie potentielle par laquelle les $PM_{2.5}$ interviennent dans l'inflammation systémique (Kampfrath et al., 2011).

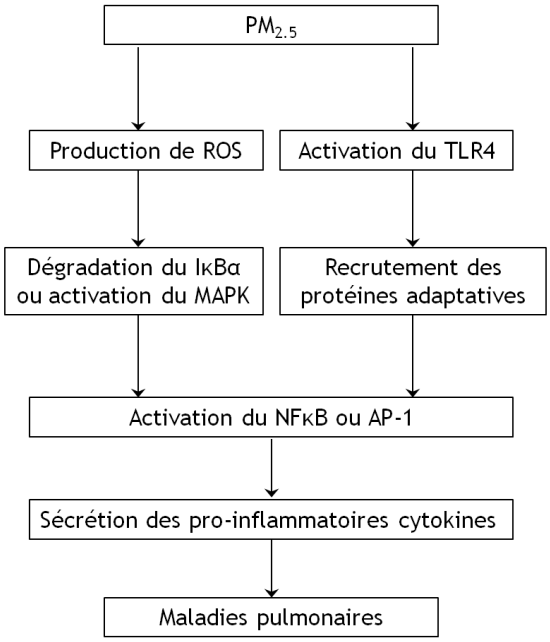


Figure 27: Les PM induisent l'inflammation dépendamment ou indépendamment du stress oxydant.
PM, particulate matter; ROS, reactive oxygen species; IκBα, IkappaB kinase-alpha; NF-κB ; nuclear factor-kappa B; AP-1, activator protein; MAPK, mitogen-activated protein kinase kinase.

2.4. VE et inflammation

Comme indiqué dans la partie précédente, tous les types de cellules pulmonaires, c'est-à-dire les cellules épithéliales alvéolaires, les macrophages, les cellules endothéliales vasculaires et les neutrophiles, en plus de jouer un rôle crucial dans les lésions et l'inflammation pulmonaires, sont capables de sécréter des VE. Les VE présentes dans les poumons peuvent

agir à la fois comme amies ou comme ennemies selon les signaux reçus par les différentes cellules pulmonaires : elles peuvent soit entretenir l'homéostasie en facilitant la communication entre les macrophages alvéolaires et les cellules épithéliales pulmonaires, soit transmettre des signaux pro-inflammatoires qui contribuent au développement des lésions responsables de l'initiation des pathologies pulmonaires (Lanyu and Feilong, 2019).

Les VE peuvent transporter le TNF-α provoquant une réponse inflammatoire. Elles peuvent également stimuler la production de TNF-α, d'IL-6 et d'IL-8 par les cellules pulmonaires, ce qui augmente encore l'inflammation. Les VE sécrétées par les cellules épithéliales pulmonaires contiennent des enzymes de métabolisation (γ-glutamyl transpeptidase) pouvant transformer le leucotriène C4 dérivé des cellules myéloïdes en leucotriène D4 jouant un rôle important dans induction de l'inflammation (Lukic et al., 2016; Nagano et al., 2019). De plus, les VE dérivés des plaquettes induisent l'inflammation par un mécanisme médié par le récepteur de l'IL-1. En outre, les VE peuvent activer le TLR4, ce qui déclenche l'expression des gènes pro-inflammatoires (Withrow, 2016).

Les VE peuvent aussi encapsuler des miARN qui jouent un rôle important dans le déclenchement du processus inflammatoire. Les miR-155, le miR-126, le miR-21, le miR-27, le miR-24 et le miR-221 transportés par les VE pulmonaires sont capable d'augmenter la sécrétion des cytokines et de renforcer la situation inflammatoire. L'inhibition de ces miARN supprime l'inflammation des voies respiratoires. De plus, la diminution de l'expression du miR-133a transporté par les VE entraîne une augmentation de l'expression du RhoA, ce qui se traduit par une augmentation de la contraction des voies aériennes et de l'hyperréactivité (Nagano et al., 2019).

3. Activation métabolique des HAP

3.1. Biotransformation et de l'activation métabolique des xénobiotiques

Les xénobiotiques ont été définis comme des substances chimiques exogènes présentes mais non produites dans l'organisme, et qui sont extrinsèques au métabolisme normal de cet organisme (Schwab, 2011). La plupart des xénobiotiques organiques subissent un processus de métabolisation (phase I, phase II et élimination) qui les rend en général moins toxiques, plus polaires et facilement excrétables (Patterson et al., 2010).

Souvent, les xénobiotiques lipophiles sont d'abord fonctionalisés par les enzymes de phase I pour les rendre plus polaires et fournir des sites pour les réactions de conjugaison, qui se produisent en phase II (Yagishita et al., 2016). Les enzymes de phase II sont donc des enzymes de conjugaison des xénobiotiques ou de leurs métabolites. Les métabolites résultant de la phase II sont davantage polaires et sont donc facilement éliminés (Croom, 2012). Certaines réactions de biotransformation conduisent à la formation de métabolites plus toxiques que la molécule initiale. Ce phénomène est appelé activation métabolique (Macherey and Dansette, 2015). Même si ces réactions se produisent dans la quasi-totalité des organes, nous décrirons prioritairement la métabolisation pulmonaire des xénobiotiques.

3.2. Processus de bioactivation des HAP

Au niveau pulmonaire, divers composés, que se soient des métaux ou des composés organiques come les N- ou O-HAP, peuvent exercer directement leurs effets cytotoxiques. Les HAP, à l'image du Benzo[a]pyrène, sont des procancérogènes qui nécessitent une activation métabolique par des enzymes pour acquérir des propriétés électrophiles et exercer leurs effets toxiques. Il existe plusieurs voies de métabolisation des HAP, dont la plus importante implique la famille des cytochromes P450 (CYP) qui catalyse l'oxydation des HAP lors de la phase de fonctionnalisation (phase I du processus de detoxification). Cette phase fait intervenir les CYP1A1 et CYP1B1, qui permettent l'introduction d'un groupement polaire en catalysant des réactions d'oxydation, de réduction ou d'hydrolyse. Les métabolites primaires, époxydes, sont ensuite hydrolysés par l'époxyde hydrolase microsomale (EHm), conduisant à la formation de dihydrodiols qui subissent une nouvelle époxydation par les CYP. Les intermédiaires résultant de la phase I peuvent être directement éliminés mais, dans la plupart des cas, ces métabolites extrêmement réactifs sont capables de former des adduits à l'ADN **(Figure 28)**. Ensuite, la phase II, dite phase de conjugaison, peut prendre place avec les glutathion S-transférases (GST), l'UDP-glucuronyl transférase (UGT) et la Sulfotransférase (SULT) qui catalysent l'introduction d'un groupement hydrophile endogène sur les metabolites issus de la phase I afin de faciliter leur excretion.

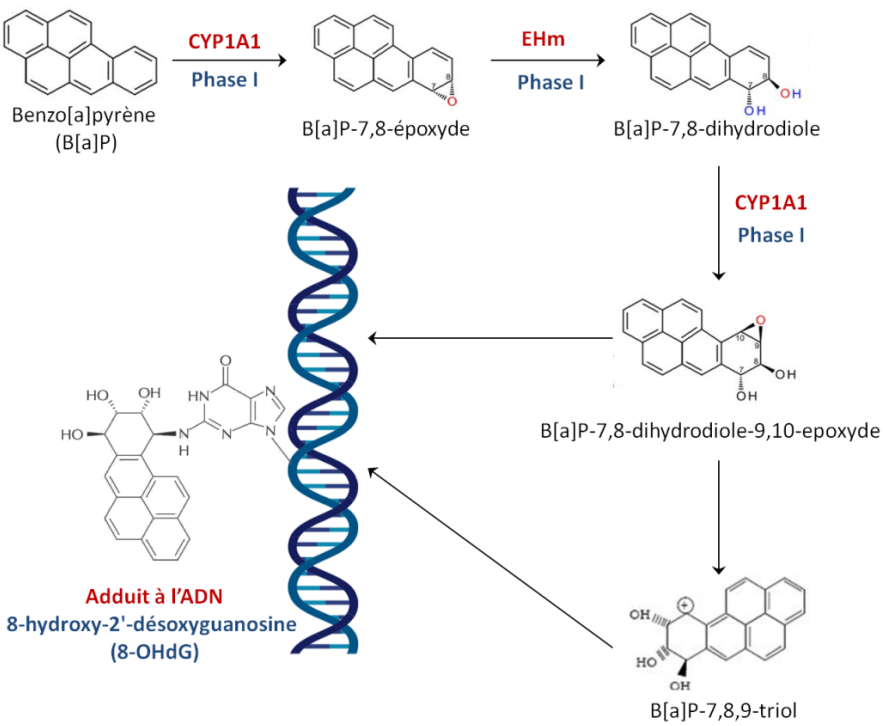


Figure 28: Bioactivation des HAP.
CYP1A1, cytochrome P450 1A1 ; EHM, Epoxyde hydrolase microsomale

3.3. Activation métabolique induite par les PM

Des études ont souligné le rôle important des CYP dans la métabolisation des HAP (Arlt et al., 2012; Joubert et al., 2012). Dergham et al. ont montré que les $PM_{2.5-0.3}$ (surtout les HAP) ont pu induire l'expression génique des enzymes métabolisant les xénobiotiques, notamment les CYP1A1 et CYP1B1, dans un modèle de cellules BEAS-2B mises en culture. Selon cette étude, l'induction de l'expression génique de ces enzymes est directement liée à leur contenu en HAP (Dergham et al., 2012). Outre le CYP1, Billet et al. ont rapporté que les COV et les HAP déposés sur les particules induisent la transcription des cytochromes *CYP2E1* et *CYP2F1* et de la *GST* (Billet et al., 2007). En plus, des enzymes de la phase II responsables de la clairance des HAP, comme l'UGT et la GSTM1, sont exprimées après exposition aux PM (Saengtienchai et al., 2014).

3.4. AhR, activation métabolique et cancérogénèse

3.4.1. Rôle de l'AhR dans l'activation métabolique des HAP des PM

Les HAP cancérogènes adsorbés à la surface des PM, tels que le BaP, sont des ligands de l'AhR (Nebert et al., 2004). L'activation de l'AhR a divers effets en aval, notamment la

formation d'adduits à l'ADN par activation métabolique dépendante du CYP1A/1B1, la tumorigenèse, l'inflammation, la prolifération cellulaire et la perte d'adhérence entre les cellules (Tsay et al., 2013). En raison de son niveau d'expression élevé dans les cellules épithéliales bronchiques humaines, l'action de l'AhR a de nombreuses conséquences physiologiques dans les poumons, comme ses effets sur la prolifération et la différenciation des cellules, l'expression des cytokines, la production de mucines et le métabolisme des xénobiotiques (Chiba et al., 2011). Matsumoto et al. ont notamment montré que les particules urbaines induisaient un cancer du poumon dans les souris exprimant l'AhR normal, mais pas chez celles exprimant l'AhR muté, ce qui suggère que l'AhR joue un rôle mécanistique dans le déclenchement du cancer pulmonaire par les PM, et par le biais de l'induction du CYP1A1 (Matsumoto et al., 2007). La compréhension du rôle de l'AhR dans ce processus pourrait conduire à l'identification de nouveaux biomarqueurs pour le diagnostic/pronostic précoce et de nouvelles cibles pour la thérapie.

3.4.2. Signalisation de l'AhR

En absence de ligand, l'AhR inactif localisé au niveau du cytoplasme est complexé aux protéines chaperonnes Hsp90-XAP2 et aux protéines co-chaperonnes p23 et pp60src. Les ligands de l'AhR sont généralement lipophiles et peuvent diffuser librement à travers la membrane plasmique des cellules. La fixation du ligand sur l'AhR induit la dissociation des protéines p23, XAP2/AIP/ARA9 et pp60src de l'AhR au niveau du cytoplasme et provoque un changement de conformation. Ce changement entraîne l'exposition du signal de localisation nucléaire présent dans la région N-terminale du récepteur et favorise la translocation du complexe protéique vers le noyau. Au niveau nucléaire, le récepteur s'hétérodimérise avec son co-partenaire nucléaire, l'ARNT (Larigot, 2018). Cette hétérodimerisation masque la séquence d'exportation nucléaire de l'AhR et permet la formation d'un facteur de transcription fonctionnel, capable de reconnaître des séquences consensus 5'-TNGCGTG-3 appelées «*Xenobiotic Responsive Element*» (XRE) localisées dans les promoteurs des gènes cibles **(Figure 29)** (Schmidt and Bradfield, 1996). L'expression de plusieurs gènes codant pour des enzymes du métabolisme des xénobiotiques telles que le cytochrome CYP1A1 est alors induite.

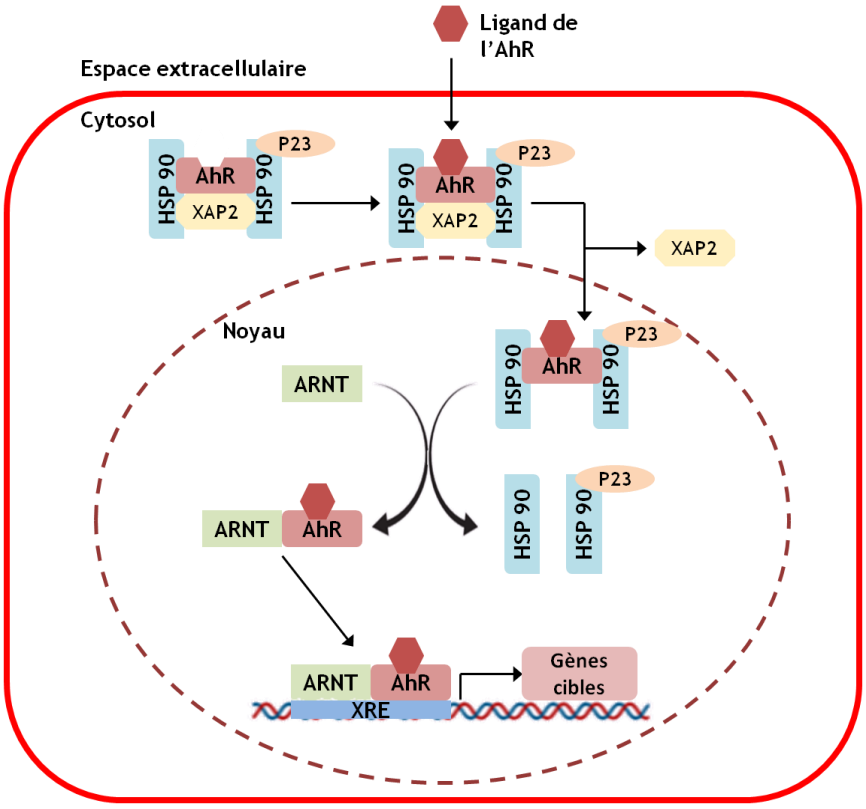


Figure 29: Voie de signalisation de l'AhR.
Les protéines chaperonne HSP 90 (*heat shock proteins 90*) et XAP2 (*HBV X-associated protein 2*) ainsi que la proteine co-chaperonne P23 se trouvent liés à l'AhR (*aryl hydrocarbon receptor*) inactive dans le cytosol. Après liaison de son ligand, l'AhR migre dans le noyau et s'hétérodimérise avec son partenaire ARNT (*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*). Ce complexe ARNT-AhR se lie à XRE (*xenobiotic responsive element*) dans les promoteurs des gènes cibles et il active leur transcription.

3.5. Activation métabolique et sécrétion des VE

L'impact de l'activation métabolique des HAP sur la production de VE est l'objet de nombreuses études récentes. Van meteren et ces collaborateurs ont mis en évidence le rôle de trois HAP [BaP, le dibenzo(a,h)anthracène (DBA) et le pyrène (PYR)] sur la production de VE dérivés des hépatocytes exposées. Le traitement des hépatocytes primaires de rat et WIF-B9 par ces trois HAP augmente la libération de VE, surtout des exosomes, parallèlement à la modification de l'expression des marqueurs protéiques de ces exosomes et à l'induction de l'apoptose. En outre, des études *in vivo* ont montré que les HAP peuvent également entraîner une augmentation des taux de VE dans le plasma. Selon cette équipe, la libération de VE suite à l'exposition aux HAP implique l'activation de l'AhR et l'expression génique des enzymes de l'activation métabolique comme les CYP1 (van Meteren et al., 2019). Une autre étude réalisée par Le Goff et al., a également souligné le rôle de l'activation métabolique induite par l'AhR dans la production des VE en utilisant une approche *in vitro* (lignée de cellules endothéliales humaines, HMEC-1) et une approche *in vivo* (échantillons d'urine de rats exposés aux HAP).

Leurs résultats montrent que l'exposition aux HAP augmente *in vitro* la production de VE par les cellules endothéliales et *in vivo* la libération de VE dans l'urine, et que cette exposition aux HAP, plus particulièrement au BaP, peut influencer la composition des exosomes produits par les cellules endothéliales. En outre, cette étude à confirmé que seuls les HAP, ayant une forte affinité pour l'AhR, ont pu augmenter la sécrétion des VE par les cellules endothéliales HMEC-1, et que l'inhibition de ce récepteur par l'α-naphtoflavone ou le CH223191, antagonistes de l'AhR et inhibiteurs de l'expression des CYP, a significativement diminué la sécrétion des VE par ce type de cellules (Le Goff et al., 2019).

4. Effet des PM sur les VE

Bien que le nombre de publications examinant l'effet des PM sur les VE soit encore limité, il est de plus en plus évident que l'exposition aux particules est étroitement associée à une augmentation de la libération de VE. Néanmoins, il est difficile de faire une comparaison entre les études, car certaines ont été réalisées *in vitro*, d'autres chez l'homme avec évaluation de l'exposition par contrôle de l'air respiré (Bollati et al., 2014; Rodosthenous et al., 201 5).

Des études récentes montrent que l'exposition *in vivo* et *in vitro* des poumons aux PM influence, non seulement la composition des VE, mais aussi l'absorption des VE par l'épithélium pulmonaire (Haggadone and Peters-Golden, 2018). Ces changements générés par la présence de substances toxiques peuvent entraîner des effets pro-inflammatoires, favorisant ainsi l'inflammation pulmonaire et les réponses immunitaires. L'équilibre entre homéostasie et inflammation est conditionné par l'origine des VE pulmonaires, qui peuvent provenir de cellules saines ou inflammatoires. En effet, les VE provenant de cellules stressées peuvent être un signal crucial dans le déclenchement de la réponse immunitaire, entraînant le développement de maladies pulmonaires inflammatoires telles que la BPCO ou l'asthme (Lee et al., 2018). Il est important de noter que les VE des voies respiratoires peuvent maintenir l'inflammation dans les poumons, mais peuvent également pénétrer dans la circulation sanguine et transporter un ensemble de molécules pro-inflammatoires vers des cellules receveuses des organes éloignés (Wahlund et al., 2017). De plus, comme le nombre et le profil (miARN, protéines en particulier) des VE libérés dans les voies respiratoires et dans la circulation sanguine varient en fonction du statut physiopathologique et inflammatoire, les VE peuvent être considérées comme de nouveaux biomarqueurs de diverses maladies inflammatoires des poumons (Kadota et al., 2017; Kubo, 2018).

4.1. Effets des PM sur la sécrétion des VE

4.1.1. Études humaines

Les données des études humaines proviennent uniquement des personnes exposées aux PM, dont le niveau d'exposition a été caractérisé soit individuellement (capteurs), soit collectivement (évaluation de l'exposition aux particules sur la base des données des stations de surveillance). Ces études confirment que l'exposition aux PM pourrait induire une augmentation de la libération des VE, en particulier à partir des cellules endothéliales. Par exemple, Pope et al. ont montré qu'une exposition aux $PM_{2.5}$ entraine une augmentation de la sécrétion des MV endothéliales (EMP) associée à un profil sanguin pro-inflammatoire, potentiellement impliqué dans l'augmentation du risque et de la gravité des maladies cardiovasculaires (Pope et al., 2016). Ces résultats ont été confirmés par Bonzini et al. qui ont mis en évidence que l'exposition des personnes obeses aux PM contribue à l'augmentation de la sécrétion des EMP (Bonzini et al., 2017). En outre, des études épidémiologiques suggèrent une association entre les maladies cardiovasculaires et la sécrétion des VE suite à l'exposition aux PM. Emmerechts et ses collègues ont suggéré que l'exposition d'un groupe de 223 personnes à des $PM_{2.5}$ et PM_{10} déclenche la sécrétion dans le sang de MP ayant un profil potentiellement procoagulant, qui pourrait contribuer au risque prothrombotique, et par conséquent, à des MCV (Emmerechts et al., 2012).

4.1.2. Etudes *in vitro*

Récemment, Martin et al. ont montré que la dose et la durée d'exposition ont un impact sur la production des VE par les cellules mononucléaires exposées aux $PM_{2.5}$. Après 6h d'exposition, aucune augmentation n'est observée alors qu'elle devient significative après 24h et s'accentue encore après 48 h. L'augmentation de la dose induit également des augmentations significatives de la libération des VE (Martin et al., 2019a). En même temps, Stassen et al. ont montré que la production des VE est induite quel que soit le type de PM ($PM_{2.5}$ ou PM_{10}) mais le mécanisme semble différent, et pourrait impliquer des différences dans la capacité de ces PM à former des ROS (Stassen et al., 2019). Neri et al. ont signalé qu'une grande quantité de VE est sécrétée par les cellules mononucléaires et endothéliales traitées avec des PM urbaines SRM1648a, par rapport aux cellules non traitées, principalement après 1 h d'incubation avec ces particules (Neri et al., 2016). Cette équipe a également mis en évidence que ces PM ont induit une mobilisation rapide du calcium de la lumière du réticulum endoplasmique (RE) vers le cytosol, conduisant à une augmentation de la concentration du calcium intracellulaire.

L'inhibition de la phospholipase C, par son inhibiteur spécifique (U73122), dans les cellules stimulées par les PM, réduit la libération de calcium stocké dans le RE et supprime complètement la sécrétion des VE par les cellules mononucléaires et endothéliales stimulées par les PM. Ainsi, il semble que les PM induisent une libération de VE d'une manière dépendante du calcium (Neri et al., 2016)

4.2. Effets des PM sur la composition des VE

4.2.1. Etudes humaines

Plusieurs études menées chez des êtres humains ont montré que l'exposition aux PM modifie l'expression des miARN dans les VE détectées dans le plasma (Bollati et al., 2015, 2015; Pavanello et al., 2016; Rodosthenous et al., 2015). Bollati et al. ont comparé les niveaux d'expression des miARN suite à l'exposition de 55 participants aux PM_{10}. Six miARN sont différentiellement exprimés. Notamment, les miR-128 et miR-302c (impliqués dans les maladies des artères coronaires et l'insuffisance cardiaque) ont été surexprimés de 6 et 14 fois, respectivement (Bollati et al., 2015). Plus récemment, Pergoli et al. ont confirmé que l'exposition de 883 sujets aux PM_{10} induit, non seulement une augmentation importante de la sécrétion des VE provenant de différents types cellulaires, notamment les cellules épithéliales et les cellules endothéliales, mais aussi une modification de leurs composition en miARN. Quarante miARN de VE étaient exprimés de manière significativement différente chez au moins 50% des sujets. Parmi ces 40 miARN de VE, 5 miARN, impliqués dans la régulation des niveaux de fibrinogène, sont sous-exprimés en réponse à une exposition à court terme aux PM_{10}, ce qui suggère que les VE induites par les PM_{10} favorisent la coagulation sanguine et augmentent le risque de maladies cardiovasculaires *via* leur contenu en miARN (Pergoli et al., 2017). D'autre part, l'exposition répétée (6 mois -1 an) aux $PM_{2.5}$ a été associée à une surexpression des miARN (miR-126-3p, miR-19b-3p, miR-93-5p, miR-223-3p, miR-142-3p, miR-23a-3p, miR-150-5p, miR-15a-5p, miR-191-5p et let-7a-5p) dans les VE du plasma. Il a été démontré que 16 ARNm cibles sont associées à ces miARN de VE et qu'ils sont directement impliqués dans les voies liées au système cardiovasculaire telles que l'athérosclérose, l'hypertrophie cardiaque et les réponses inflammatoires (Rodosthenous et al., 2015).

Enfin, en se basant sur l'étude de Pavanello et al., la composition des PM, en particulier la fraction métallique, influence le contenu des VE en miARN (Pavanello et al., 2016). Dix-sept miARN sont surexprimés après une exposition continue de 63 sujets aux PM et aux métaux

liés aux PM dont le miR-196b est le plus associé à l'exposition aux métaux liés aux PM (Pavanello et al., 2016; Puddu et al., 2010).

4.2.2. Etudes *in vitro*

Quelques articles ont évalué l'expression des miARN contenus dans les VE sécrétées suite à une exposition aux PM en utilisant des modèles *in vitro* ou *in vivo*. Des expériences *in vitro* ont confirmé que l'expression de miR-128, impliqué dans les maladies coronariennes, augmente dans les MV libérées par les cellules alvéolaires A549 après 6 h d'exposition aux PM, de manière dose dépendante. Ces résultats suggèrent que les VE induites par les PM augmentent le risque de maladies cardiovasculaire *via* leur contenu en ARN (Bollati et al., 2015). Xu et al. ont également mis en évidence l'altération du profil en miARN des VE après exposition aux PM. D'après cette étude, 45 miARN sont exprimés de manière différentielle dans les exosomes sécrétées par les cellules BEAS-2B exposées aux PM, comparé aux cellules non exposées. Parmi ces 45 miARN, 29 sont surexprimés, tandis que 16 autres sont inhibés. Ces miARN exosomaux régulent l'expression des gènes impliqués dans des mécanismes de toxicité pulmonaire chronique induits par l'exposition aux $PM_{2.5}$, notamment la fibrose pulmonaire et le cancer (Xu et al., 2019)

4.3. Effets des VE produites après exposition aux PM

Quelques études ont évalué les effets directs des VE produites lors de l'exposition aux PM sur leurs cellules cibles. Certaines études, précédemment citées, ont montré que chez l'homme, l'exposition aux PM induit la libération d'EMP contenant des niveaux élevés de TF, ce qui entraîne une activité procoagulante (Neri et al., 2016). En outre, il a été récemment démontré que les VE provenant de macrophages exposés aux $PM_{2.5}$ induisent la production des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF-α par les cellules épithéliales pulmonaires, ce qui suggère leur rôle dans le maintien de l'inflammation induite par les PM (Martin et al., 2019a). Enfin, leur rôle dans la cancérogenèse pulmonaire, potentiellement induite par l'exposition aux PM, a récemment été discuté. L'exposition des cellules pulmonaires cancéreuses A549 aux $PM_{2.5}$ induit une forte expression de Wnt3a à la fois dans les cellules exposées elles mêmes et dans les VE produites en réponse. Ces exosomes présentant un niveau élevé de Wnt3a favorisent la prolifération des cellules A549 *in vitro* ainsi que la progression des tumeurs *in vivo* (Xu et al., 2019).

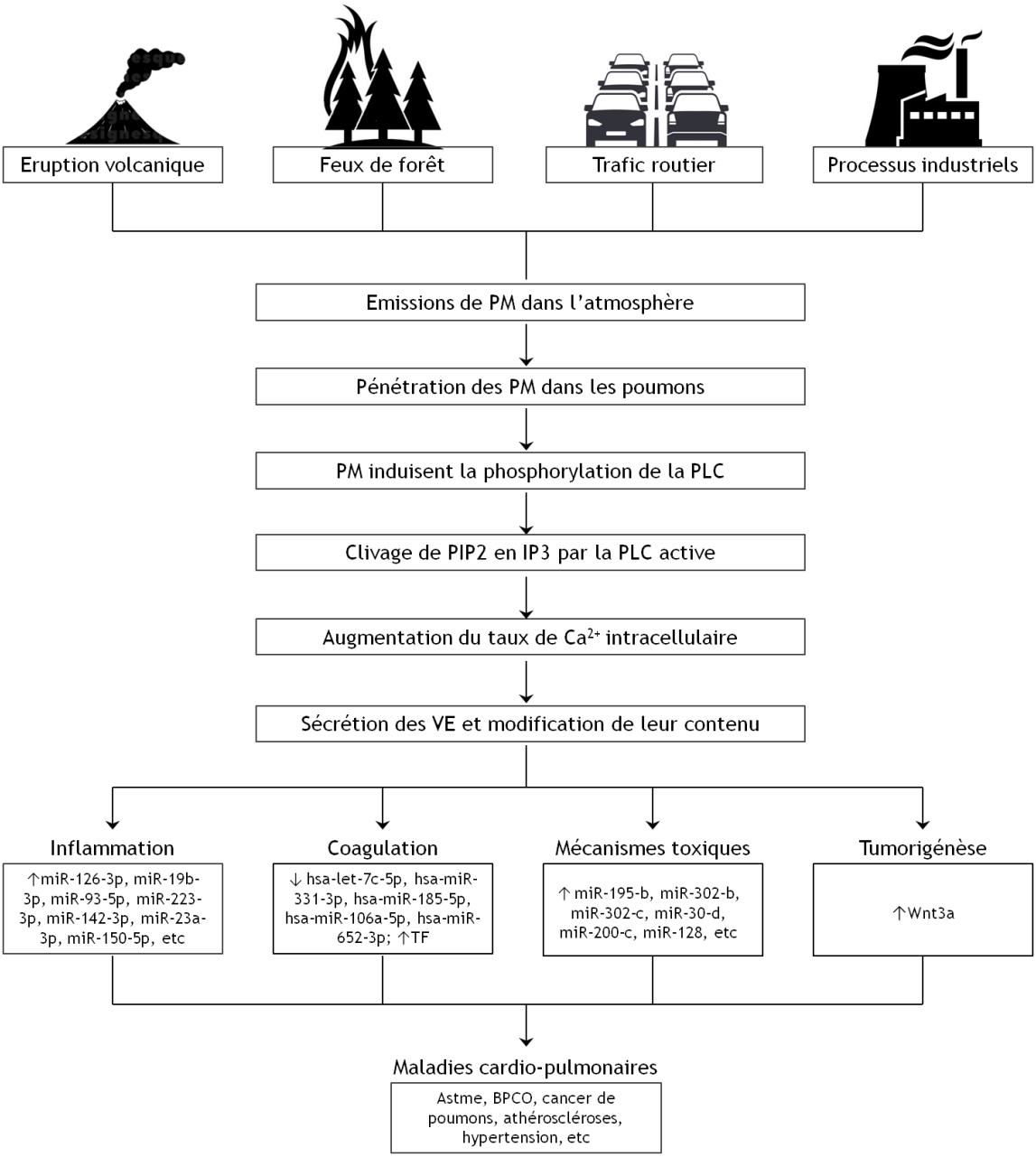


Figure 30: Représentation schématique des mécanismes identifiés impliqués dans la modification de la libération et de la composition des VE après exposition aux PM.

Après exposition aux PM, la phospholipase C (*PLC*) s'active et entraîne le clivage du phosphatidylinositol-4'-5'-biphosphate (*PIP2*) en inositol-1,3,5-triphosphate (*IP3*). Le récepteur IP3 actif fonctionne comme un canal de calcium (Ca^{2+}) et déclenche la mobilisation du Ca^{2+} de la lumière du réticulum endoplasmique vers le cytosol, ce qui entraîne une augmentation de la libération de VE. Les VE induites par les PM ont un profil différent en miARN (miR) et en protéines, affectant divers processus biologiques liés aux maladies cardio-pulmonaires. *BPCO: bronchopneumopathie chronique obstructive; TF: facteur tissulaire*

Problématique et objectifs de la thèse

Bien que les émissions de particules fines aient considérablement diminué depuis les années 1990, elles restent à un niveau trop élevé en termes de risque pour la santé publique. En novembre 2018, l'Agence Européenne pour l'Environnement (EEA) a publié son rapport intitulé "*Air Quality in Europe - 2018 report*". Il offrait alors une vision globale et précise des effets de la pollution atmosphérique sur la population européenne. Les particules fines $PM_{2.5}$ sont directement responsables de 35 800 décès prématurés en 2015, faisant de la France le troisième pays le plus polluant d'Europe (EEA, 2018). Avec 48 000 décès prématurés causés par la pollution atmosphérique en 2016 (Gulland, 2016), cela représente un total de 80% rien que pour les $PM_{2.5}$, il est urgent d'agir !

Le dépôt de $PM_{2.5}$ dans le poumon et leur invasion dans les organes extrapulmonaires est l'un des principaux facteurs de mortalité prématurée et de morbidité tels que les exacerbations de l'asthme et de la BPCO, la fibrose pulmonaire idiopathique, le cancer du poumon et les maladies cardiovasculaires et cérébrales. Le principal site de dépôt des PM inhalées est l'épithélium des bronches, une couche épithéliale pseudostratifiée qui constitue une barrière de protection chimique, immunologique et mécanique contre les agressions environnementales et joue un rôle essentiel dans les effets des PM et la réponse initiale à ces dernières.

Compte tenu de leurs différentes tailles et de leurs composants chimiques, les particules atmosphériques représentent des niveaux de toxicité différents. En outre, la durée et la concentration de $PM_{2.5}$ à lesquelles nous sommes exposés entre également en jeu dans le devéloppement des pathologies respiratoires.

Les données épidémiologiques suggèrent une relation entre la pollution atmosphérique par les particules fines et l'altération de la fonction cardio-pulmonaire. Les mécanismes responsables de ces effets ne sont pas entièrement compris. Récemment, des études toxicologiques *in vitro*, *in vivo* ou même chez des êtres humains ont montré une corrélation positive entre l'exposition aux PM et l'induction de la sécrétion des vésicules extracelulaire (VE). Ainsi, les VE sécrétées sous ces conditions de stress environnementales jouent un rôle clé dans le dévéloppement et la propagation des maladies cardiopulmonaires par le biais de leur composition biologique en protéines, lipides et acides nucléiques. En revanche, aucune étude, jusqu'à présent, ne s'est focalisée sur la determination des fractions et des voies de signalisation responsables de la sécrétion des « VE pathologiques » déclenchée par les $PM_{2.5}$.

Dans ce contexte, nous pouvons dégager la problématique suivante :

- Quelles sont les fractions des $PM_{2.5}$ qui contribuent le plus à leur toxicité ?
- Quelles sont les mécanismes toxiques activés par les $PM_{2.5}$? Est-ce la voie AhR (impliquée dans l'activation métabolique), la voie TLR4 (impliquée dans les réponses inflammatoires) ou le stress oxydant ? Existe-t-il des interactions entre ces voies ?
- Enfin, quelles sont les fractions et voies de signalisation activées par les $PM_{2.5}$ qui jouent un rôle dans l'induction de la sécrétion des VE par les cellules bronchiques exposées aux $PM_{2.5}$?

Pour répondre à ces questions, notre stratégie exprimentale a consisté, dans un premier temps, à optimiser la dose d'inhibition des inhibiteurs spécifiques des voies de signalisation, et à tester plusieurs protocoles d'isolement des VE à partir de surnageants cellulaires.

Dans un deuxième temps, la toxicité des $PM_{2.5}$ et de leurs extraits organique et hydrosoluble a été étudiée après exposition des cellules épitheliales bronchiques en présence ou non des inhibiteurs. Les paramètres toxicologiques étudiés ont notamment concerné la production des ROS, la libération des cytokines pro-inflammatoires, l'expression génique de différentes enzymes de métabolisation des xénobiotiques et la sécrétion des VE (**Figure 31**).

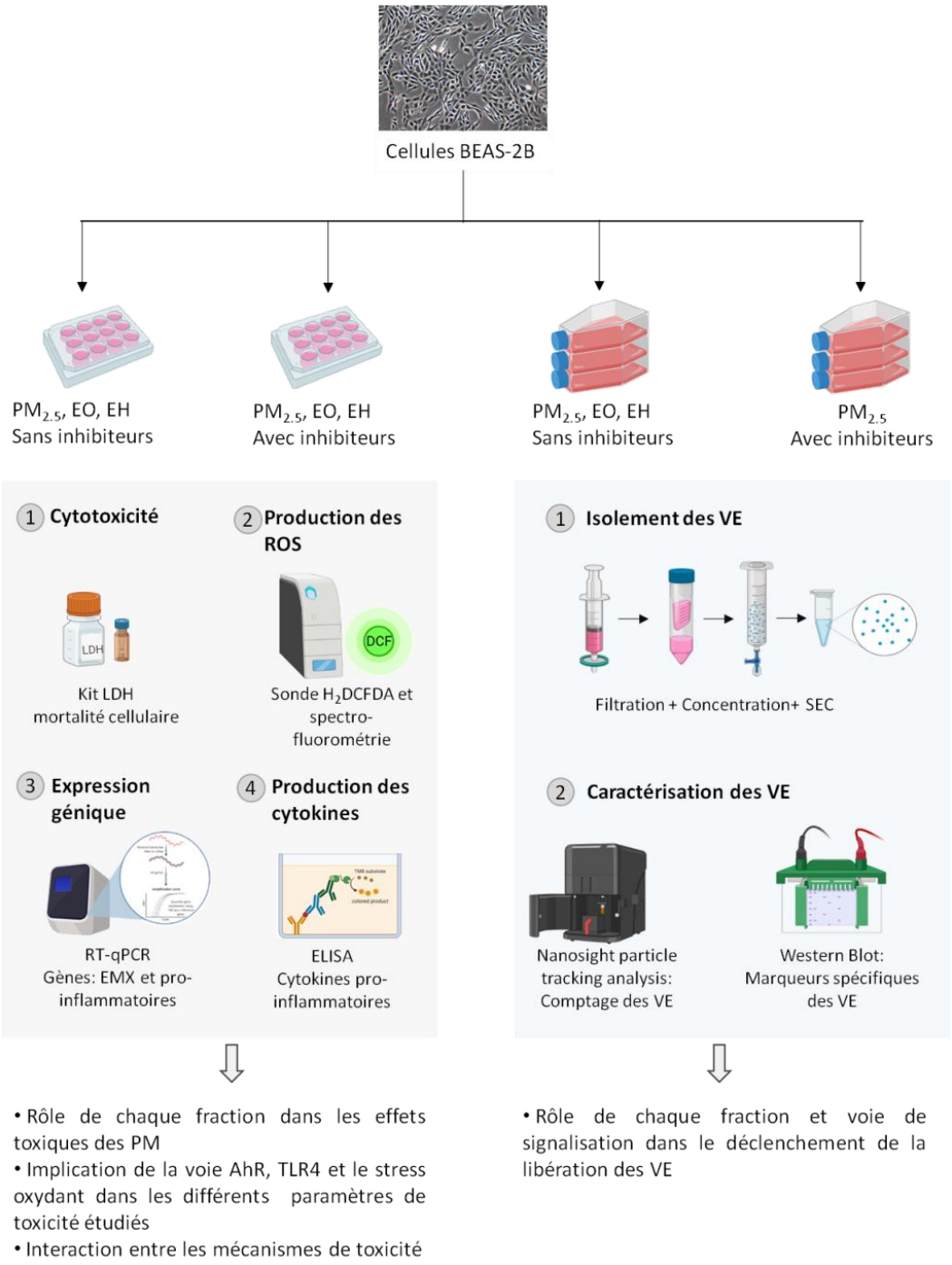


Figure 31: Stratégie expérimentale adoptée dans notre thèse.

Chapitre II

Matériels et Méthodes

Chapitre II : Matériels et méthodes

Afin d'élucider le rôle de chaque fraction de $PM_{2.5}$ dans la toxicité des $PM_{2.5}$ collectées à Dunkerque, les $PM_{2.5}$ échantillonnées ainsi que leur deux extraits (l'extrait organique -EO- et l'extrait hydrosoluble -EH), ont été utilisés dans une approche *in vitro* (lignée de cellules épithéliales bronchiques, BEAS-2B). Nous avons évalué la capacité de ces particules ainsi que celle de leurs extraits à induire le stress oxydant, l'inflammation et l'activation métabolique des composés organiques. D'autre part, nous nous sommes également intéressés à l'étude des conséquences de l'exposition aux $PM_{2.5}$ et à leurs extraits sur la sécrétion de vésicules extracellulaires produites par ce type de cellule. Afin de faciliter la lecture de la méthodologie employée, les méthodes et les résultats des tests préliminaires visant à quantifier l'efficacité d'inhibition des voies de signalisation sont présentés intégralement dans ce chapitre II.

Partie A : Evaluation de la toxicité des $PM_{2.5}$

1. Prélèvement et caractérisation des PM

Les particules fines étudiées dans notre projet proviennent d'une étude menée au laboratoire entre 2010 et 2016, financée par l'Institut National du Cancer (INCa). Ce chapitre résume les conditions de prélèvement et les caractéristiques chimiques des particules étudiées dont le détail peut être consulté dans les études publiées précédemment (Billet et al., 2018; Landkocz et al., 2017). Les $PM_{2.5}$ ont été échantillonnées pendant une période de 5 mois, de mars à juillet 2011, à l'aide d'un préleveur à haut débit de type Sierra 235, placé au centre ville de Dunkerque, un site sous influence urbaine et industrielle.

En vue de sa caractérisation chimique et de son utilisation dans l'étude toxicologique, l'EO des $PM_{2.5}$ a été obtenu par extraction Soxhlet à 40°C pendant 16 h en utilisant du dichlorométhane. Le dichlorométhane a ensuite été évaporé sous flux d'azote et l'extrait organique a été reconstitué en diméthyl sulfoxyde (DMSO) en raison de sa plus faible toxicité. Le **Tableau 4** présente la concentration des HAP présents dans les particules et également dans leurs extraits organiques.

Tableau 4: Concentrations des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) contenus dans les $PM_{2.5}$ collectées à Dunkerque.

	$PM_{2.5}$	
	(µg/g)	**(pg/m^3)**
Naphthalène (Nap)	0.7	7
Acenaphthylène (Acy)	-	-
Acenaphthène (Ace)	-	-
Fluorène (Flu)	0.1	2
Phenanthrène (Phe)	2.4	33
Anthracène (Ant)	1.5	21
Fluoranthène (Fla)	2.5	35
Pyrène (Pyr)	2.2	31
Benz[a]anthracène (BaA)	3.2	46
Chrysène (Chr)	5.0	71
Benzo[b]fluoranthène (BbF)	9.5	134
Benzo[k]fluoranthène (BkF)	5.3	74
Benzo[a]pyrène (BaP)	3.2	44
Indeno[1,2,3-c,d]pyrène (InPy)	5.3	74
Dibenz[a,h]anthracène (DahA)	2.0	28
Benzo[ghi]pérylène (BghiP)	5.2	73
HAP totaux	**548**	**669**

La fraction hydrosoluble (métaux et ions), quant à elle, a été obtenue par lixiviation des filtres de $PM_{2.5}$ dans de l'eau ultra-pure, suivie de 30 min de sonication (Landkocz et al., 2017). La concentration des éléments métalliques et ioniques majeurs est présentée dans le **Tableau 5**.

Tableau 5: Concentration des ions et des métaux principaux détectés au sein des $PM_{2.5}$ collectées à Dunkerque.

	$PM_{2.5}$	
	Total	**Hydrosoluble**
	(µg/g)	**(µg/g)**
Al	14,818	82
Ba	213	39
Cr	89	5
Cu	322	26
Fe	30,513	612
Mn	5,503	473
Ni	73	11
Pb	144	14
Sr	94	82
Ti	412	20
V	94	3
Zn	1,602	98
Ca^{2+}	14,515	14,515
K^{+}	4,523	4,523
Mg^{2+}	3,515	3,515
Na^{+}	19,824	19,824
Cl^{-}	32,121	32,121
SO_4^{2-}	32,254	32,254
NO_3^{-}	180,071	180,071
NH_4^{+}	44,220	44,220

2. Culture cellulaire

2.1. Matériel biologique

Les cellules BEAS-2B ont été utilisées pour évaluer les effets toxiques des particules atmosphériques, ainsi que de leurs différentes fractions (organique et hydrosoluble). Ce sont des cellules épithéliales isolées lors d'une autopsie à partir d'épithélium bronchique humain non cancéreux, puis transfectées par le virus hybride Ad12-SV40. Cette lignée cellulaire immortalisée possède les caractéristiques des cellules épithéliales bronchiques humaines normales **(Figure 32)**.

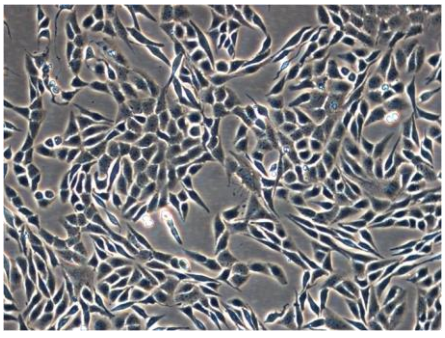


Figure 32: Observation microscopique des cellules épithéliales bronchique BEAS-2B (x200).

2.2. Culture des cellules BEAS-2B

En fonction des paramètres testés, les cellules BEAS-2B ont été cultivées dans des flacons de culture stériles (Corning® CellBIND®, Sigma-Aldrich) de 75 ou 150 cm^2, ou dans des microplaques (Corning® CellBIND®) soit à 6, soit à 96 puits, dans une atmosphère humide (95%), avec 5% de CO_2 à 37°C. Le milieu de culture défini LHC-9 (Thermo Fisher Scientific) a été utilisé pour l'entretien et l'exposition des cellules. Avant d'atteindre 80% de confluence, des repiquages successifs des cellules ont été réalisés tous les 3 jours en utilisant une solution de trypsine à 0,25% / 0,53 mM de versène contenant 0,5% (m/v) de polyvinylpyrolidone (Lonza-Trypsin-Versene®).

3. Exposition des cellules

3.1. Préparation des solutions d'exposition aux $PM_{2.5}$ et leurs extraits

Durant notre étude, la stratégie expérimentale suivie consiste à exposer les cellules à deux contrations, 3 et 15 µg/cm^2 de particules ou µg PM-éq/cm^2 d'EO ou d'EH

Quel que soit le type d'exposition ou le paramètre étudié, la démarche expérimentale pour préparer les échantillons est identique. La préparation des solutions d'exposition consiste à peser une masse adéquate de particules, en se basant sur la dose d'exposition la plus élevée (15 µg/cm^2), et la mettre en suspension dans du milieu LHC-9. Un traitement aux ultrasons pendant 10 minutes est nécessaire pour homogénéiser cette solution. Quant à la préparation des solutions d'exposition aux extraits, la même démarche a été suivi en prélevant un volume d'extraits (EO et EH) équivalent à la masse de particules.

Outre les particules et leurs extraits, les cellules BEAS-2B ont été également exposées à des témoins positifs en fonction des paramètres de toxicité étudiés **(Tableau 6)**. En outre, des cellules non exposées mises en culture dans du LHC-9 ont été utilisées comme contrôle négatif pour l'exposition aux particules et à leur EH, tandis que des cellules mise en culture avec du DMSO (<0.2%) sont considérées comme contrôle négatif pour l'exposition aux EO.

Tableau 6: Liste des composés utilisés comme contrôle positif selon le paramètre étudié.

	Controle positif	Abréviation / formule	Concentration	Fournisseur
Activation métabolique	Benzo[a]pyrène	BaP	2 µM	
Inflammation	Lipopolysaccharides	LPS	1 µg/mL	Sigma, life science
Stress oxydant	Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2	100 mM	Sigma-Aldrich

3.2. Exposition des cellules aux inhibiteurs

Afin d'identifier les voies de signalisations impliquées dans les effets toxiques des $PM_{2.5}$ d'une part, et dans la sécrétion des VE par les cellules BEAS-2B d'autre part, trois voies de signalisation ont été étudiées : (i) le stress oxydant (ii) la voie TLR4 jouant un rôle dans l'induction de la réponse inflammatoire et (iii) la voie AhR impliquée dans l'activation métabolique des HAP. À cet égard, des inhibiteurs spécifiques pour chaque voie ont été sélectionnés : (i) la N-acétylcystéine (NAC), un antioxydant, (ii) la TAK-242, un inhibiteur spécifique de la signalisation du TLR4 et (iii) le CH223191, antagoniste spécifique de l'AhR. En termes de solubilisation, la NAC est soluble dans le PBS, tandis que la TAK-242 et le CH223191 sont soluble dans le DMSO.

La première étape a consisté en l'optimisation de la dose de chaque inhibiteur à utiliser pour réduire autant que possible l'activation des voies de signalisation sans induire de cytotoxicité. La concentration retenue pour chaque inhibiteur, obtenue après optimisation, est justifié dans les paragraphes suivants. Pour chaque inhibiteur, seuls les résultats statistiquement significatifs sont présentés. A noter que dans l'étape d'optimisation des doses des inhibiteurs, les cellules ont été exposées uniquement aux deux concentrations (3 et 15 µg/cm^2) de $PM_{2.5,}$ comme étant des activateurs des voies de signalisation toxiques concernées.

3.2.1. Optimisation de l'inhibition de la voie AhR

Après ensemencement dans des plaques 6 puits, les cellules BEAS-2B ont été traitées par 10 µM de CH223191 pendant une heure, puis exposées aux deux concentrations de $PM_{2.5}$ pendant 24 et 48h. L'expression génique du CYP1A1, régulée par l'AhR, est évaluée par RT-qPCR (voir paragraphe 4.2) **(Figure 33)**.

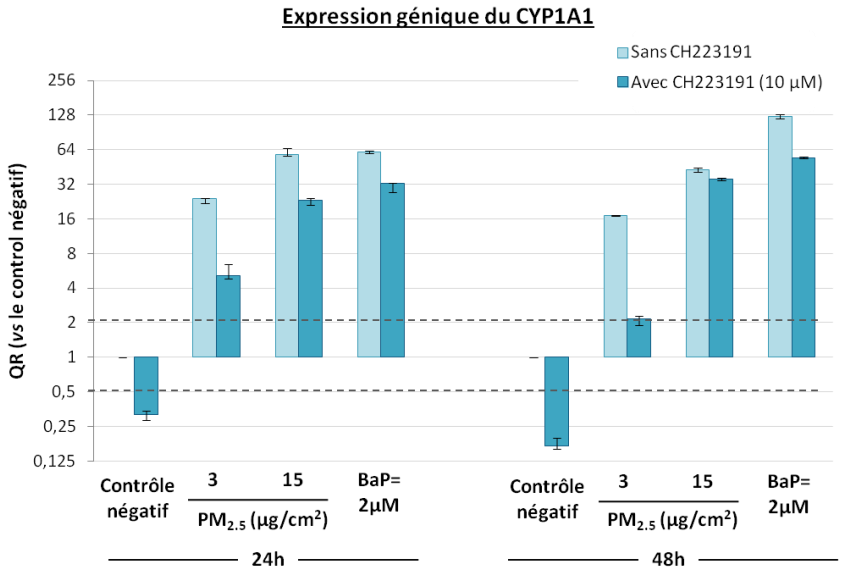


Figure 33: Quantification de l'expression génique du CYP1A1 suite au traitement des cellules par 10 µM de CH223191 et leur exposition à deux concentrations de $PM_{2.5}$ (3 et 15 µg/cm²) pendant 24 et 48h.
Les résultats de la quantification relative par $2^{-\Delta\Delta Ct}$ sont les médianes des duplicats de trois expériences indépendantes +/- espace interquartile. Significativité: surexpression : QR > 2 ou sousexpression : QR <0,5 rapportée à la valeur du contrôle non exposé, normalisé à 1 avec 18S.

Selon le résultat obtenu ci-dessus, l'expression génique du CYP1A1 atteint des niveaux statistiquement significatifs après exposition aux 2 concentrations de $PM_{2.5}$. Une comparaison entre les niveaux d'expression génique du CYP1A1 après exposition aux $PM_{2.5}$ dans les cellules non traitées et celles traitées par 10 µM du CH223191, nous a permis de constater que ce dernier réduit de plus de 50 % l'activation de la voie AhR. Suite à ces résultats, on peut conclure que le CH223191 est un inhibiteur adéquat pour la voie AhR, et que 10 µM est la concentration optimale de cet inhibiteur capable de réduire la transduction du signal intracellulaire de l'AhR activé par son ligand.

3.2.2. Optimisation de l'inhibition de la voie TLR4

Comme pour la voie AhR, les cellules BEAS-2B ont été ensemencées dans des plaques 6 puits, prétraitées par 1 µM de la TAK-242, 1h avant l'exposition à 3 et 15 µg/cm² de $PM_{2.5}$ pendant 24 et 48h. Ensuite, la production d'IL-6, cytokine pro-inflammatoire précoce dont son expression est principalement régulée par la voie TLR4, a été testée par technique ELISA (voir paragraphe 4.3) **(Figure 34)**.

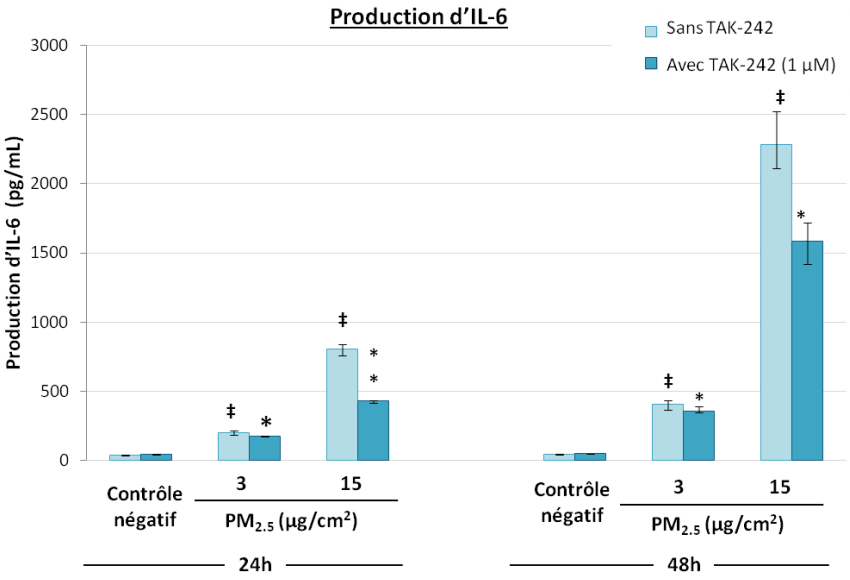


Figure 34: Quantification de la production d'IL-6 après exposition des cellules BEAS-2B à 3 et 15 µg/cm² de $PM_{2.5}$ en présence ou en absence de TAK-242 (1µM).
*Les résultats sont décrits par les médianes et les espaces interquartiles des duplicats techniques de trois expériences indépendantes. Significativité : Test U de Mann Whitney ; sans TAK-242, induction : ‡ : p<0.01 vs contrôle négatif ; Avec TAK-242, inhibition : *: p<0.05 et **: p<0.01 vs cellules exposées sans TAK-242*

Brièvement, une induction statistiquement significative de la production de l'IL-6 a été détectée après exposition des cellules aux 2 concentrations de $PM_{2.5}$ pendant les 2 temps d'exposition. Le traitement des cellules BEAS-2B par 1 µM de la TAK-242 réduit significativement la sécrétion de l'IL-6 quels que soient le temps et la dose d'exposition aux $PM_{2.5}$. En se basant sur ces résultats d'optimisation obtenus, on peut conclure que 1 µM de la TAK-242 présente un effet antagoniste sur la voie TLR4, et réduit significativement la production des cytokines induite par les $PM_{2.5}$. Cette dose a été retenue pour la suite des expérimentations.

3.2.3. Optimisation de l'inhibition du stress oxydant

Différemment aux deux voies précédemment étudiées, l'optimisation de l'inhibition du stress oxydant a été réalisée dans des plaques noires de 96 puits en quantifiant la production de ROS par la sonde H_2DCFDA (voir paragraphe 4.4), après traitement ou non des cellules par 5 et 10 mM de la NAC pendant 1h suivi de leur exposition à 3 et 15 µg/cm² de $PM_{2.5}$ pendant une durée 24 et 48h **(Figure 35)**.

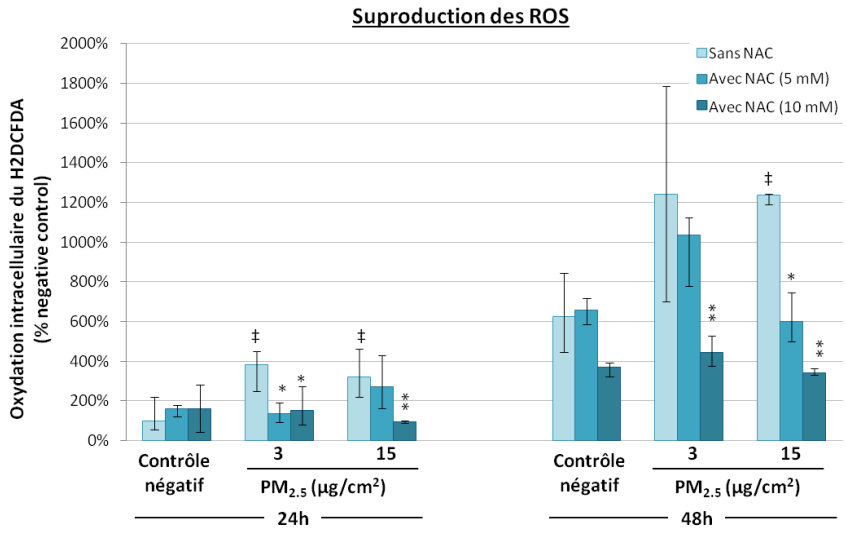


Figure 35: Quantification de la production de ROS dans les cellules BEAS-2B exposées à 3 et 15 µg/cm² de $PM_{2.5}$ en absence ou en présence de 2 concentrations de NAC (5 mM et 10 mM).
*Les résultats sont décrits par les médianes et les espaces interquartiles des duplicats techniques de trois expériences indépendantes. Significativité : Test U de Mann Whitney ; sans NAC, induction : ‡ : p<0.01 vs contrôle négatif ; Avec NAC, inhibition : *: p<0.05 et **: p<0.01 vs cellules exposées sans NAC.*

La production de ROS s'accentue significativement après exposition des cellules, surtout pendant 48h, aux 2 concentrations de $PM_{2.5}$. Au contraire, cette augmentation n'est pas observée dans les cellules traitées par 10 mM de la NAC même après exposition aux $PM_{2.5}$. En conclusion, la concentration 10 mM de la NAC a été retenue pour la suite des testes vue son efficacité de réduire la production de ROS et d'atténuer l'effet du stress oxydant.

Le **Tableau 7** résume les concentrations optimales de chacun des trois inhibiteurs retenus pour la suite de notre étude des voies de signalisation impliqué dans l'effet toxique des $PM_{2.5}$ et dans l'induction de la production des VE.

Tableau 7: Concentrations optimales choisies pour chaque inhibiteur.

	Inhibiteur spécifique	**Concentration optimale d'inhibition**	**Solvant**	**Fournisseur**
Voie AhR	CH223191	10 µM	DMSO	5 mg, Sigma-Aldrich
Voie TLR4	TAK-242	1 µM	DMSO	25 mM, EMD millipore
Stress oxydant	NAC	10 mM	PBS	5 g, Sigma

AhR, Aryl hydrocarbon receptor; TLR4, Toll like receptor; NAC, N-acétylCystéine ; DMSO, diméthylsulfoxyde ; PBS, Phosphate-buffered saline

4. Méthodes d'analyse toxicologique

4.1. Test de cytotoxicité globale

L'évaluation de la toxicité globale des deux concentrations de particules ou de leurs extraits après traitement ou non avec les inhibiteurs a été réalisée après exposition des cellules, pendant 24 et 48h, à l'aide de deux tests complémentaires : mesure de l'activité de la Lactate DésHydrogénase (LDH) et l'Alamar Blue (AB).

4.1.1. Mesure de l'activité de la LDH

Principe :

Après la mort cellulaire, la membrane plasmique est fragmentée, provoquant le relargage des enzymes intracellulaires (comme la LDH) dans le milieu de culture. L'augmentation de la concentration de la LDH dans le milieu de culture témoigne d'un dommage membranaire. Le dosage de la LDH dans le surnageant des cellules a été réalisé en utilisant le kit "Cytotoxicity detection kit - Sigma Aldrich". Le principe de cette méthode est explicité dans la **Figure 36**. Il repose sur la réduction du NAD^+ en NADPH suite à la conversion du lactate en pyruvate catalysée par la LDH. Ensuite l'enzyme diaphorase catalyse le transfert de deux atomes hydrogène du NADPH vers le tetrazolium qui sera réduit en formazan ayant la coloration rouge. L'absorbance de formazan est proportionnelle à la quantité de LDH libérée par les cellules endommagées.

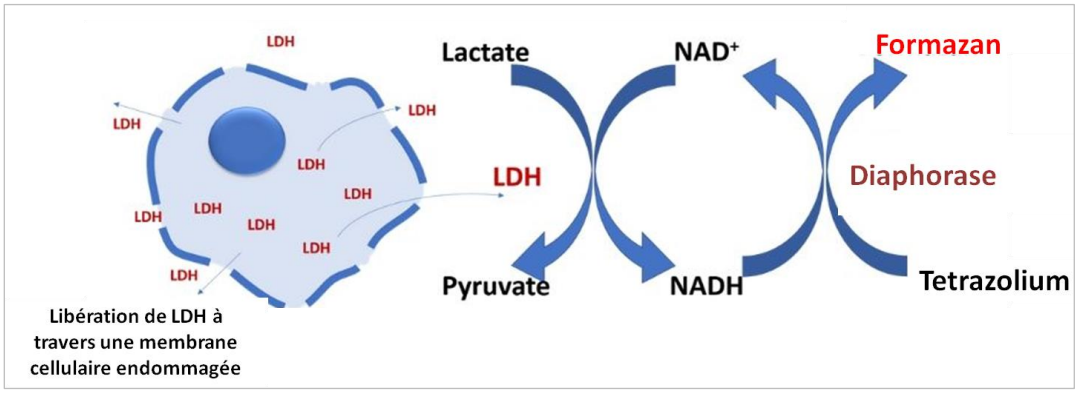


Figure 36: Principe du test de l'activité du lactate déshydrogénase (LDH).

Protocole :

Dans des microplaques 96 puits, les cellules BEAS-2B ont été prétraitées par chacun des inhibiteurs pendant 1h, puis exposées à 3 et 15 µg/cm^2 de $PM_{2.5}$ ou leurs EO et EH pendant 24 et 48h. A la fin de chaque temps d'exposition, 100 µL du surnageant des cellules exposées ont été transférés dans une autre plaque 96 puits, auxquels sont ajoutés 100 µL du réactif LDH,

suivi d'une incubation de la microplaque pendant 20 minutes à 37°C, conformémment aux instructions du kit. Ensuite, l'absorbance du formazan formé a été mesurée par spectrophotométrie à la longueur d'onde de 490 nm à des intervalles de temps de 10 min.

4.1.2. Alamar blue

Principe:

Le réactif alamar blue (Alamar Blue™ Cell viability reagent- Invitrogen) est composé du colorant résazurine hydrosoluble non toxique. La résazurine, faiblement fluorescente, est utilisée comme indicateur d'oxydoréduction qui subit un changement colorimétrique en réponse à la réduction du métabolisme cellulaire. La forme réduite, la résorufine, est rose et très fluorescente **(Figure 37)**. Ce test permet d'évaluer la viabilité des cellules exposées à des agents toxique en se basant sur la réduction de résazurine en résorufine par des enzymes intracellulaires qui est signe d'un bon fonctionnement mitochondrial.

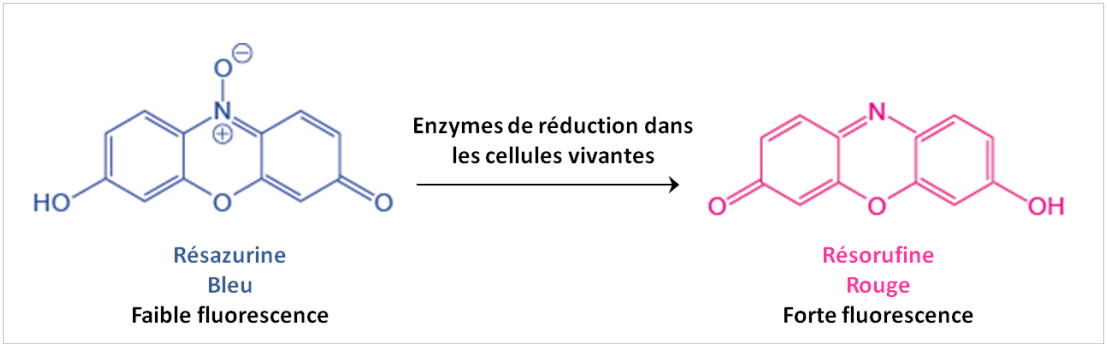


Figure 37: Principe du test de la viabilité cellulaire : Alamar Blue.

Protocole:

A la fin de chaque temps d'exposition des cellules aux différentes concentrations de PM et de leurs extraits, le réactif Alamar bleu a été ajouté sur les cellules (10% de volume de culture/puits), puis incubé pendant 2h à 37°C. Plusieurs mesures de fluorescence ont été effectuées à 570 mm à des intervalles de temps de 30 min. Cette fluorescence est proportionnelle viabilité cellulaire.

4.2. Etude de l'expression génique par RT-qPCR

Principe:

L'ARNm est d'abord rétrotranscrit en ADN complémentaire (ADNc) lors de la transcription inverse grâce à une enzyme appelée transcriptase inverse. Cet ADNc est ensuite

utilisé comme matrice d'amplification par *polymerase chain reaction* (PCR, ou réaction de polymérisation en chaîne.

Protocole :

Au cours de notre étude, nous avons évalué l'expression des gènes impliqués dans la voie de métabolisation des HAP (voie AhR) ainsi que celle des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire (voie TLR4) par RT-qPCR TaqMan®, après traitement des cellules BEAS-2B aux inhibiteurs et leurs expositions, pendant 24 et 48h, aux deux concentrations (3 et 15 µg/cm^2 ou µg PM-eq/cm^2) de $PM_{2.5}$ et de leurs extraits. Les différents gènes testés sont listés dans le **Tableau 8**.

A la fin de chaque temps d'exposition, les cellules ont été récupérées et les ARN totaux ont été extraits selon le protocole du kit "NucleoSpin®-Macherey Nagel" ou "Sure Prep™ RNA/DNA/proteins purification kit".

Après extraction, les ARN ont été dosés à l'aide d'une plaque µDrop™ afin de déposer un volume final de 10 µL équivalent à un 1 µg d'ARN dans le mélange réactionnel de 10 µL (2 µL du RT buffer, 0.8 µL du dNTP, 2 µL du random primer, 1 µL de la transcriptase inverse et 4.2 µL de H_2O RNAse free ou d'inhibiteur de la RNase), requis pour la retrotranscription en ADNc. Ensuite, un cycle de retrotranscription a été lancé (10 minutes à 25°C, 2h à 37°C et 5 minutes à 85°C). Au cours de cette expérience, le kit "High-Capacity cDNA Reverse Transcription" a été utilisé pour la retrotranscription.

Une fois synthétisé, l'ADNc est utilisé comme matrice pour la PCR. Brièvement, 1 µL/puits d'ADNc a été déposé dans des microplaques 96 puits (MicroAmp® Fast 96 well reaction plate 0.1mL-Applied biosystems) auquel un mélange réactionnel de 9 µL (5 µL du Taqman® Fast Universal PCR Mix, 0.5 µL d'amorce TaqMan spécifique du gène testé et 3,5 µL H_2O ultrapure) a été ajouté. Le thermocycleur 7500 Fast Real Time PCR system (Life technologies Thermofisher Scientific) a été utilisé pour réaliser la qPCR, selon le programme suivant : 2 minutes à 50°C, 25 minutes à 95°C et 1 minute à 60 °C. La quantification relative de l'expression du gène testé a été calculée par la méthode de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ et normalisée sur l'expression du gène de référence *18S* (Schmittgen and Livak, 2008).

Tableau 8: Référence des amorces TaqMan utilisées dans l'étude de l'expression des gènes impliqués dans la voie AhR et dans l'inflammation.

	Gène testé	**Abréviation**	**Référence**
Activation métabolique	Cytochrome P4501A1	*CYP1A1*	Hs01054797_g1
	Glutathione-S-transferase Mu1	*GSTM1*	Hs01683722_gH
	NADPH dehydrogenase quinone 1	*NQO1*	Hs01045993_g1
Inflammation	Interleukine 6	*IL-6*	Hs00985639_m1
Gène de référence		*18S*	Hs99999901_s1

4.3. Evaluation de la production des cytokines pro-inflammatoires par ELISA

Principe:

L'ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) est une technique de dosage immunologique qui permet de quantifier les concentrations des molécules présentes notamment dans le surnageant des cellules mise en culture. Elle est très utilisée notamment pour le dosage des cytokines, des facteurs de croissances, et de certaines hormones. Cette technique dispose d'une grande fiabilité et d'une grande reproductibilité car elle consiste à piéger, entre un « anticorps de capture » et un « anticorps de détection », les antigènes d'intérêt. L'anticorps de détection est dans la plupart des cas biotinylé. Cette caractéristique lui permet de se fixer à un complexe enzymatique (telle que l'Avidin-HRP). La détermination des concentrations en antigène se fait en ajoutant un chromogène à ce complexe suivi d'une lecture (généralement sur microplaques) de densité optique. Dans notre étude le kit "Biolegend ELISA MAX ™ Deluxe Set human IL-6" a été utilisé pour la quantification de la production de l'IL-6 dans le surnageant des cellules exposées.

Protocole:

La démarche expérimentale pour la quantification de la production de l'IL-6 a été réalisée sur le surnageant des cellules, selon les préconisations du fournisseur du kit, après traitement des cellules avec les 3 inhibiteurs suivi de leur exposition à 3 et 15 µg/cm^2 ou µg PM-eq/cm^2 de $PM_{2.5}$ et de leurs extraits pendant 24 et 48h. Le protocole expérimental est schématisé dans la **Figure 38**.

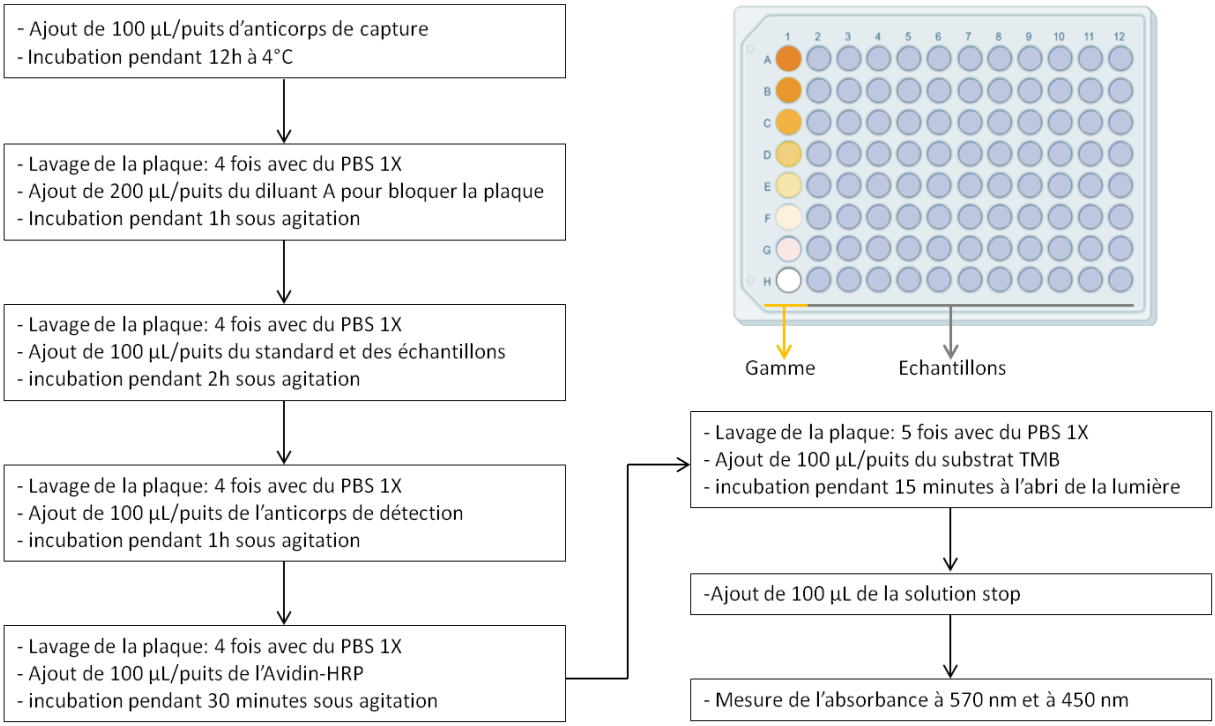


Figure 38: Protocole de la quantification de la production des cytokines selon le protocole "Biolegend ELISA MAX ™ Deluxe Set human IL-6".

4.4. Quantification de la production des espèces réactives de l'oxygène

Principe:

La sonde 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (H_2DCFDA, Across organics) a été utilisée pour la quantification de la production des ROS dans les cellules vivantes **(Figure 39)**. L'H_2DCFDA, perméable aux cellules et non fluorescent, se diffuse dans les cellules et est désacétylé par les estérases cellulaires pour former la 2',7'-dichlorodihydrofluorescéine (H_2DCF). En présence de ROS, l'H_2DCF est rapidement oxydé en 2',7'-dichlorofluorescéine (DCF), hautement fluorescent, avec des longueurs d'onde d'excitation et d'émission de 504 et 524 nm, respectivement. La fluorescence du DCF est directement proportionnelle à la production de ROS par les cellules exposées.

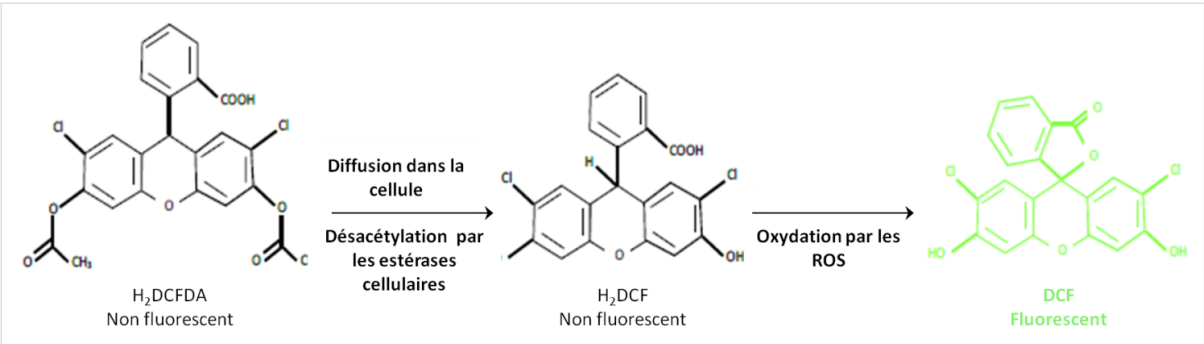


Figure 39: Principe de la quantification de la production des ROS par les cellules BEAS-2B par la sonde H_2DCFDA.

Protocole:

Pour ce protocole, les cellules BEAS-2B sont cultivées dans des plaques 96 puits noires (Corning CellBIND®), traitées par les inhibiteurs et exposées à 3 et 15 µg/cm² de $PM_{2.5}$ ou de leurs extraits pendant 24 et 48h. A la fin de chaque temps d'exposition, les cellules ont été lavées par le PBS stérile et co-incubé avec 10 µM de H_2DCFDA à 37°C pendant 40 min. La quantité de ROS produite est proportionelle à la fluorescence emise par le DCF après oxydation.

5. Analyses statistiques

Les résultats obtenus ont été décrits par leur médiane et leur espaces interquartiles [quartile 1 (25%) – quartile 3 (75%)]. A l'exception de l'expression génique, les résultats d'exposition des cellules BEAS-2B aux $PM_{2.5}$ et à leurs extraits ont été comparés à ceux du témoin négatif (cellules non exposées) en utilisant le test non paramétrique U de Mann – Whitney. Des différences significatives ont été rapportées avec des valeurs de p <0,05 (+) et p<0,01 (‡). Egalement, pour vérifier l'inhibition des voies de signalisation étudiées, ce test a été utilisé en comparant les résultats obtenus après exposition des cellules aux particules et à leurs extraits en présence des inhibiteurs avec ceux obtenus en absence des inhibiteurs. Les différences sont jugées significatives avec des valeurs de p <0,05 (*) et p<0,01(**).

La méthode de $2^{-\Delta\Delta CT}$ détaillée par Schmittgen et Livak a été utilisée pour réaliser les quantifications relatives de l'expression génique (Schmittgen and Livak, 2008). Ces résultats ont été normalisés à 1 par rapport à la valeur du 18S obtenus à partir des cellules non exposées. La mise en évidence des significativités des niveaux d'expression des gènes dans les cellules BEAS-2B a été réalisée en utilisant les seuils 0.5 et 2 pour désigner respectivement une sous expression ou une surexpression.

Partie B : Isolement et caractérisation des vésicules extracellulaires

Les vésicules extracellulaires (VE) sont des entités membranaires formées d'une bicouche lipidique et sécrétées par les cellules dans l'espace extracellulaire. Deux principaux sous-types de vésicules extracellulaires ont été décrits: les microvésicules (MV), et les exosomes, qui se différencient par leur biogenèse, leurs voies de libération, leur taille, leur contenu et leur fonction.

Comme mentionné précédemment, notre étude se concentre sur la détermination des fractions de $PM_{2.5}$ ainsi que des mécanismes cellulaires et moléculaires qui sous-tendent la sécrétion des VE par les cellules BEAS-2B après exposition. A cet égard, les cellules BEAS-2B, ont été ensemencées dans des flasques T-150 (4 flasques/condition, 3.5 millions cellules/flasque, 25 mL du milieu LHC-9/flasque), prétraitées ou non par les inhibiteurs pendant 1h, puis exposées aux deux concentrations (3 et 15 µg/cm^2 ou PM-éq/cm^2) de $PM_{2.5}$ et de leurs extraits EO et EH pendant 24 et 48h. Les VE sécrétées sous ces différentes conditions sont isolées à partir de 100 mL du surnageant/condition des cellules mises en cultures par la méthode de chromatographie d'exclusion stérique (SEC), optimisée au sein du laboratoire « Cancer Research Institute Ghent » dirigé par Pr An Hendrix. Après isolement, les VE sont caractérisées en utilisant différentes techniques telles que le nanosight particle tracking analysis (NTA) et le western blot (WB).

1. Isolement des VE par SEC

Dans le but de déterminer les voies de signalisation toxiques ainsi que les fractions de $PM_{2.5}$ impliquées dans la sécrétion VE, les surnageants des cellules mises en culture ont été récupérés et différentes méthodes d'isolement comme l'ultracentrifugation, l'ultrafiltration, la précipitation par le kit ExoQuick®, la SEC (colonne IZON qEV et colonnes préparées au laboratoire) et le gradient de densité par OptiPrep ont été testées. Après caractérisation des VE purifiées, la méthode SEC (colonnes préparées au laboratoire) nous a permis d'isoler un grand nombre ainsi que des fractions plus pures de VE. Par conséquent, cette méthode a été choisie pour effectuer l'isolement des VE dans la suite de notre étude.

Principe:

La SEC utilise des billes poreuses pour séparer les VE en fonction de leur diamètre. Cela implique la filtration d'une solution à travers une colonne de billes dont le rayon est inférieur à

celui des VE (< 200 µm). La séparation se produit lorsque des VE de tailles différentes sont incluses ou exclues des pores à l'intérieur de la matrice. En effet, les grosses VE ne pénètrent pas dans les pores, ce qui permet une élution plus rapide par rapport à leurs homologues plus petites qui diffusent dans les pores et pour lesquelles le passage à travers la colonne est retardé. Par conséquent, au cours de ce processus, les VE contenues dans notre échantillon sont éluées par ordre de taille décroissante **(Figure 40)**. La SEC permet d'éliminer les protéines solubles non liées aux exosomes afin d'obtenir des VE pures et intactes. La sepharose utilisée (Sepharose™ CL-2B, 1 litre, Cytiva) est constituée de billes dont le diamètre varie entre 60 et 200 µm.

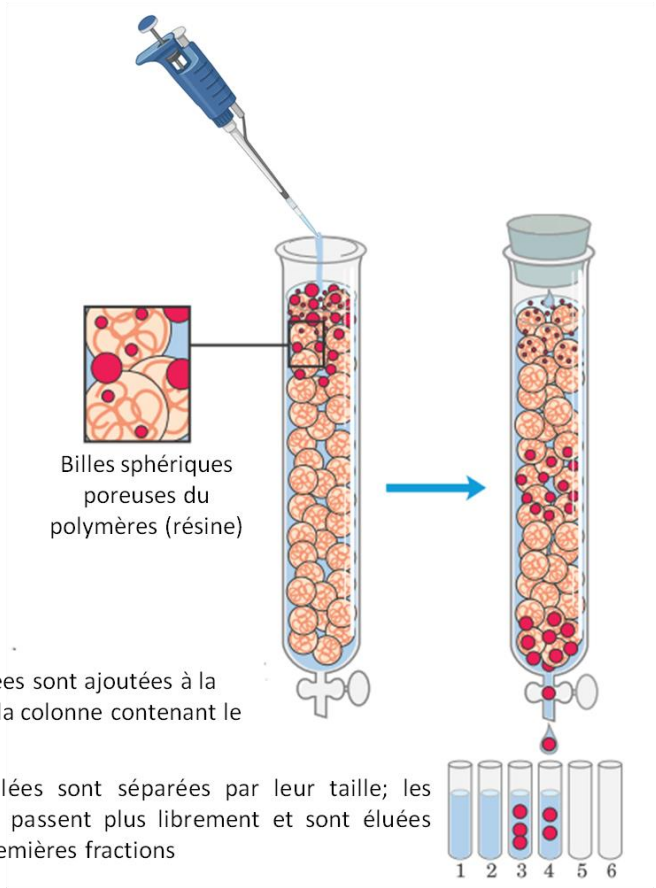


Figure 40: Principe de l'isolement des vésicules extracellulaire (VE) par la méthode de la chromatographie d'exclusion stérique (SEC).

Protocole:

Plusieurs préparations préalables sont requises pour effectuer l'isolement des VE par la technique SEC. De ce fait, ce protocole est divisé en plusieurs étapes détaillées ci-dessous :

Etape 1: Préparation des colonnes SEC

Les colonnes SEC sont préparées 24h avant l'étape d'isolement des VE en utilisant la sepharose CL-2B comme matrice pour la chromatographie. La première étape consiste à laver 3 fois, par sédimentation, la sepharose CL-2B par du PBS filtré et sans endotoxines (Sigma, life science) (ratio sepharose : PBS est de 2:1). Ensuite, un filtre en nylon 20 µm (Merck millipore) a été placé au fond d'une seringue de 10 mL (Romed Holland syringes). 10 mL de sépharose lavée ont été versés dans la seringue (1 colonne/échantillon) qui sera conservée à 4°C jusqu'au isolement.

Etape 2 : Préparation du milieu conditionné concentré (CCM)

A la fin de chaque temps d'exposition, les surnageants des cellules exposées (100 mL/condition) ont été récupérés et soumis à plusieurs étapes de concentration et de filtration pour préparer le CCM. Ces étapes sont schématisées dans la **Figure 41** :

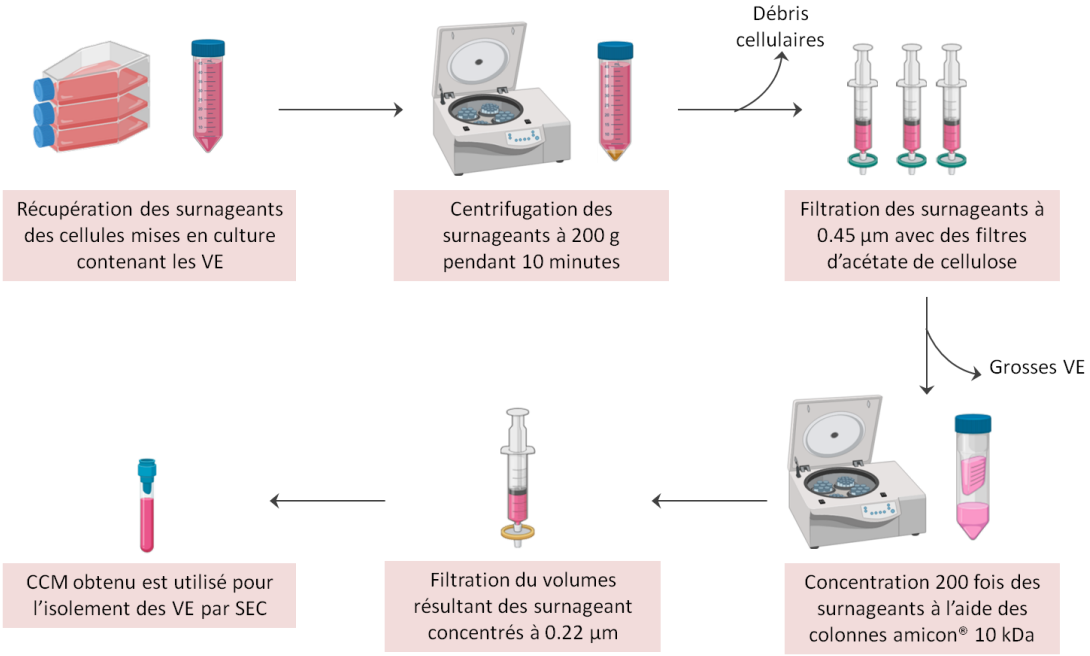


Figure 41: Protocole de préparation de milieu conditionné concentré pour l'isolement des VE par la méthode SEC.

Etape 3 : Purification des VE par SEC

Pour chaque échantillon, 2 mL du CCM sont déposés sur la surface de la colonne de sepharose préalablement préparée. Ensuite, les VE migrent tout au long de la colonne et les 3 fractions (4-6, 7-9 et 10-12) de 3 mL chacune ont été collectées dans des tubes de 5 mL. A noter que la fraction 1-3 contient uniquement du PBS, tandis que la fraction 4-6 devrait contenir les VE pures. Les fractions de 3 mL collectées ont été ensuite concentrées en utilisant des colonnes

amicon® Ulltra-2 mL et en centrifugeant plusieurs fois à 4000 g pendant 1h, jusqu'à obtenir un volume de 100 µL. Enfin, les VE isolées ont été conservées à -80°C pour les analyses ultérieures.

2. Caractérisation des VE isolées

Les échantillons de VE peuvent contenir un mélange de contaminants constitué des complexes protéiques/miARN et d'autres microparticules indésirables (lipoprotéines, etc.). Il est impératif de vérifier la pureté des échantillons de VE isolées afin de valider l'exactitude des résultats expérimentaux obtenus lors de la caractérisation des échantillons.

Dans notre étude, deux méthodes ont été utilisées pour caractériser les VE : le nanosight particle tracking analysis (NTA) pour leur quantification et le WB pour leur caractérisation protéique.

2.1. Comptage des VE par nanosight particle tracking analysis

Principe:

Le NTA est une technique de caractérisation qui combine les propriétés de la microscopie à diffusion de lumière laser et du mouvement brownien afin de déterminer la concentration et la distribution de taille des particules en suspension. Le principe de base du mouvement brownien repose sur le fait que les particules les plus légères diffusent plus rapidement, et cette vitesse est relative à la taille des particules. De ce fait, cette méthode a pu être adaptée pour mesurer la distribution de la taille des VE.

Le NTA est équipé d'un ou plusieurs lasers et d'un microscope optique connecté à une caméra numérique. Il permet de caractériser des particules de 10 à 2000 nm en solution. Dans le NTA, un faisceau laser est dirigé vers la solution et les particules sont visualisées par la lumière qu'elles diffusent lors de l'illumination laser **(Figure 42)**.

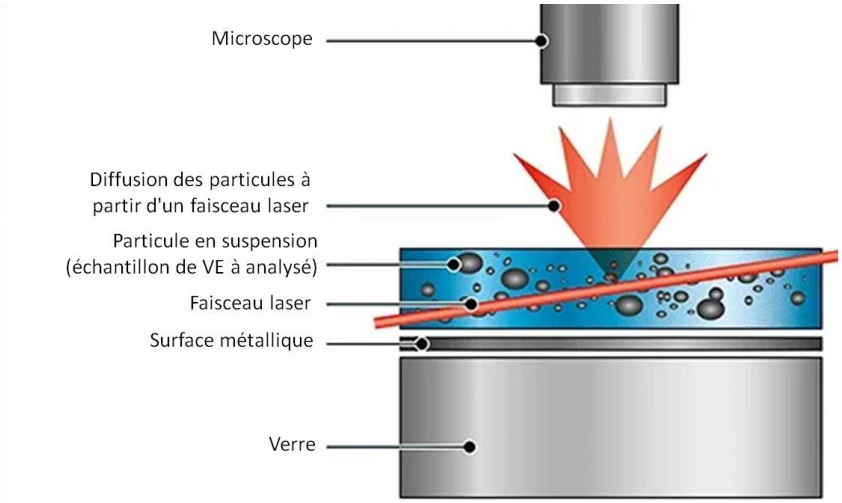


Figure 42: Principe du nanosight particle tracking analysis utilisé pour la caractérisation des VE.

Protocole:

Dans un premier temps, l'échantillon contenant les VE est injecté lentement dans la cellule (si, pendant l'injection de l'échantillon, des bulles d'air sont introduites, il est recommandé de retirer l'échantillon et de recommencer cette étape). Des vidéos de 60 secondes sont enregistrées pour chaque échantillon. Ces derniers servent à étudier la distribution en taille et le nombre des VE contenues dans l'échantillon analysé. Pendant l'analyse, il est important d'ajuster le niveau de la caméra et la mise au point pour que des particules claires et distinctes soient visibles.

La dilution de l'échantillon est un des paramètres les plus importants à contrôler lors de la mesure. En effet, une concentration très élevée ou une concentration très faible ne permet pas une mesure statistiquement correcte de l'échantillon. Une concentration de l'ordre de 10^8 /10^9 est optimale pour le comptage de VE **(Figure 43)**.



Figure 43: Images représentatives des concentrations de particules pour les mesures de taille et de concentration d'un échantillon par NTA.

2.2. Western blot

Principe:

Le western blot est réalisé en deux étapes majeures : la séparation des protéines dans un gel SDS-PAGE, puis leur transfert sur une membrane de nitrocellulose, sur laquelle la protéine d'intérêt pourra être révélée grâce à des anticorps spécifiques.

Protocole:

A la fin de chaque exposition, les cellules sont récupérées pour être utilisées comme contrôle positif pour les marqueurs vésiculaires. Dans un premier temps, les cellules sont lysées dans une solution de M-PER® (Mammalian Protein Extraction Reagent) et centrifugées pendant 15 minutes pour extraire les protéines.

Etape 1: Electrophorèse en gel polyacrylamide en condition dénaturante (SDS-PAGE)

Des échantillons de 10 µg de protéines de cellules et de VE sont préparés dans un volume final de 20 µL incluant 5 µL de laemmli (4X) (Alfa Aesar), contenant du Tris-HCl 250 mM (pH 6,8), 8% de sodium dodécyl sulfate (SDS), 40% de glycérol, 8% de bêta-mercaptoéthanol, et 0,02% de bleu de bromophénol. Dans le laemmli, les protéines sont soumises à l'action de deux composés : (i) le β mercaptoéthanol, un composé qui exerce une action dénaturante sur les protéines oligomériques en rompant les ponts disulfures, ce qui désorganise leur structure tridimensionnelle et (ii) le SDS, composé capable de venir se fixer sur la périphérie des chaines de protéines tout en leur conférant une charge négative. Outre l'ajout de laemmli, une deuxième étape de dénaturation qui consiste à chauffer le mélange protéique à 95°C pendant 5 minutes est nécessaire pour rompre les ponts disulfures et détruire la conformation tridimensionnelle des protéines.

Après dénaturation, les échantillons protéiques sont ensuite déposés dans les puits du gel polyacrylamide (Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Protein Gels 12 well comb - Bio-Rad) et soumis à un courant électrique (200 volts et 25 mA/gel) pour assurer la migration des protéines chargées négativement vers le pôle positif plus ou moins rapidement en fonction de leurs poids moléculaire.

Etape 2 : Transfert sur membrane et révélation

Une fois la migration terminée, les protéines sont ensuite transférées en 3 minutes sur une membrane de nitrocellulose afin de procéder à leur révélation, en utilisant le système Trans-

Blot Turbo Transfert System (Bio-rad). Afin d'éviter les hybridations non spécifiques des anticorps, la membrane est ensuite bloquée pendant 2h dans un tampon du PBS 1X-Tween (0.05%) et 5% de lait. Elle est ensuite incubée avec l'anticorps primaire spécifique (dilué au 1/1000 dans le tampon PBS 1X-Tween et 5% de lait) dirigé contre la protéine d'intérêt pendant la nuit à 4°C sous agitation **(Tableau 9)**. Suite à cette incubation, une série de lavage de 10 minutes dans du PBS 1X-Tween (0.05%) est réalisée avant l'incubation de la membrane pendant 1h avec l'anticorps secondaire (dilué au 1/2500 dans le tampon PBS 1X-Tween et 5% de lait) à température ambiante sous agitation **(Tableau 9)**. Après 3 lavages de 10 minutes chacun, la révélation des bandes protéiques est ensuite effectuée à l'aide du kit "ECL Substrates for High-Sensitivity Western Blot Detection" qui consiste à incuber la membrane en présence du substrat de la peroxydase. En effet, l'anticorps secondaire utilisé est conjugué à l'enzyme peroxydase du raifort (HRP) qui réagit avec le luminol, substrat de la HRP. Cette réaction émet de la lumière à 428 nm et ce signal lumineux est mesuré à l'aide du "Bio-Rad ChemiDoc MP Imaging system".

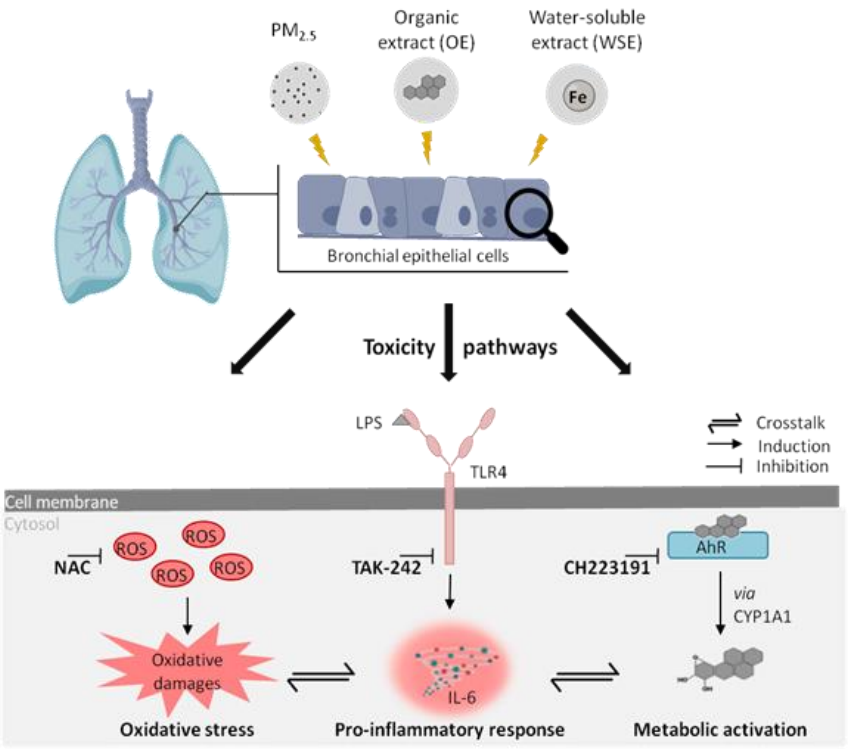
Tableau 9: Liste des marqueurs vésiculaires testés par western blot.

Protéine analysée	Localisation	Poids moléculaire (kDa)	Référence	Anticorps secondaire
Alix	intracellulaire	96	07/2019, Cell signaling technology	Anti-souris
Tsg101	intracellulaire	49	PA5-31260, Invitrogen™	Anti-lapin
CD9	membranaire	25	05/2015, Cell signaling technology	Anti-lapin
CD63	membranaire	25	NPP2-42225, Novus biologicals	Anti-souris
CD81	membranaire	25	NB100-65805, Novus a bio-techne brand	Anti-souris
Ago 2	Marqueur de contamination	85	NB100-56198, Novus a bio-techne brand	Anti-lapin

ALIX, ALG-2 interacting protein X ; Tsg101, tumor susceptibility gene 101; Ago2, Argonaute 2.

Chapitre III

Fractions et voies de signalisation impliquées dans la toxicité des $PM_{2.5}$



Chapitre III : Fractions et voies de signalisation impliquées dans la toxicité des $PM_{2.5}$

1. Introduction

Notre étude toxicologique s'est focalisée sur les voies de signalisation toxiques sous-jacents à l'action des $PM_{2.5}$ ainsi que leurs extraits organiques (EO) et hydrosolubles (EH), au niveau pulmonaire, particulièrement le stress oxydant, l'inflammation et l'activation métabolique. Afin de déchiffrer le rôle de chacun de ces mécanismes dans les effets toxiques induits par les $PM_{2.5}$, d'une part, et d'étudier les interactions entre ces mécanismes, d'autre part, nous avons utilisé des inhibiteurs spécifiques pour (i) le stress oxydant, (ii) la voie TLR4 fréquemment impliquée dans l'induction de la réponse inflammatoire et (iii) la voie AhR impliquée dans l'activation métabolique des HAP. Ainsi, la N-acétylcystéine (NAC) a été utilisée pour ses propriétés antioxydantes. La TAK-242 possède un effet inhibiteur de la transduction du signal du TLR4. Enfin, le CH223191 est un antagoniste de l'AhR. Suite à l'optimisation des doses d'inhibition (présentée dans le chapitre II), les cellules épithéliales bronchiques BEAS-2B ont été prétraitées ou non pendant 1h, séparément, par chacun de ces inhibiteurs, avant leur exposition, pendant 24 et 48h, à 3 et 15 µg/cm^2 de $PM_{2.5}$ ou µg d'équivalent-PM/cm^2 de leurs EO et EH. Ce chapitre regroupe les résultats obtenus concernant la surproduction de ROS intracellulaire, l'expression de différents gènes ainsi la production des cytokines pro-inflammatoires induits sous ces différentes conditions d'exposition.

2. Evaluation de la cytotoxicité et de la viabilité cellulaire

La cytotoxicité et la perméabilité de la membrane plasmique ont été étudiées en mesurant le niveau de LDH extracellulaire dans le surnageant des cellules BEAS-2B sous les conditions d'exposition présentées précédemment. Le pourcentage de mortalité cellulaire a été déterminé en utilisant comme témoin positif des cellules exposées à une solution de triton X-100 à 0,1% pendant 30 min et comme témoin négatif des cellules cultivées dans du milieu de culture, non traitées et non exposées. Nous avons d'abord examiné la capacité des $PM_{2.5}$, de l'EO et de l'EH à provoquer une cytotoxicité après 24 et 48h d'exposition. Comparée au témoin négatif, aucune augmentation statistiquement significative des niveaux de LDH n'a été observée dans les cellules traitées par les $PM_{2.5}$ et leurs extraits, quelles que soient la dose et la durée d'exposition. En parallèle, nous avons également évalué la cytotoxicité des cellules traitées séparément par

les 3 inhibiteurs avant l'exposition aux $PM_{2.5}$ et à leurs extraits. Par rapport aux cellules non traitées, aucune variation significative de l'intégrité membranaire n'a été observée. En effet, sous ces différentes conditions d'exposition, les niveaux de LDH étaient inférieurs à 20%, par rapport au témoin positif. De même, le taux de viabilité cellulaire, déterminé par le test Alamar Blue, n'a montré aucune variation significative du taux de viabilité comparé au témoin positif (qui correspond, dans ce cas, aux cellules non traitées et non exposées). Le pourcentage de viabilité cellulaire est compris entre 90 et 100%, comparé au témoin positif, quelque soit le type d'exposition.

3. Etude de la réponse oxydante par quantification de la production des ROS

Comme le montre la **Figure 44**, l'exposition des cellules à des concentrations croissantes (0, 3 et 15 µg/cm^2 ou µg PM-eq/cm^2) de $PM_{2.5}$ et de leurs EO et EH augmente la production de ROS d'une manière dose et temps dépendante, comparée au témoin négatif. En effet, après 24h d'exposition des cellules BEAS-2B aux 2 concentrations de $PM_{2.5}$, le pourcentage de la production de ROS augmente significativement pour atteindre une valeur d'environ 150% (p<0.01). Toutefois, après 48h d'exposition à ces mêmes conditions, la production des ROS augmente d'un facteur 2 pour atteindre 300% (p<0.05). Concernant les extraits des $PM_{2.5}$, la production des ROS augmente significativement après 24h d'exposition des cellules à 3 (122% ; p<0.05) et 15 (137% p<0.01) µg PM-eq/cm² d'EO, comparé au témoin négatif. En revanche, la production de ROS augmente significativement après 48h d'exposition à la concentration 15 µg PM-eq/cm^2 d'EO (310%, p<0.05) et EH (276%, p<0.05) pour atteindre une valeur comparable à celle des $PM_{2.5}$ (307%, p<0.05).

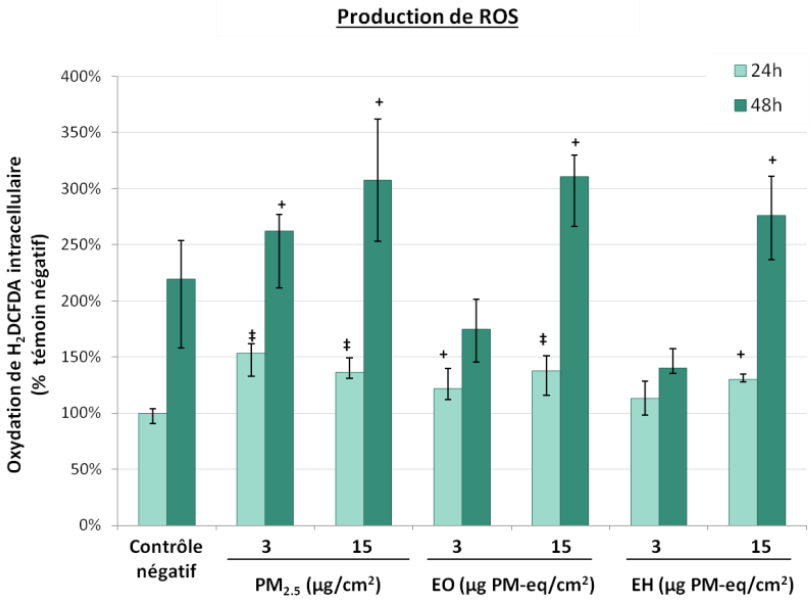


Figure 44: Pourcentage de la production des ROS après exposition aux $PM_{2.5}$ et leurs extraits.
Les cellules BEAS-2B ont été exposées à 3 et 15 µg/cm² de $PM_{2.5}$ et de leurs extraits organique (EO) et hydrosolubles (EH), pendant 24 et 48h. Les résultats ont été rapportés à ceux mesurés dans des cellules non exposées utilisées comme contrôle négatif. Les résultats sont décrits par les médianes et les espaces interquartiles de 6 réplicats de chaque condition. *Significativité : Test U de Mann-Whitney ; +: $p<0,05$; ǂ: $p<0,01$ vs contrôle négatif.*

Nous avons également examiné la production de ROS dans les cellules BEAS-2B prétraitées séparément par les 3 inhibiteurs, puis exposées aux 2 concentrations de $PM_{2.5}$ et leurs extraits. La **Figure 45** montre que le traitement des cellules par 10 µM de CH223191 provoque une diminution significative de la production de ROS, comparées aux cellules exposées sans inhibiteurs, pour atteindre des valeurs aux alentours de 100% ($p<0.01$) pour les $PM_{2.5}$ et de 60% ($p<0.01$) pour les extraits. Un profil d'inhibition similaire a été observé suite au traitement des cellules par la TAK-242. Brièvement, selon nos résultats, suite au traitement des cellules BEAS-2B par 1 µM de la TAK-242, la production de ROS diminue significativement (par rapport aux cellules exposées sans inhibiteurs) pour rejoindre des valeurs comprises entre 100 et 150% ($p<0,01$). De même, la production de ROS diminue de manière significative après traitement des cellules par 10 mM de la NAC ($p<0,01$).

Pour conclure, les $PM_{2.5}$ dans leur entièreté possèdent un pouvoir oxydant même à de faibles doses, qui se traduit par l'induction de la surproduction de ROS. Par contre, la concentration d'exposition la plus élevée des extraits de $PM_{2.5}$ déclenche significativement la surproduction de ROS dans les cellules BEAS-2B. Cette différence dans l'induction de la réponse cellulaire liée à la production de ROS confirme le rôle crucial joué par la composition complexe des particules dans leur ensemble. En ce qui concerne les voies de signalisation, les

résultats obtenus confirme le rôle de l'AhR dans la surproduction et l'accumulation intracellulaire des ROS. D'une manière inattendue, la diminution significative de la production des ROS après inhibition de la voie TLR4 met en évidence son rôle en tant que régulateur clé dans le déclenchement de ce mécanisme et peut être des mécanismes moléculaires en aval (dommages oxydatifs liés à la surproduction de ROS).

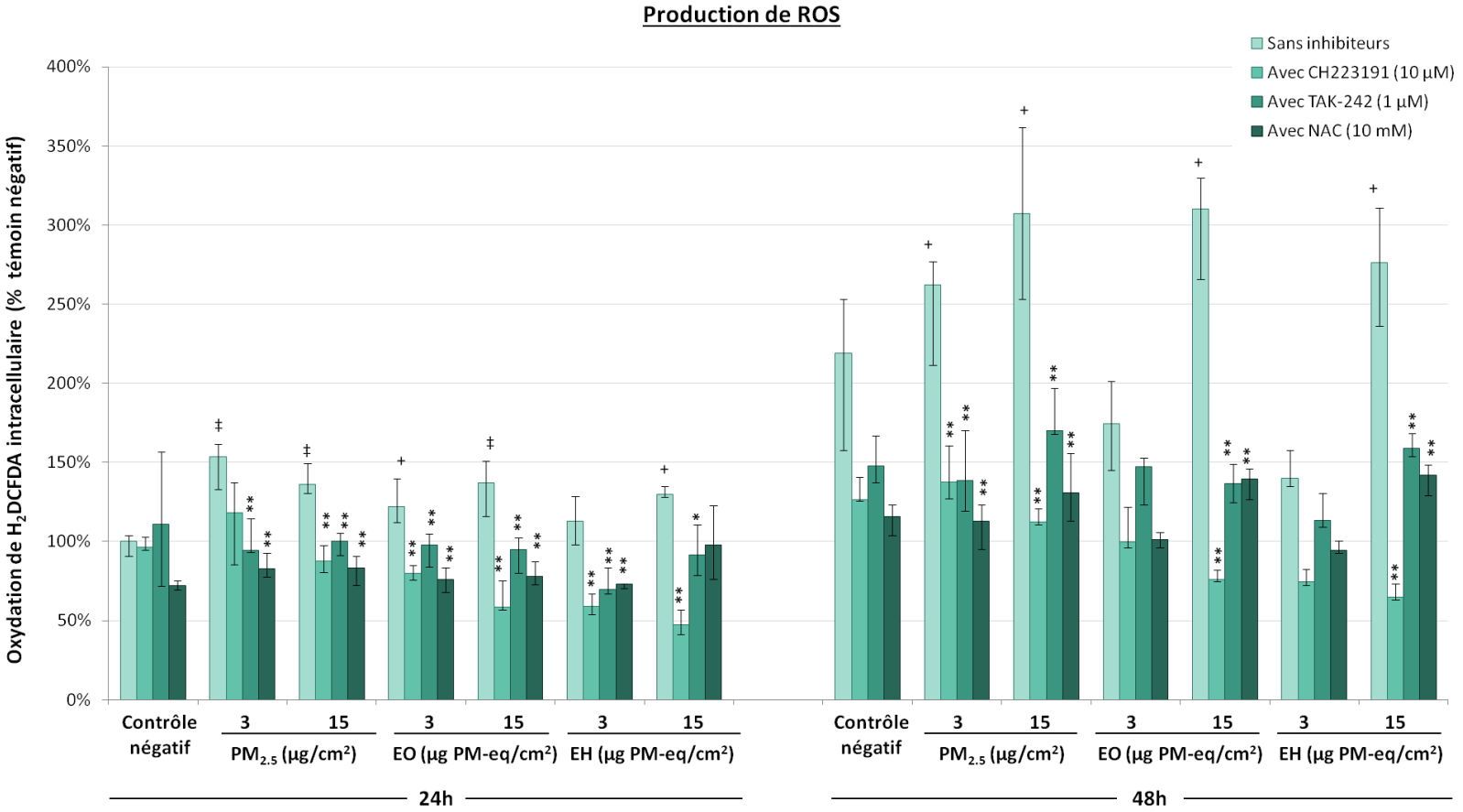


Figure 45: Etude de l'implication de la voie AhR, TLR4 et stress oxydant dans la production des ROS.

Les cellules BEAS-2B ont été prétraitées séparément ou non par les 3 inhibiteurs (CH223191, TAK-242 et NAC) puis exposées à 3 et 15 µg/cm² de $PM_{2.5}$ et de leurs extraits organique (EO) et hydrosolubles (EH), pendant 24 et 48h. Des cellules non exposées ont été utilisées comme contrôle négatif. Les résultats de fluorescence rapportés à ceux du contrôle négatif (24h) sont décrits par les médianes et les espaces interquartiles de 6 réplicats de chaque condition. *Significativité : Test U de Mann-Whitney; Sans inhibiteurs : induction significative : +: p<0,05 et ‡ : p<0,01 vs contrôle négatif / Avec inhibiteurs : réduction significative *: p<0,05 et **: p<0,01 vs cellules exposées sans inhibiteurs*

Plusieurs études *in vitro* ont montré que l'exposition chronique aux particules atmosphériques stimule la production des ROS (Deng et al., 2013b; Fang et al., 2019; Li et al., 2020; Liu et al., 2018). En raison de leur composition complexe, le rôle des constituants des PM dans le déclenchement du stress oxydant n'est toujours pas clair. Dans un premier temps, Mazuryk et ses collaborateurs ont mis en évidence le comportement réactif non seulement des particules fines, mais aussi des fractions organiques et inorganiques des particules en soulignant leur capacité à induire la production et l'accumulation des ROS dans les cellules épithéliales alvéolaires (A549) exposées (Mazuryk et al., 2020). L'implication de la voie AhR dans la production des ROS induite par les $PM_{2.5}$ *via* l'activation de la transcription des enzyme de métabolisation des xénobiotique (p. ex. les CYP) a été rapportée dans la littérature (Ren et al., 2020; Vogel et al., 2020). En revanche, la surproduction de ROS médiée par les PM peut impliquer des voies indépendantes de l'AhR, qui sont basées sur la présence de métaux et leur capacité à catalyser des réactions de Fenton (p. ex. le Fe, Cu, etc.) (Vogel et al., 2020; Weissenberg et al., 2010). Le rôle de la voie TLR4 dans la surproduction des ROS n'est pas décrit dans la littérature, il sera discuté dans la partie suivante.

4. Etude de la réponse inflammatoire

4.1. Etude de l'expression génique de l'IL-6

Les résultats de l'expression génique de l'IL-6 étudiée sous différentes conditions sont représentés dans la **Figure 46**. Les résultats sont considérés comme significativement différents de ceux obtenus dans le contrôle négatif quand les quantités relatives (QR) sont inférieures à 0,5 (sous expression) ou supérieures à 2 (surexpression) (Schmittgen and Livak, 2008).

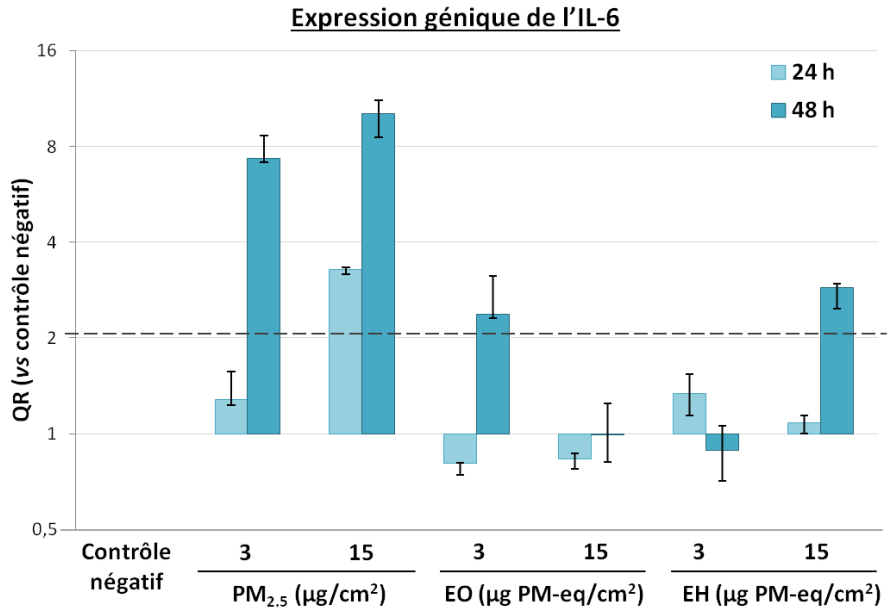


Figure 46: Quantification de l'expression génique de l'IL-6.
Les cellules BEAS-2B ont été exposées à 3 et 15 µg/cm² de $PM_{2.5}$ ou à leurs extraits organique (EO) et hydrosolubles (EH), pendant 24 et 48h. Des cellules non exposées ont été utilisées comme contrôle négatif. *Les résultats de la quantification relative par $2^{-\Delta\Delta Ct}$ sont les médianes des duplicats de trois expériences indépendantes +/- espace interquartile. Significativité : QR >2 (surexpression) ou QR <0,5 (sous expression) rapportée à la valeur du contrôle négatif non exposé normalisé à 1 avec 18S.*

Comme le montre la **Figure 46**, l'exposition des cellules BEAS-2B à la concentration 3 µg/cm² de $PM_{2.5}$ pendant 24h ne semble pas être suffisante pour montrer une variation significative de l'expression génique de l'IL6. En revanche, après 48h d'exposition, cette même dose de $PM_{2.5}$ provoque une induction significative de l'expression ce gène avec une valeur de QR égale à 7,35. Exposées à la concentration la plus forte de $PM_{2.5}$ (15 µg/cm²) pendant 24h, les cellules ont montré une induction significative de 3,3 fois de l'expression génique de l'IL-6, comparé au témoin négatif. La surexpression de ce gène s'accentue d'une manière temps-dépendante pour atteindre une valeur de QR égale à 10 après 48h d'exposition à cette dose de $PM_{2.5}$. Aucune variation significative pour *IL-6* n'a été observée après 24h d'exposition aux 2 extraits de $PM_{2.5}$. Ce gène n'est induit qu'après 48h d'exposition à 15 µg PM-eq/cm² d'EH avec une valeur de QR supérieur à 2. Bien que l'EO des $PM_{2.5}$ ne montre aucune variation significative, une tendance marquée de cet extrait à inhiber l'expression génique de l'IL-6 peut être dégagée surtout après 24h d'exposition, qui se traduit par une valeur de QR inférieur à celle du contrôle négatif. Dans l'ensemble, un effet inducteur de l'expression du gène IL-6 dépendant de la dose et du temps est bien visible pour les particules et leur EH.

L'expression génique de l'IL-6 a également été étudiée après traitement des cellules BEAS-2B par les 3 inhibiteurs séparément suivi de leur exposition aux $PM_{2.5}$ et aux EO et EH pendant 24 et 48h **(Figure 47)**.

Le traitement des cellules BEAS-2B par 10 µM du CH223191 suivi de leur exposition aux 2 concentrations de $PM_{2.5}$ ou de leurs extraits, réduit à moitié l'expression génique de l'IL-6, notamment après 48h d'exposition (comparée aux cellules exposées sans inhibiteurs). Egalement, les cellules traitées par 1 µM de la TAK-242 montrent une diminution significative de l'*IL-6* quelle que soit la dose d'exposition aux $PM_{2.5}$ et leurs extraits. Plus précisément, la TAK-242 réduit à 50% et à plus de 80%, le niveau de l'expression génique de l'IL-6, après 24h et 48h d'exposition, respectivement, comparé à celui dans les cellules exposées en absence d'inhibiteurs. Le même profil d'inhibition a été observé après traitement des cellules avec 10 mM de la NAC. Sous ces conditions, l'inhibition de l'expression génique de l'IL-6 semble être efficace et prononcée comparée aux celles obtenues dans les cellules exposées mais non traitées par les inhibiteurs. En effet, l'expression du gène IL-6 induite par les $PM_{2.5}$ et de leurs extraits diminue de 70% après 24h et de 90% après 48h d'exposition en présence de la NAC.

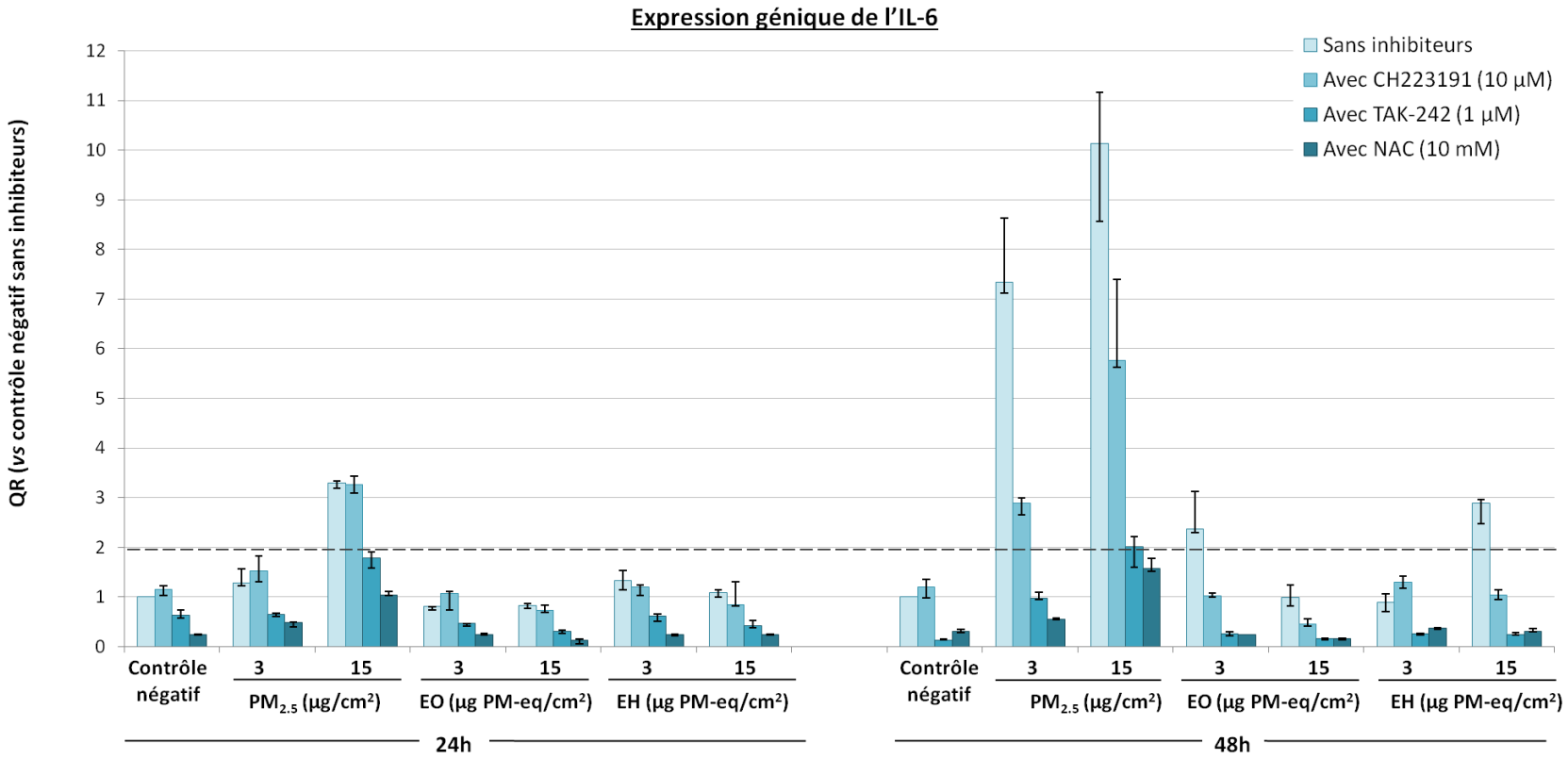


Figure 47: Quantification de l'expression génique de l'IL-6 après inhibition de la voie AhR, TLR4 et le stress oxydant.

Les cellules BEAS-2B ont été prétraitées séparément ou non par les 3 inhibiteurs (CH223191, TAK-242 et NAC) puis exposées à 3 et 15 µg/cm² de $PM_{2.5}$ et de leurs extraits organique (EO) et hydrosolubles (EH), pendant 24 et 48h. Des cellules non exposées utilisées comme contrôle négatif constituent la référence. *Les résultats de la quantification relative par $2^{-\Delta\Delta Ct}$ sont les médianes des duplicats de trois expériences indépendantes +/- espace interquartile. Significativité : QR >2 (surexpression) ou QR <0,5 (sous expression) rapportée à la valeur du contrôle négatif sans inhibiteurs normalisé à 1 avec 18S.*

Nombreuses sont les études toxicologiques *in vitro* et *in vivo* qui confirment le rôle pro-inflammatoire des particules *via* la surexpression des gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires, notamment l'IL-6 (Dergham et al., 2012; He et al., 2017a; Huang et al., 2018; Jia et al., 2021; Ryu et al., 2019). Cependant, l'effet des extraits de $PM_{2.5}$ sur l'expression génique des cytokines pro-inflammatoires n'est pas entièrement compris. Bien que plusieurs études ont montré que l'exposition des cellules aux HAP seuls est suffisante pour induire une surexpression des médiateurs pro-inflammatoires tels que l'IL-8, IL-1β ou même IL-17 et IL-22 au niveau transcriptionnel (Pei et al., 2002; Plé et al., 2015; Tamaki et al., 2004), il existe également d'autres études qui excluent la possibilité d'un rôle des EO dans les processus pro-inflammatoires (Abbas et al., 2019).

Selon la littérature, les particules atmosphériques stimulent, au niveau transcriptionnel, l'expression des gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires tout en activant diverses voies de signalisation. En s'appuyant sur les travaux de Tripathi et ses collaborateurs, le stress oxydant et la voie AhR semblent être impliqués dans la régulation de l'expression génique de l'IL-6 (Tripathi et al., 2018). D'autres voies, indépendantes du stress oxydant, aboutissent à l'activation de NF-κB, un facteur de transcription occupant un rôle déterminant dans la stimulation de la transcription de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 (Zhao et al., 2009).

Afin d'établir un lien explicatif entre l'exposition des cellules BEAS-2B aux $PM_{2.5}$ et leurs extraits et la réponse pro-inflammatoire induite, et de développer nos connaissances concernant les voies de signalisation impliquées dans la réponse pro-inflammatoire induite par les $PM_{2.5}$ et leurs extraits, l'évaluation de la production de l'IL-6 au niveau protéique est indispensable.

4.2. Quantification de la production de l'IL-6

Pour établir une relation significative entre les variations des niveaux de production de l'IL-6 et les composants des $PM_{2.5}$, les cellules BEAS-2B ont été exposées aux 2 concentrations de particules ainsi que leurs fractions organique et hydrosoluble pendant 24 et 48h. Selon les résultats représentés dans la **Figure 48**, la production de l'IL-6 augmente significativement d'une manière dose et temps-dépendante après exposition aux $PM_{2.5}$ dans leur entièreté. Par rapport au témoin négatif, la production et la libération de l'IL-6 augmentent de 3.6 fois et de 10 fois (p<0.01) après 24h d'exposition des cellules à 3 et 15 µg/cm^2 de $PM_{2.5}$, respectivement. La production de cette cytokine pro-inflammatoire s'accroit avec le temps pour atteindre une

valeur de 3400 pg/mL (p<0.01), c'est-à-dire 30 fois supérieure à celle du contrôle négatif, après 48h d'exposition à 15 µg/cm^2 de $PM_{2.5}$. En revanche, une diminution statistiquement significative (p<0,01) de la production de l'IL-6 a été constatée dans les cellules BEAS-2B après leur exposition, pendant 24 et 48h, à 3 et 15 µg PM-eq/cm^2 d'EO de $PM_{2.5}$ par rapport au contrôle négatif. Par contre, les extraits hydrosolubles induisent significativement (p<0.01) la sécrétion de l'IL-6 dans le surnageant des cellules exposées, surtout après 48h d'exposition à la concentration la plus élevée.

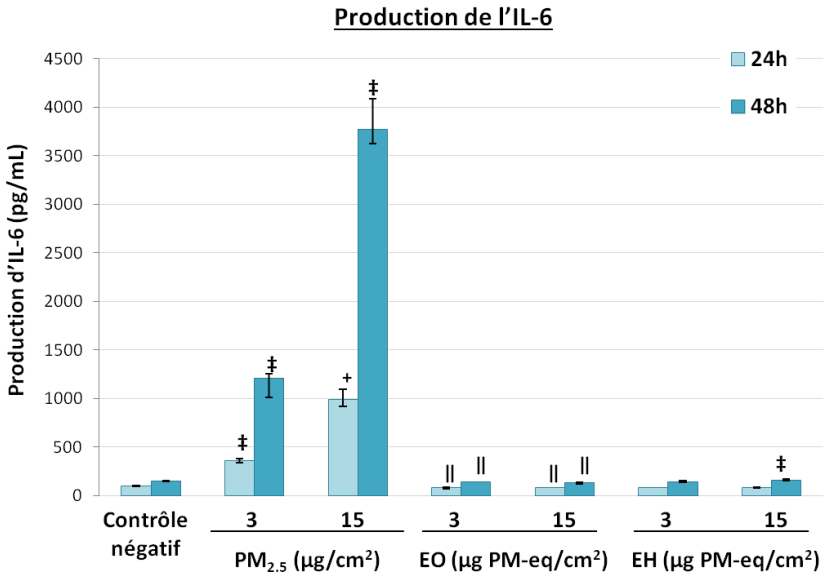


Figure 48: Quantification de la production de l'IL-6 induite par les $PM_{2.5}$ et leurs extraits.
Les cellules BEAS-2B ont été exposées à 3 et 15 µg/cm^2 de $PM_{2.5}$ et de leurs extraits organique (EO) et hydrosolubles (EH), pendant 24 et 48h. Des cellules non exposées ont été utilisées comme contrôle négatif. Les résultats sont décrits par les médianes et les espaces interquartiles de 6 réplicats de chaque condition. *Significativité : Test U de Mann-Whitney ; comparaison par rapport au témoin (cellules non exposées) ; induction significative +: p<0,05 et ‡ : p<0,01 ; réduction significative ‖ : p<0,01.*

Simultanément, les cellules ont été prétraitées séparément par les 3 inhibiteurs puis exposées aux $PM_{2.5}$ et leurs extraits, afin de déterminer la voie de signalisation la plus étroitement associée à la réponse pro-inflammatoire induite par les $PM_{2.5}$. En se basant sur les résultats présentés dans la **Figure 49**, l'inhibition de la voie AhR par le CH223191 a provoqué une diminution significative (p<0.05) de la production de l'IL-6 uniquement après exposition des cellules BEAS-2B à 15 µg/cm^2 pendant 24h, par rapport aux cellules exposées sans inhibiteurs. Cette inhibition devient plus prononcée et statistiquement significative (p<0.01) après 48h d'exposition même à la dose la plus faible de $PM_{2.5}$. Contrairement aux $PM_{2.5}$, aucune différence statistiquement significative dans la production de l'IL-6 n'a été constatée après exposition de cellules, déjà traitées au CH223191, à l'EO et à l'EH, quelles que soient la dose

et la durée d'exposition. En ce qui concerne la voie TLR4, le traitement des cellules BEAS-2B par 1 µM de TAK-242 pendant 24h réduit la production de l'IL-6 de 70% ($p<0.01$ *vs* cellules exposées au $PM_{2.5}$ sans inhibiteurs) après exposition à 15 µg/cm^2 de $PM_{2.5}$. Dans ces mêmes conditions d'inhibition, une baisse de 30% et de 43% ($p<0.01$ *vs* cellules exposées au $PM_{2.5}$ sans inhibiteurs) ont été constatée après 48h d'exposition à 3 et 15 µg/cm^2 de $PM_{2.5}$, respectivement. Concernant l'exposition aux extraits de $PM_{2.5}$, la TAK-242 réduit significativement ($p<0.05$ *vs* cellules exposées au EO sans inhibiteurs) le niveau de la production de l'IL-6 après 48h d'exposition des cellules à 15 µg PM-eq/cm^2 de l'EO. Une diminution statistiquement significative ($p<0.01$ *vs* cellules exposées au EH sans inhibiteurs) a été également détectée après exposition des cellules, déjà traitée par la TAK-242, aux 2 concentrations de EH. En plus des voies AhR et TLR4, l'effet du stress oxydant sur la production de l'IL-6 a également été étudié. La co-incubation des cellules exposées à 3 µg/cm^2 de $PM_{2.5}$ avec 10 mM de la NAC provoque une diminution de 4,8 et 12,23 fois de la production de l'IL-6 induite après 24 et 48 h, respectivement. Cependant, les cellules exposées à 15 µg/cm^2 de $PM_{2.5}$ ont montré une diminution jusqu'à 3 fois de la sécrétion de l'IL-6 après 24h et 48h d'exposition, comparées aux cellules exposées sans inhibiteurs. En parallèle, les cellules ont été traitées avec la NAC (10 mM) et exposées aux deux concentrations de EO et EH dans les mêmes conditions et une diminution significative de la production de l'IL-6 a été observée, par rapport aux cellules non traitées.

Pour conclure, non seulement les particules ont présentées un caractère pro-inflammatoire, mais aussi l'EH à des concentrations élevées dispose de ce caractère qui s'est traduit par une augmentation significative de la production de l'IL-6. Encore une fois, nous avons constaté une divergence surprenante entre les propriétés pro-inflammatoires des $PM_{2.5}$ entières et celles de ces composés organiques qui ont joué un rôle anti-inflammatoire. Nos résultats ont mis également en évidence le rôle joué par chacune des 3 voies étudiées dans l'initiation de la réponse inflammatoire induite par les $PM_{2.5}$. En s'appuyant sur les résultats de la quantification de l'expression génique et de la production de l'IL-6, on peut conclure que ces 3 voies sont impliquées dans l'induction d'un état pro-inflammatoire, et que le stress oxydant est le régulateur majeur de cette réponse.

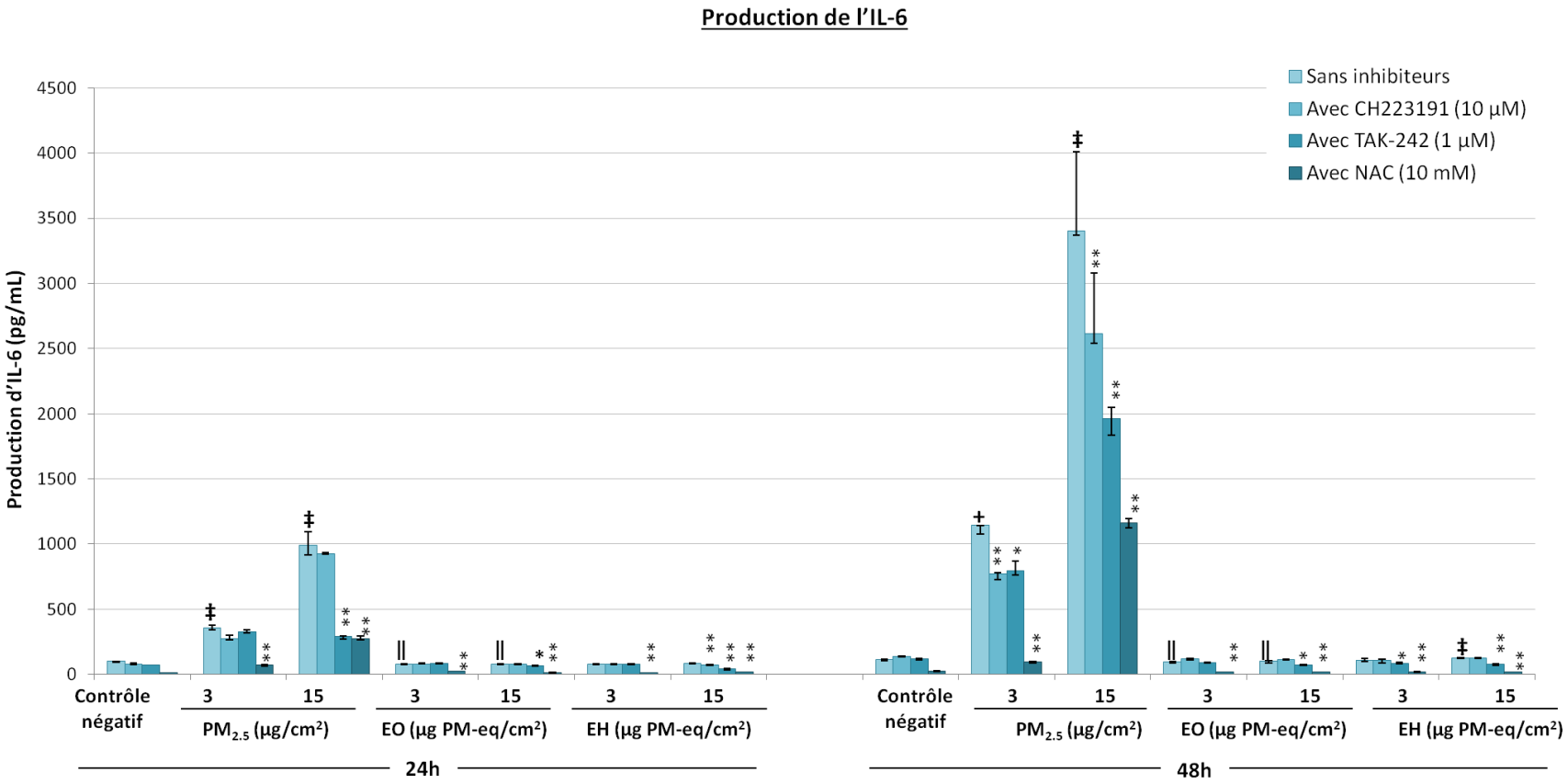


Figure 49: Quantification de la production de l'IL-6 après inhibition des 3 voies de signalisation étudiées.

Les cellules BEAS-2B ont été prétraitées séparément ou non par les 3 inhibiteurs (CH223191, TAK-242 et NAC) puis exposées à 3 et 15 µg/cm² de $PM_{2.5}$ (A) et de leurs EO et EH (B), pendant 24 et 48h. Des cellules non exposées ont été utilisées comme contrôle négatif. Les résultats sont décrits par les médianes et les espaces interquartiles de 6 réplicats de chaque condition. *Significativité : Test U de Mann-Whitney; Sans inhibiteurs : induction significative : +: p<0,05 et ‡ : p<0,01 ; diminution significative : ‖ : p<0,01 comparé au contrôle négatif non exposé/ Avec inhibiteurs : réduction significative *: p<0,05 et **: p<0,01 comparée aux cellules exposées sans inhibiteurs. PM, particulate matter ; EO, extrait organique ; EH, extrait hydrosoluble ; NAC, N-acétylcystéine ; IL-6, interleukine 6*

Nos résultats observés suite à l'exposition des cellules BEAS-2B aux $PM_{2.5}$ viennent appuyer les études toxicologiques *in vitro* publiées (Longhin et al., 2018; Roper et al., 2017; Ryu et al., 2019; Zhao et al., 2016; Zou et al., 2020). En effet, la capacité des particules à engendrer une augmentation de la sécrétion des médiateurs pro-inflammatoires, surtout l'IL-6, a été rapportée par Pang et ses collaborateurs (Pang et al., 2020). D'autre part, Abbas et al., ont récemment souligné la différences dans la réponse inflammatoire induites par les particules entière et celle induite par leurs fractions organiques (Abbas et al., 2019). Concernant les voies de signalisation, les $PM_{2.5}$ induisent une réponse inflammatoire par le biais de différents mécanismes mais le rôle du stress oxydant est le plus décrit dans la littérature (Liu et al., 2018; Ryu et al., 2019).

5. Etude de la réponse métabolique par quantification de l'expression génique des enzymes de métabolisation

L'activation métabolique dans les différentes conditions étudiées a été évaluée par la quantification de l'expression de plusieurs gènes codants pour des enzymes de métabolisation des xénobiotiques, comme le CYP1A1 (enzyme impliquée dans la phase I de métabolisation des xénobiotiques), la GSTM1 (enzymes de détoxification de la phase II) et la NQO1 (enzyme cytosolique réduisant les quinones). Il est important de noter que le CYP1A1 est sous la régulation transcriptionnelle de l'AhR, tandis que le facteur Nrf2 régule la transcription de nombreuses enzymes détoxifiantes des ROS telles que la GSTM1 et la NQO1 (Guyot et al., 2013; Tonelli et al., 2018).

5.1. Etude de l'expression génique du CYP1A1

Comme représenté dans la **Figure 50,** l'expression génique du CYP1A1 augmente significativement après exposition des cellules BEAS-2B aux $PM_{2.5}$ et à leurs 2 extraits organiques et hydrosolubles. Plus concrètement, suite à une exposition des cellules aux 2 concentrations de $PM_{2.5}$, l'expression génique du CYP1A1 est significativement induite d'une manière dose-dépendante avec des valeurs de QR compris entre 20 et 65. De même, l'EO des $PM_{2.5}$ provoque une forte augmentation du CYP1A1 avec des valeurs de QR dépassant 45. Concernant l'EH, l'induction de ce gène est beaucoup plus faible mais significative tout en notant des valeurs de QR légèrement supérieures à 2.

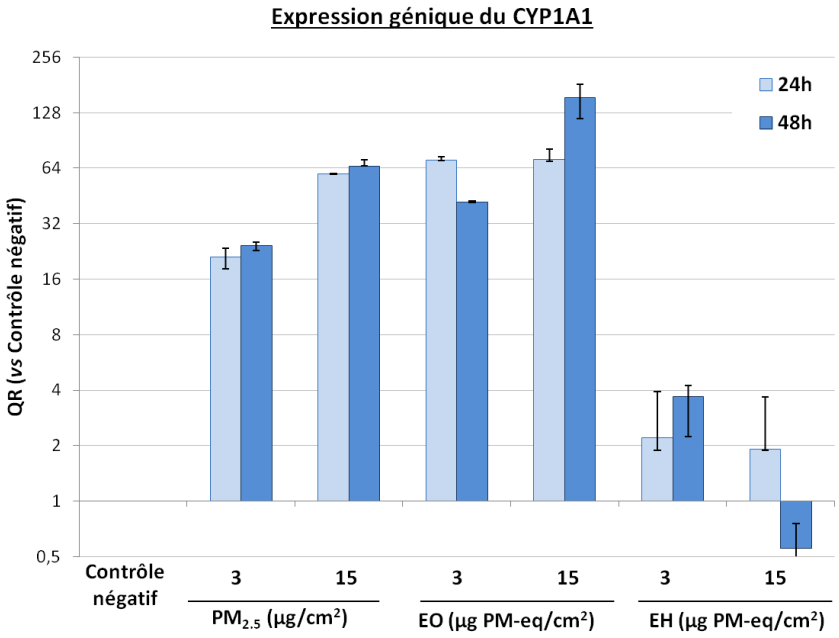


Figure 50: Quantification de l'expression génique du CYP1A1 suite à l'exposition aux $PM_{2.5}$ et leurs extraits organiques et hydrosolubles.
Les cellules BEAS-2B ont été exposées à 3 et 15 µg/cm² de $PM_{2.5}$ ou à leurs extraits organique (EO) et hydrosolubles (EH), pendant 24 et 48h. Des cellules non exposées ont été utilisées comme contrôle négatif. *Les résultats de la quantification relative par $2^{-\Delta\Delta Ct}$ sont les médianes des duplicats de trois expériences indépendantes +/- espace interquartile. Significativité : QR >2 (surexpression) ou QR <0,5 (sous expression) rapportée à la valeur du contrôle négatif non exposé normalisé à 1 avec 18S.*

En parallèle, les cellules BEAS-2B ont été prétraitées séparément par les 3 inhibiteurs, puis exposées à 3 et 15 µg/cm² de $PM_{2.5}$ ou de leurs extraits. Les résultats de la **Figure 51** montrent que les 3 voies de signalisation étudiées affectent l'expression génique du CYP1A1. Tout d'abord, l'expression génique du CYP1A1 est fortement atténuée dans les cellules BEAS-2B déjà traitées par 10 µM du CH223191. Comparée aux cellules non traitées par les inhibiteurs, une diminution à moitié de la valeur de QR a été observée après 24h d'exposition aux particules ou à leurs extraits en présence de CH223191, alors qu'à 48h d'exposition, l'effet de cet inhibiteur est bien visible provoquant une diminution de la valeur de QR de plus de 90%. D'une manière surprenante, le prétraitement des cellules BEAS-2B par 1 µM de la TAK-242 réduit à 40% l'expression génique du CYP1A1 induite après 24h d'exposition aux $PM_{2.5}$ ou à leurs extraits. L'effet inhibiteur de la TAK-242 s'accroit avec le temps tout en provoquant une diminution de plus de 70% de l'expression génique du CYP1A1, comparativement aux cellules exposées en absence d'inhibiteurs. Le même profil d'inhibition a été observé dans les cellules prétraitées par 10 mM de la NAC. Cette dernière a entrainé une diminution de 50% et de 70%

des valeurs de QR respectivement après 24 et 48h exposition des cellules aux particules ou à leurs 2 extraits.

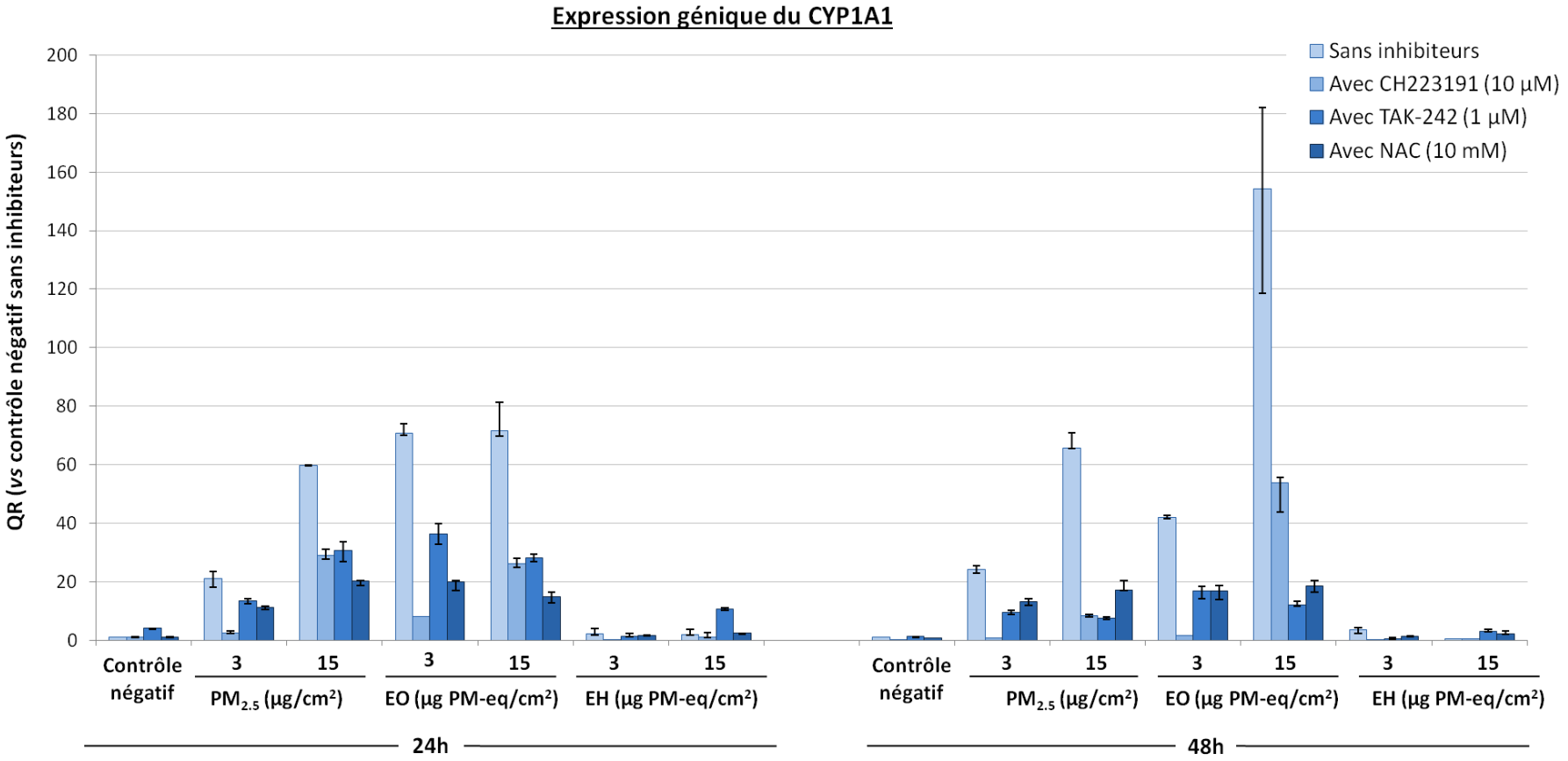


Figure 51: Quantification de l'expression génique du CYP1A1 suite à l'inhibition de la voie AhR, TLR4 et le stress oxydant.
Les cellules BEAS-2B ont été prétraitées séparément ou non par les 3 inhibiteurs (CH223191, TAK-242 et NAC) puis exposées à 3 et 15 µg/cm² de $PM_{2.5}$ et de leurs extraits organique (EO) et hydrosolubles (EH), pendant 24 et 48h. Des cellules non exposées ont été utilisées comme contrôle négatif. *Les résultats de la quantification relative par* $2^{-\Delta\Delta Ct}$ *sont les médianes des duplicats de trois expériences indépendantes +/- espace interquartile. Significativité : QR >2 (surexpression) ou QR <0,5 (sous expression) rapportée à la valeur du contrôle négatif sans inhibiteurs normalisé à 1 avec 18S.*

Pour conclure, les $PM_{2.5}$ et leurs fractions ont pu induire l'expression génique du CYP1A1. Les 3 voies de signalisation interviennent dans la régulation de l'expression génique des enzymes de métabolisation des HAP. Bien que la voie AhR soit la plus impliquée, la voie TLR4 ainsi que le stress oxydant semblent avoir également un rôle non négligeable dans l'induction de l'expression génique du CYP1A1 suite à l'exposition aux particules ou à leurs fractions. Ces résultats sont conformes avec les données de la littérature (Courter et al., 2007; Dumax-Vorzet et al., 2015; Totlandsdal et al., 2010; Yuan et al., 2019). Impliquée surtout dans la métabolisation des HAP, l'expression génique du CYP1A1 augmente après exposition aux $PM_{2.5}$, comme elles contiennent une teneur importante en HAP liés à la phase particulaire (Abbas et al., 2009; Jang et al., 2019; Saint-Georges et al., 2008; Sancini et al., 2014). Cette induction s'accentue après exposition aux HAP libres dans la fraction organique (Bonvallot et al., 2001; Brinchmann et al., 2018).

Etant une cible privilégiée pour les HAP, il est admis que l'AhR agit comme un facteur de transcription qui régule l'expression de différents gènes en aval impliqué dans la métabolisation des HAP, notamment le CYP1A1. Nos résultats rejoignent les données de la littérature et confirme le rôle de l'AhR comme inducteur de la transcription du CYP1A1 après exposition aux $PM_{2.5}$ et à leurs extraits, en particulier leur EO (Castañeda et al., 2018; Jang et al., 2019; Vogel et al., 2020). Bien que nos résultats suggèrent que la TAK-242 possède une fonction régulatrice critique dans ce mécanisme, celle-ci n'a pas été décrite dans la littérature jusqu'à présent. D'autre part, bien que le rôle du CYP1A1 dans l'induction des espèces oxydantes hautement réactives soit bien détaillé dans la littérature toxicologique, un manque de connaissances subsiste sur la manière dont le stress oxydant induit l'expression de ce gène.

5.2. Etude de l'expression génique de la GSTM1

Parallèlement, nous avons quantifié l'expression génique de la GSTM1 et de la NQO1 après exposition des cellules BEAS-2B aux 2 concentrations des $PM_{2.5}$ et de leurs EO et EH pendant 24 et 48h.

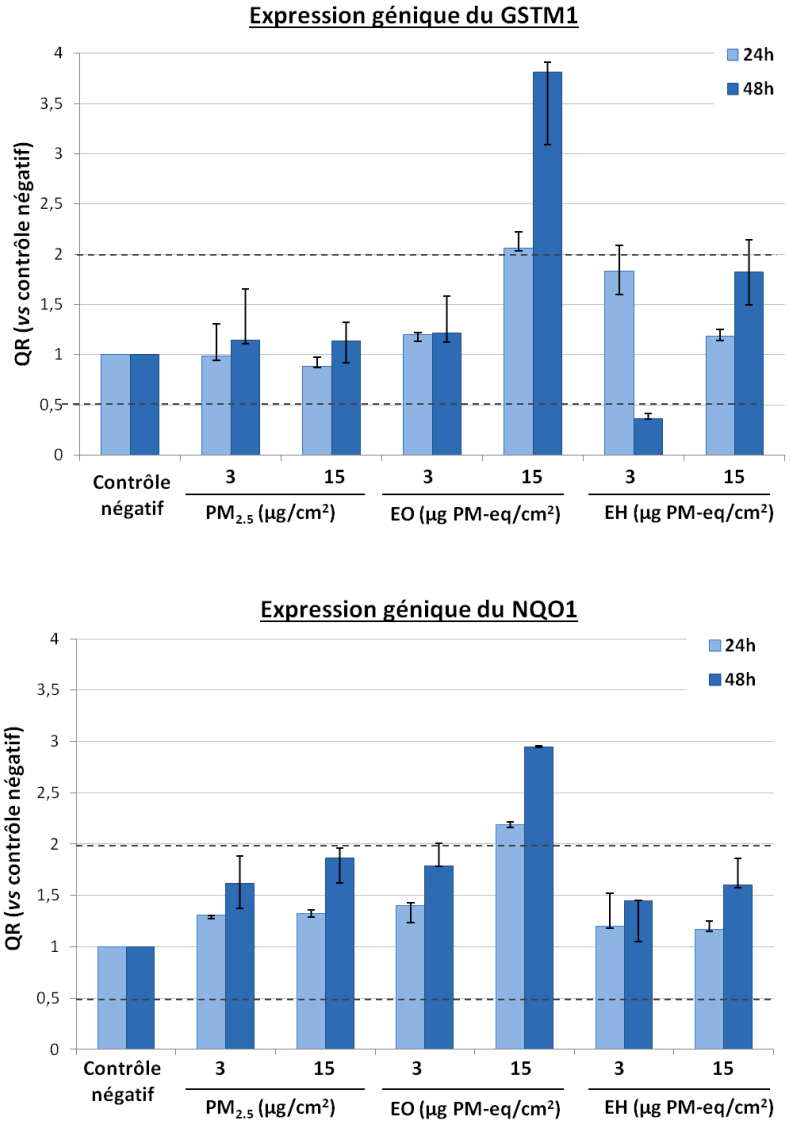


Figure 52: Quantification de l'expression génique de GSTM1 et NQO1 suite à l'exposition aux $PM_{2.5}$ et leurs extraits organique et hydrosoluble.

Les cellules BEAS-2B ont été exposées à 3 et 15 µg/cm² de $PM_{2.5}$ ou à leurs extraits organique (EO) et hydrosolubles (EH), pendant 24 et 48h. Des cellules non exposées ont été utilisées comme contrôle négatif. *Les résultats de la quantification relative par $2^{-\Delta\Delta Ct}$ sont les médianes des duplicats de trois expériences indépendantes +/- espace interquartile. Significativité : QR >2 (surexpression) ou QR <0,5 (sous expression) rapportée à la valeur du contrôle négatif non exposé normalisé à 1 avec 18S.*

Comme le montre la **Figure 52**, l'exposition des cellules BEAS-2B aux $PM_{2.5}$ et à leurs 2 fractions présente le même profil d'induction de GSTM1 et de NQO1. Aucune induction significative n'est dégagée pour les échantillons de $PM_{2.5}$ et d'EH, mais un effet inducteur significatif est cependant bien visible pour la concentration la plus élevée d'EO des $PM_{2.5}$. Plus précisément, 15 µg PM-eq/cm² d'EO induit l'expression des 2 gènes étudiés d'une manière dépendante de la dose et du temps. Les valeurs de QR sous ces conditions sont significatives,

soit supérieur à 2 à 24h, et supérieur à 3 après 48h d'exposition, comparées à celles du témoin négatif.

En concomitance, les cellules BEAS-2B ont été prétraitées séparément par la concentration optimale d'inhibition de chaque inhibiteur, suivi de leurs expositions, pendant 24 et 48h, à 3 et 15 µg/cm^2 de $PM_{2.5}$ et de leurs EO et EH. Les résultats, représentés dans la **Figure 53**, montrent que l'expression génique de GSTM1 après traitement des cellules par 10 µM du CH223191 avant leur exposition aux EO est comparable à celle du contrôle négatif avec des valeurs de QR qui avoisinent 1. Ainsi, le CH223191 a réduit significativement de moitié l'expression génique de GSTM1 induite par la forte concentration d'EO des $PM_{2.5}$ (QR=1,18 à 24h ; QR=1,12 à 48h). Egalement, après 24h d'inhibition de la voie TLR4 par 1 µM de la TAK-242, l'expression génique de GSTM1 induite par 15 µg PM-eq/cm^2 d'EO a diminué (QR=0,59). Après 48h, l'effet inhibiteur de la TAK-242 sur l'expression génique de la GSTM1 est devenu significatif avec des valeurs de QR inférieures à 0,5. D'autre part, la présence concomitante de la NAC avec l'EO a inhibé significativement et considérablement l'expression génique de la GSTM1, indépendamment du temps d'exposition (QR<0,5).

Pour conclure, seul l'EO a pu induire l'expression génique des 2 enzymes détoxifiantes, GSTM1 et NQO1. Concernant les voies de signalisation, le stress oxydant semble être le principal activateur de la transcription de GSTM1. En plus, nos résultats suggèrent un rôle important des récepteurs TLR4 et AhR en tant que régulateurs primordiaux de ce gène.

En se basant sur la littérature, l'exposition aux HAP a été associée à une sensibilisation des voies antioxydantes qui stimulent l'expression des gènes codant pour des protéines enzymatiques impliquées dans la défense antioxydante, tels que la GSTM1 (Gangwar et al., 2020; Rao et al., 2018). L'AhR et l'enzyme GSTM1 sont intimement associés, même si le nombre de publications concernant se sujet reste très limité. Marinković et al., ont confirmé que le rôle principal de la GSTM1 réside dans la détoxification des xénobiotiques électrophiles tels que le diol-époxyde de benzo[a]pyrène produit par le CYP1A1, ainsi que d'autres xénobiotiques et polluants environnementaux (Marinković et al., 2013). Si la relation entre AhR et GSTM1 est peu évoquée dans la littérature, l'interaction entre TLR4 et ce gène reste inconnue. En revanche, le rôle du stress oxydant dans l'induction de l'expression de différents gènes codant pour des enzymes détoxifiantes est largement décrit dans la littérature (McBride et al., 2005; Park et al., 2008; Sharath Babu et al., 2017; Yang et al., 2009). Yang et al., ont mis en évidence que le stress oxydant induit la transcription des protéines régulatrices et

catalytiques de la défense antioxydante, telles que Nrf2, GSTM1, et SOD2, individuellement et en combinaison (Jerotic et al., 2019).

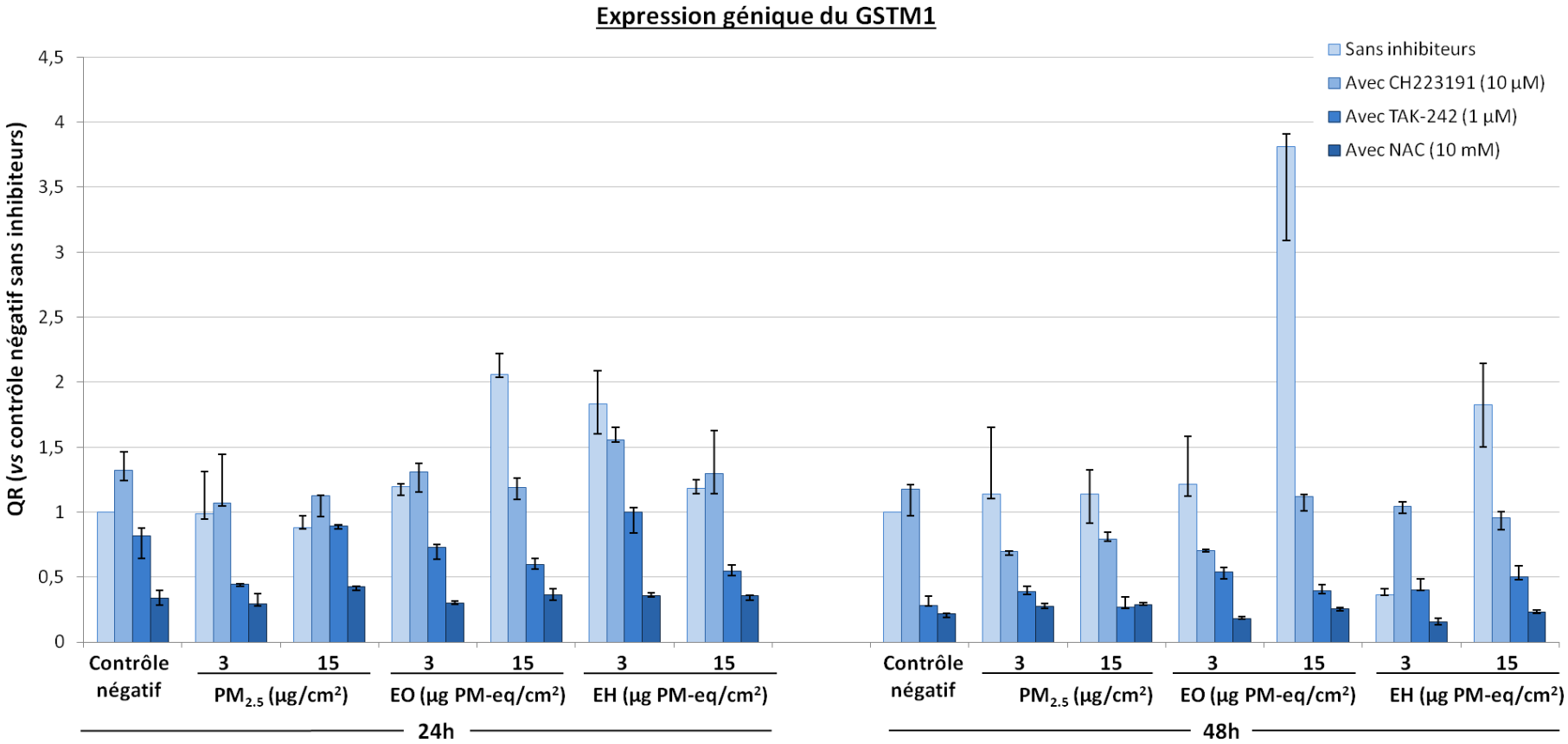


Figure 53: Quantification de la production de GSTM1 après inhibition des 3 voies de signalisation étudiées.

Les cellules BEAS-2B ont été prétraitées séparément ou non par les 3 inhibiteurs (CH223191, TAK-242 et NAC) puis exposées à 3 et 15 µg/cm² de $PM_{2.5}$ et de leurs extraits organique (EO) et hydrosolubles (EH), pendant 24 et 48h. Des cellules non exposées ont été utilisées comme contrôle négatif. *Les résultats de la quantification relative par* $2^{-\Delta\Delta Ct}$ *sont les médianes des duplicats de trois expériences indépendantes +/- espace interquartile. Significativité : QR >2 (surexpression) ou QR <0,5 (sous expression) rapportée à la valeur du contrôle négatif sans inhibiteurs normalisé à 1 avec 18S.*

6. Discussion

Des enquêtes épidémiologiques ont associé la pollution atmosphérique particulaire à l'augmentation de la morbidité et de la mortalité due aux maladies respiratoires et cardiovasculaires (Eilstein, 2010; H. Kim et al., 2018). Pour cette raison, il est important de mieux connaître les mécanismes moléculaires par lesquels ces polluants affectent la santé humaine, afin de réduire leurs émissions, de limiter leurs effets sur la santé, voire de développer des stratégies thérapeutiques efficaces. Bien que la littérature fasse état d'un grand nombre d'approches *in vitro*, les chercheurs sont encore loin de disposer d'une explication mécanistique complète de la relation causale entre les PM et leurs effets sur la santé.

Les enquêtes épidémiologiques cherchent généralement à corréler les effets sanitaires aux teneurs atmosphériques en particules fines ou grossières. Pourtant, de nombreuses études telles que la nôtre tendent à prouver qu'outre la concentration massique de particules dans l'air, la composition s'avère être un facteur majeur de toxicité. Ce point est d'autant plus important que la composition des PM peut varier considérablement en fonction de la saison, des conditions météorologiques, de la région et des sources. Dans notre cas, l'échantillon de $PM_{2.5}$ étudié présente ainsi une composition chimique complexe contenant de nombreux composés inorganiques et organiques. Le rôle exact de chaque fraction des $PM_{2.5}$ dans leurs effets toxiques n'est pas encore été entièrement compris ni de manière globale ni du point de vue des mécanismes physiopathologiques sous-jacents.

Le stress oxydant, la production des cytokines pro-inflammatoires et la formation d'espèces électrophiles suite à l'activation métabolique des HAP sont des facteurs impliqués dans les effets néfastes sur la santé des $PM_{2.5}$. Dans ce contexte, notre intérêt s'est principalement dirigé vers l'étude approfondie du stress oxydant et des voies TLR4 et AhR en utilisant des inhibiteurs spécifiques que sont la NAC (antioxydant), la TAK-242 (inhibiteur de la voie TLR4) et le CH223191 (antagoniste de la voie AhR). Le recours à l'utilisation de ces inhibiteurs nous permet de décrire le rôle et d'identifier l'interaction entre ces 3 mécanismes induits après exposition au $PM_{2.5}$.

Nos objectifs étaient (i) d'évaluer le rôle des $PM_{2.5}$ ainsi que de leurs fractions organique et hydrosoluble dans la toxicité induite par les $PM_{2.5}$, (ii) de déchiffrer les mécanismes toxicologiques sous-jacents et (iii) d'identifier d'éventuelles interactions entre ces mécanismes. A cet égard, les $PM_{2.5}$ choisies pour effectuer cette étude ont été échantillonnées pendant la période de mars à juillet 2011, dans le centre ville de Dunkerque, dans le nord de la France, un

site urbain influencé par le transport maritime et les émissions de procédés industriels, à l'aide d'un impacteur en cascade à cinq étages. Ce travail a été réalisé sur des cellules épithéliales bronchiques humaines normales BEAS-2B, un modèle pertinent du fait de son homologie élevée avec les tissus pulmonaires humains et les cellules primaires (Courcot et al., 2012). Dans cette étude, plusieurs paramètres liés aux mécanismes critiques sous-jacents de la toxicité des $PM_{2.5}$ ont été testés. Parmi ceux-ci, on peut citer la production intracellulaire de ROS, l'expression génique et la production des cytokines pro-inflammatoires, ainsi que l'expression génique de différentes enzymes de métabolisation dans les cellules exposées.

6.1. Evaluation de la cytotoxicité et de la viabilité cellulaire

En en basant sur les résultats obtenus par les tests de cytotoxicité et de prolifération cellulaire réalisés par Landkocz et al., les deux concentrations (3 et 15 µg/cm^2) de $PM_{2.5}$ et de leurs extraits ainsi que la cinétique d'exposition (24 et 48h) ont été choisies en se basant sur la cytotoxicité induite par les PM dépendante de la dose et du temps (Landkocz et al., 2017).

Les tests de cytotoxicité et de viabilité cellulaire effectués sur les cellules BEAS-2B en présence ou absence des doses d'inhibiteur (10 µM de CH223191, 1 µM de la TAK-242 et 10 mM de la NAC) et des 2 concentrations choisies de $PM_{2.5}$ et de leurs extraits, n'ont montré aucun effet significatif sur la perméabilité et l'intégrité de la membrane cellulaire après exposition, nous permettant de les employer pour la suite du travail.

6.2. Fractions et voies de signalisation impliquées dans l'induction stress oxydant par les $PM_{2.5}$

Les $PM_{2.5}$ et leurs extraits ont provoqué une surproduction de ROS dans les cellules BEAS-2B, notamment à la dose d'exposition la plus élevée (15 µg/cm^2). Les HAP et les autres composants chimiques liés aux $PM_{2.5}$ entrainent une perturbation de l'homéostasie redox dans les cellules BEAS-2B (Borgie et al., 2015; Dergham et al., 2012; Leclercq et al., 2018; Yang et al., 2018). Il ressort de la littérature que les $PM_{2.5}$ contenant une forte teneur en HAP induisent des dommages oxydatifs liés à la production de ROS, même à de faibles doses d'exposition (Longhin et al., 2013). Le BaP, HAP couramment détecté dans les $PM_{2.5}$, a été décrit comme le principal inducteur de ces effets oxydatifs (Deng et al., 2018; Kasala et al., 2015). Cependant, le benzo[b]fluoranthène (9,5 µg/g) était le HAP le plus abondant dans l'échantillon de $PM_{2.5}$ étudié dans ce travail, suivi par le benzo[k]fluoranthène (5,3 µg/g), tandis que la teneur de BaP (3,2 µg/g) dans ces particules était beaucoup plus faible. Huang et al., ont

rapporté que l'exposition des cellules épithéliales aux $PM_{2.5}$, ayant une teneur élevée en ces deux HAP, est associée à une perturbation de l'homéostasie redox causée par la surproduction des ROS, ce qui souligne le rôle de la fraction organique des $PM_{2.5}$ comme inducteur de stress oxydant (Huang et al., 2020). Outre le rôle de certains HAP, plusieurs études ont établi une corrélation positive entre la surproduction intracellulaire des ROS et la forte concentration en espèces hydrosolubles des $PM_{2.5}$ ainsi qu'en métaux de transition, dont plusieurs ont une activité redox reconnue comme Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni et V (Shuster-Meiseles et al., 2016; Wang et al., 2013). Étant le métal le plus abondant dans les $PM_{2.5}$ étudiées, le Fe élémentaire a un fort pouvoir catalytique pour les réactions de Fenton, dont la conséquence ultime est la production de ROS, en particulier le radical hydroxyle ($OH^{\cdot}$) (Wang and Tang, 2019; Yang et al., 2016). Prises ensemble, ces données confirment que, séparément ou ensemble, tous les composants chimiques des $PM_{2.5}$ peuvent contribuer, de manière différente, à la surproduction de ROS et, par conséquent, aux dommages oxydatifs.

En supplément d'autres travaux publiés, Mazuryk et al., ont montré qu'il existe une différence entre les profils des ROS générées par ces 2 fractions et celui par les $PM_{2.5}$ (Mazuryk et al., 2020; Wang et al., 2013). A des concentrations élevées, l'activité catalytique des composants inorganiques devient plus évidente pour induire une production de ROS similaire à celle des échantillons de PM. De même, la fraction organique joue un rôle important dans le stress oxydant à des concentrations bien déterminées, toutefois, l'implication de la fraction biologique dans la production de ROS induite par les $PM_{2.5}$ n'est, jusqu'à présent, pas détaillée dans la littérature et le nombre de publications concernant ce sujet est très limité.

Nos résultats ont prouvé que l'exposition des cellules BEAS-2B à deux concentrations de $PM_{2.5}$, précédée de leur traitement par le CH223191, réduisait significativement la production de ROS, confirmant le rôle de l'AhR dans la surproduction de ROS. Cela pourrait être attribuable au fait que les HAP, dotés de propriétés lipophiles, peuvent franchir librement la membrane plasmique des cellules BEAS-2B et activer l'AhR. La voie AhR et les voies de signalisation en aval, comme le CYP1A1/1B1, sont surtout connues pour leur implication dans l'activation des HAP liés aux $PM_{2.5}$, ce qui entraîne la génération de métabolites hautement réactifs et plus toxiques que la molécule mère (Abbas et al., 2018; Costa et al., 2010; Moorthy et al., 2015). Différentes études ont abouti à des résultats similaires qui suggèrent que la voie de signalisation AhR est un régulateur clé de l'homéostasie redox cellulaire (Ren et al., 2020; Vogel et al., 2020). Harmon et al. ont démontré que le traitement de cellules épithéliales avec

des PM augmentait la production cellulaire de ROS qui était atténuée par le knockdown d'AhR à l'aide de siRNA (Harmon et al., 2018).

Bien que le rôle de l'AhR dans la surproduction de ROS soit bien établi dans la littérature, le rôle du TLR4 dans le déclenchement de la production de ROS n'est pas décrit jusqu'à présent. Dans notre étude, nous avons montré, pour la première fois, que le prétraitement des cellules BEAS-2B par la TAK-242 diminuait significativement la production de ROS après l'exposition des cellules BEAS-2B aux $PM_{2.5}$. Ce résultat suggère que les $PM_{2.5}$ englobent des composés qui peuvent interagir avec le TLR4, ce qui conduit à l'activation de NF-κB et donc à l'induction génique de protéines pro-inflammatoires (He et al., 2017b; Takeda and Akira, 2004). L'inhibition de TLR4 a réduit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et donc la production de ROS par les cellules BEAS-2B. Ces résultats mettent en évidence le potentiel du TLR4 ainsi que des cytokines pro-inflammatoires sécrétées à induire un déséquilibre redox dans les cellules BEAS-2B exposées aux $PM_{2.5}$.

L'inhibition du TLR4 dans les cellules BEAS-2B affecte, non seulement la production de ROS induite par les $PM_{2.5}$, mais aussi celle induite par leurs extraits inorganiques. Selon la littérature, le Ni et surtout le Zn (98 µg/g dans l'EH) semblent jouer un rôle crucial dans l'activation de la réponse inflammatoire (Tsou et al., 2013). Ces métaux ont la capacité à activer le TLR4, ses protéines adaptatrices ainsi que NF-κB, *via* des mécanismes mal connus, ce qui leur confère des propriétés pro-inflammatoires (Tsou et al., 2013, 2011, 2010; Yeh et al., 2011). La production des ROS induite par les extraits organiques est également réduite suite à l'inhibition du TLR4 dans les cellules BEAS-2B. En effet, il pourrait exister une interaction entre les composés organiques des PM et le TLR4, même si celle-ci n'est pour le moment pas décrite dans la littérature. Pris ensemble, ces résultats suggèrent que les trois fractions de $PM_{2.5}$, interagissent avec le TLR4 pour induire la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires conduisant ensuite, à un stress oxydant.

Pour résumer, les différentes fractions de $PM_{2.5}$ agissent comme des activateurs du TLR4 et AhR qui, à leur tour, induisent une surproduction des ROS *via* la production des cytokines pro-inflammatoires ou l'expression génique des EMX, conduisant ainsi à un état de stress oxydant.

6.3. Fractions et voies de signalisation impliquées dans la réponse inflammatoire induite par les $PM_{2.5}$

Suite à l'exposition aux $PM_{2.5}$, l'expression génique et la production de l'IL-6 augmente de manière dose et temps-dépendante dans les cellules BEAS-2B, comme le montrent la **Figure 46** et la **Figure 48**. La fraction hydrosoluble a montré une tendance à induire l'expression génique et la production de l'IL-6, qui seront toutes les deux significatives après 48h d'exposition à la concentration la plus élevée. Concernant l'EO, une tendance à l'inhibition de l'expression génique de l'IL-6 peut être dégagée ; cette inhibition sera significative au niveau protéique. En effet, l'exposition des cellules à un mélange de polluants toxiques chimiques ou biologiques paraît être le principal déclencheur de la réponse inflammatoire. En revanche, la fraction inorganique des particules tend à être moins inductrice que les particules. Nos résultats ont mis en évidence une divergence entre les propriétés pro-inflammatoires des $PM_{2.5}$ et de l'EO, probablement parce que les composés des $PM_{2.5}$ lui confèrent une capacité à activer divers mécanismes clairement liés à l'initiation et/ou à l'exacerbation de la réponse inflammatoire (Baulig et al., 2009).

L'inhibition de la voie AhR entraîne une diminution du niveau de production de l'IL-6. Ce résultat obtenu est en accord avec diverses études qui confirment que l'inflammation des voies respiratoires induite par les $PM_{2.5}$ pourrait être associée à l'activation de la voie AhR (Feng et al., 2019; Ferecatu et al., 2010; Shen et al., 2018; Wong et al., 2018). Cela peut être expliqué par le fait que l'AhR peut indirectement interagir, *via* la voie CYP1A1/1B1 et la production des ROS, avec de multiples voies de transduction du signal en aval, comme la voie MAPK, connue pour induire la transcription et la production des cytokines pro-inflammatoires (Puga et al., 2009; Yuan et al., 2019). Une seconde explication pourrait résider dans l'interaction directe de l'AhR avec NF-kB ou COX2, 2 facteurs de régulation clés de l'inflammation, ce qui modulerait fortement leur action (Larigot, 2018; Øvrevik et al., 2014; Vogel et al., 2011).

La diminution des niveaux de l'expression et de la production de l'IL-6 est encore accentuée après l'inhibition de la voie TLR4, et d'autant plus par l'inhibition du stress oxydant, dans les cellules exposées aux $PM_{2.5}$, ce qui est parfaitement en accord avec la littérature (Becker et al., 2005; Campolim et al., 2020; Fu et al., 2020; He et al., 2017c; Shoenfelt et al., 2009; G. Wang et al., 2020). Bien que la production de l'IL-6 ait été négativement affectée après l'inhibition du TLR4, il n'y a pas eu d'inhibition absolue, ce qui confirme l'implication d'autres voies de signalisation intrinsèques comme le stress oxydant, pouvant jouer un rôle critique dans la régulation de la réponse inflammatoire induite par les $PM_{2.5}$. Les travaux de

Wang et al., ont confirmé nos résultats. Cette équipe a mis en évidence que le traitement des cellules épithéliales par la NAC réduit la production des ROS et atténue la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires (J. Wang et al., 2020). Ces résultats suggèrent que les $PM_{2.5}$ entières peuvent elles-mêmes activer, non seulement la voie TLR4, mais aussi d'autres voies de signalisation comme la voie de la MAPK d'une manière dépendante des ROS, directement impliquée dans la transcription de cytokines pro-inflammatoires. Pris ensemble, les résultats obtenus soulignent le rôle de la voie TLR4 et l'interaction AhR-ROS-MAPK impliqués dans la production de l'IL-6 par les cellules BEAS-2B exposées aux $PM_{2.5}$.

La capacité de l'EH à interagir avec le TLR4 et à catalyser des réactions de Fenton et à induire un stress oxydant, explique le fait que la production de l'IL-6 a diminué suite à l'inhibition de ces 2 voies par la TAK-242 et la NAC.

L'ensemble de ces résultats suggère le rôle dominant de la composition chimique complexe des particules dans leur effet pro-inflammatoire. Concernant les voies de signalisation, nos observations ont souligné le rôle du stress oxydant comme étant un des principaux régulateurs de la réponse pro-inflammatoire. En plus, l'implication de la voie TLR4 et AhR (*via* la production des ROS) dans la production des cytokines pro-inflammatoires a été mis en évidence.

6.4. Fractions et voies de signalisation impliquées dans l'expression génique des enzymes de métabolisation des xénobiotiques

La voie de l'activation métabolique a été étudiée en quantifiant l'expression génique de 3 enzymes impliquées dans la métabolisation des xénobiotiques. Comme le montre la **Figure 50**, l'expression génique du CYP1A1 augmente significativement d'une manière dose dépendante après exposition aux $PM_{2.5}$ et à leurs extraits. Confirmant les résultats obtenus lors de nombreuses études *in vitro* et *in vivo*, nos résultats ont montré que la voie AhR est activée suite exposition aux $PM_{2.5}$ et leur EO quels que soient le temps et la dose d'exposition (Abbas et al., 2009; Moorthy et al., 2015; Yang et al., 2017; Yuan et al., 2019; Zhou et al., 2015). Etant sous la régulation de l'AhR, l'expression du CYP1A1 diminue fortement après inhibition de cette voie par le CH223191, ce qui est en accord avec une étude publiée récemment (Chen et al., 2019). D'une manière surprenante, *CYP1A1* est également réduit après inhibition de la voie TLR4. Ces résultats suggèrent un lien direct et une forte interaction entre la voie TLR4 et la voie AhR, jusqu'à présent, non décrite dans la littérature. Cette inhibition de l'expression génique du CYP1A1 est à mettre en parallèle avec la diminution de la production de ROS

également constatée lors de l'inhibition de la voie TLR4. Par ailleurs, l'expression génique du CYP1A1 diminue fortement après traitement des cellules par la NAC, suggérant également une interaction entre ROS-AhR-CYP1A1, bien que cette interaction ne soit pas encore élucidée.

Enfin, l'expression génique de GSTM1 a été significativement induite uniquement après exposition des cellules BEAS-2B à l'EO. Selon la littérature, les HAP et quinones des $PM_{2.5}$ sont capables d'induire l'expression génique et protéique des GST, de l'hème oxygénase-1 (HMOX-1) et d'autres enzymes de phase II dans les macrophages et les cellules épithéliales d'une manière Nrf2-dépendante dans un contexte de stress oxydant (Li et al., 2004). Concernant les $PM_{2.5}$, une étude réalisée par Li et ses collaborateurs a montré que ces particules semblent inhiber les enzymes protectrices régulées par Nrf2, ce qui entraîne l'activation de cascades de signalisation intracellulaires supplémentaires augmentant ainsi l'expression des gènes des cytokines et des chimiokines pro-inflammatoires (Li et al., 2009). La plausibilité de ce mécanisme est confortée par des études *in vivo* montrant que l'augmentation de la production de ROS après exposition aux PM induit une surexpression des gènes induits par NF-κB, comme TNF-α, TGF-β, IFN-ɣ et IL-6 (González-Flecha, 2004).

Une fois de plus, nos résultats ont mis en évidence une divergence entre les $PM_{2.5}$ et leur EO en termes de réponse inflammatoire et de voies de signalisation en aval. La capacité de l'EO à inhiber la production de l'IL-6 pourrait s'expliquer par l'activation d'autres voies de signalisation, telles que Nrf2, avec un effet anti-inflammatoire (Ma, 2013; Suzuki et al., 2016). Après une exposition à des composés électrophiles générateurs de ROS tels que les HAP et d'autres substances chimiques contenues dans l'EO des $PM_{2.5}$, le facteur Nrf2 se transloque dans le noyau et orchestre la transcription des gènes cytoprotecteurs codant pour des enzymes antioxydantes et surtout réprime l'expression des gènes des cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL-6 et l'IL-1β, comme c'est le cas dans notre étude (Ma, 2013; Suzuki et al., 2016).

Au vu de l'induction par l'EH, il apparaît qu'il ne s'agit pas uniquement d'un effet physique de type particule inerte, mais bien du rôle de la composition chimique et notamment de la présence de composés métalliques

Concernant les voies de signalisation, l'inhibition de l'AhR réduit significativement l'expression génique de GSTM1, conformément a ce qui a été publié, suggérant que l'AhR est un régulateur principal de l'activation de la voie Nrf2 (Feng et al., 2019; Tonelli et al., 2018; Yeager et al., 2009). En effet, le stress oxydant résultant de l'activation de la voie AhR suite à

l'exposition aux $PM_{2.5}$ et surtout aux HAP de la fraction organique des $PM_{2.5}$, pourrait moduler l'activation de la voie Nrf2 qui joue rôle crucial dans les réponses cytoprotectrices antioxydantes et anti-inflammatoires (Dietrich, 2016; Haarmann-Stemmann et al., 2012; Hayes et al., 2009; Raghunath et al., 2018; Zhu et al., 2019).

L'interaction entre la voie TLR4 et Nrf2 est peu évoquée dans la littérature. Seules quelques études ont montré que l'exposition des cellules aux LPS, un ligand à forte affinité envers le TLR4, induit une forte expression des gènes régulés par le facteur Nrf2. En revanche, jusqu'à présent, le mécanisme qui souligne cette interaction n'est pas décrit (Mohan and Gupta, 2018; Yin and Cao, 2015). Le TLR4 pourrait interagir directement avec le facteur Nrf2 pour induire sa translocation dans le noyau et la transcription des gènes pertinents en aval. L'interaction entre la voie TLR4 et Nrf2 pourrait être indirecte *via* l'AhR. En effet, nous avons démontré que le TLR4 interagit avec l'AhR et module la transcription des gènes en aval (CYP1A1), ce qui pourrait réguler ultérieurement l'activation de la voie Nrf2.

En outre, le rôle du stress oxydant dans l'activation de la voie Nrf2 est mieux compris dans la littérature. Selon nos résultats, l'inhibition du stress oxydant inhibe considérablement l'activation de la voie Nrf2, ce qui est largement établi dans la littérature. Le stress oxydant induit par les $PM_{2.5}$ et leurs extraits entraine l'activation des voies sensibles au déséquilibre redox, dont la voie Nrf2 est la plus connue. La translocation du Nrf2 dans le noyau induit la transcription des gènes antioxydants. Les travaux de Deng et al., ont mis en évidence que l'exposition des cellules épithéliales pulmonaires aux $PM_{2.5}$ induit une surexpression de Nrf2 qui a montré une capacité à supprimer la génération des ROS tout en induisant l'expression des différents gènes impliqués dans la défense antioxydante (Deng et al., 2013a)

Pour résumer, dans les cellules BEAS-2B, l'induction de l'activation du facteur Nrf2, et de l'expression de gènes cytoprotecteurs, est dépendante de diverses voies de signalisation en amont. Dans ce projet de thèse, nous avons identifié les voies AhR, TLR4 et le stress oxydant comme régulateurs cruciaux de la voie Nrf2 antioxydante et anti-inflammatoire.

7. Conclusion

Les objectifs principaux de ce chapitre III étaient d'étudier la contribution de chaque fraction de $PM_{2.5}$ dans leurs effets toxiques, de décrypter les mécanismes toxicologiques sous-jacents et d'identifier d'éventuelles interactions entre ces mécanismes (additivité, synergie ou

antagonisme). Cette étude nous a permis d'établir un lien de causalité entre la toxicité des fractions et les voies de signalisation induites par les $PM_{2.5}$. Toutes les fractions de $PM_{2.5}$ agissent simultanément et sont associées à une surproduction de ROS dans les cellules BEAS-2B, perturbant ainsi l'homéostasie redox et aboutissant à un état de stress oxydant, dont l'effet peut être atténué par les antioxydants, tels que la NAC. Pour la première fois, notre étude a souligné la capacité des $PM_{2.5}$ et de leurs deux fractions dans l'activation de la voie TLR4, qui pourrait être impliquée dans la surproduction de ROS *via* la perturbation du microenvironnement cellulaire, en induisant la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires.

Concernant l'expression et la production de l'IL-6, il nous semble que la fraction particulaire dans son entièreté est la plus impliquée dans cet événement, tandis que la fraction hydrosoluble, quant à elle, a pu induire une réponse inflammatoire significative, bien que plus faible que celle des $PM_{2.5}$. En revanche, la fraction organique des $PM_{2.5}$ a montré un effet potentiellement anti-inflammatoire en inhibant significativement la production de cette cytokine pro-inflammatoire. Cette divergence inattendue entre la réponse inflammatoire induite par les $PM_{2.5}$ et celle induite par leur EO pourrait s'expliquer soit par certains mécanismes sous-jacents liés à l'initiation et/ou à l'exacerbation de la réponse inflammatoire, soit par l'activation de voies de signalisation exerçant un effet anti-inflammatoire, telle que la voie Nrf2. Cette dernière activation se traduit par la surexpression de gènes cytoprotecteurs, tels que GSTM1 et NQO1.

En termes d'activation métabolique, nous avons mis en évidence la capacité des $PM_{2.5}$ et de leurs extraits à provoquer l'activation de la voie AhR et la transcription du CYP1A1. La voie AhR a également contribué à l'induction de la production des cytokines pro-inflammatoires. Sa contribution est moins importante que celle de la voie TLR4 qui a montré, suite à son inhibition, une diminution significative et importante de la production de l'IL-6 induite par les $PM_{2.5}$ et leur EH. Outre ces deux voies, l'inflammation semble être positivement corrélée au stress oxydant. En effet, dans des conditions oxydantes, diverses voies de signalisation pro-inflammatoires, sensibles à la surproduction de ROS, peuvent être activées, notamment la voie MAPK. Nos résultats suggèrent donc une interaction entre la voie AhR et les ROS pour induire une réponse inflammatoire.

La translocation nucléaire de Nrf2 qui pourrait être stimulée par l'EO et ses effets cytoprotecteurs contre le stress oxydant dépendent fortement d'un AhR fonctionnel. Étant

donné que l'exposition à des ligands d'AhR tels que les dioxines et les HAP entraîne la formation, sous l'action des CYP1A1/1B1, de ROS et de métabolites électrophiles, l'interaction AhR-ROS-Nrf2 et la signalisation Nrf2 est probablement un facteur crucial de renforcement de la cytoprotection contre les sous-produits toxiques du processus de détoxification dépendant de l'AhR. Nous avons également souligné l'interaction TLR4-CYP-Nrf2 pouvant aussi contourner les effets pro-oxydants et pro-inflammatoires induits par la voie TLR4 activée par les $PM_{2.5}$ dans les cellules BEAS-2B.

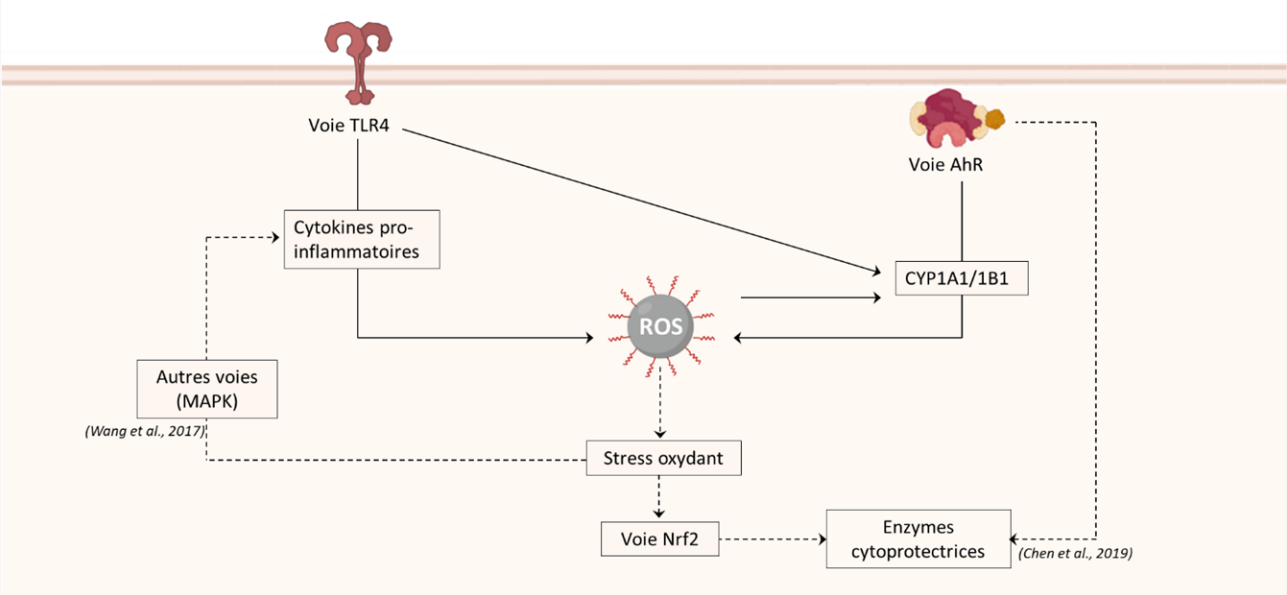


Figure 54: schéma représentant les conclusions retirées

Chapitre IV

Effets des $PM_{2.5}$ sur la sécrétion des vésicules extracellulaires

Chapitre IV : Effets des $PM_{2.5}$ sur la sécrétion des vésicules extracellulaires

Ce présent chapitre vise à comprendre le rôle des fractions chimiques des $PM_{2.5}$ et des trois voies de signalisation étudiées précédemment, dans l'induction de la sécrétion des vésicules extracellulaires (VE) après exposition aux $PM_{2.5}$. Pour atteindre notre objectif, il est important de se placer dans des conditions d'exposition qui privilégient la production de VE, sans pour autant provoquer une réponse toxique significative ou une mortalité cellulaire. Dans le chapitre 3, nous avons montré que la cytotoxicité induite dans les conditions d'exposition choisies, à savoir 3 et 15µg $PM_{2.5}/cm^2$, était négligeable, tandis que la réponse cellulaire biologique faisait intervenir les trois voies impliquées dans la toxicité. Nous avons donc étudié les effets des $PM_{2.5}$, des fractions chimiques des $PM_{2.5}$ et des trois voies de signalisation sur la sécrétion des VE en conservant le même modèle cellulaire et les mêmes échantillons de $PM_{2.5}$, d'extraits et la même stratégie d'exposition aux inhibiteurs spécifiques de chacune des trois voies. Il a fallu dans un premier temps optimiser l'isolement des VE sécrétées par modèle cellulaire avant d'exposer les cellules aux polluants afin d'identifier les fractions et les voies de signalisation les plus impliquées dans la sécrétion des VE.

Partie A : Optimisation de l'isolement des VE

En raison de leur faible diamètre (<200 µm) et de la présence de « contaminants » qui coexistent normalement avec les VE, leur isolement est fastidieux et exige un temps considérable. Il ne fait aucun doute que les protocoles d'isolement des VE à partir des surnageants cellulaires ou les fluides corporels doivent être optimisés pour garantir une pureté élevée des VE isolées (Crescitelli et al., 2021). Jusqu'à 2019, l'ultracentrifugation (y compris la centrifugation différentielle) reste de loin la méthode d'isolement primaire la plus utilisée dans la purification des VE (Royo et al., 2020). Plus de la moitié des chercheurs ont utilisé une combinaison de techniques d'isolement. Un des paramètres fondamentaux à prendre en compte dans le choix des méthodes d'isolement à mettre en œuvre est la matrice de départ. Ainsi, si les chercheurs analysant des fluides biologiques complexes peuvent utiliser une combinaison de jusqu'à six méthodes, ceux utilisant exclusivement des milieux de culture conditionnés sont les moins susceptibles de combiner des protocoles pour l'isolement et la purification des VE. Outre l'ultracentrifugation, la concentration sur des colonnes amicon® suivie d'une

ultracentrifugation, d'une précipitation par un polymère (kit ExoQuick-TC™) ou d'une chromatographie d'exclusion de taille (SEC, colonne IZON) sont des méthodes relativement répandues et fréquemment utilisés pour l'isolement des VE. Afin d'isoler les VE les plus pures possible à partir de cellules épithéliales pulmonaires (BEAS-2B) adhérentes mises en culture, ces quatre méthodes ont été testées. Il est important de signaler que la filtration de nos échantillons sur les colonnes amicon® permet leur concentration de plus de 100 fois avec un taux de récupération élevé (plus de 90 % de la solution de départ diluée).

Les cellules dont l'homéostasie redox est perturbée sécrètent massivement de VE. Afin de comparer l'efficacité des méthodes d'isolement, nous avons cherché un contrôle positif. Alors que notre sujet de recherche porte sur les particules fines, nous avons opté pour l'exposition des cellules BEAS-2B, pendant 48h, à 15 µg PM-eq/cm^2 d'extrait organique (EO) des $PM_{2.5}$. En effet, l'EO contient des composés redox-actifs tels que les HAP ayant le potentiel de provoquer un stress oxydant, tout en ne contenant pas de particules qui auraient pu interférer dans certaines méthodes d'isolement des VE. Le DMSO étant le solvant de remise en suspension de l'EO, des cellules exposées au DMSO (<0,2%) ont été utilisées comme témoin négatif. Après 48h d'exposition des cellules à l'EO et au DMSO, les milieux de culture ont été récupérés afin d'isoler les VE par les quatre méthodes. Nous avons ensuite quantifié les VE en recourant au NTA.

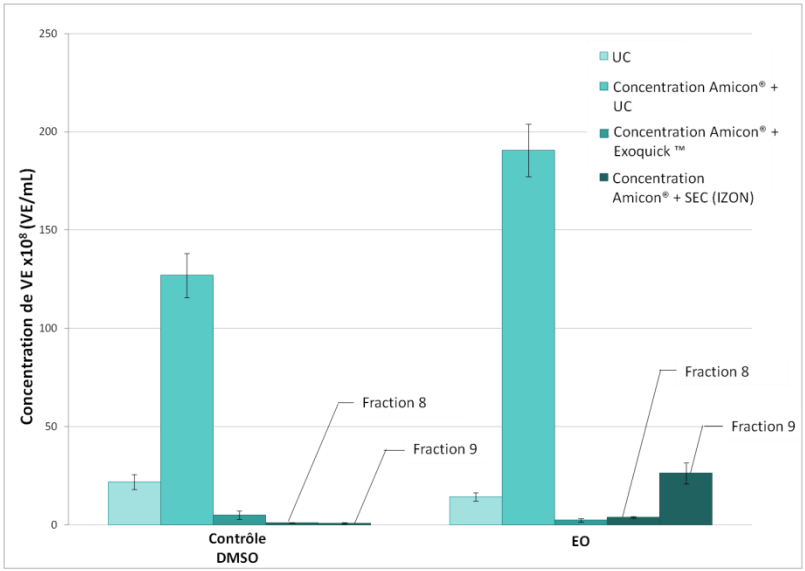


Figure 55: Quantification par NTA des VE isolées par 4 protocoles différents.
Les cellules BEAS-2B ont été exposées à 15 µg PM-eq/cm^2 des extraits organiques (EO) des $PM_{2.5}$ ou au DMSO pendant 48h. Les VE ont été isolées des surnageants de culture par les quatre protocoles suivants : UC (ultracentrifugation), concentration sur des colonnes amicon® suivie d'une UC, précipitation par le kit ExoQuick-TC™ ou SEC (chromatographie d'exclusion de taille, colonne IZON).

En se basant sur les résultats obtenus représentés dans la **Figure 55**, seul le deuxième protocole, par lequel les surnageants ont été concentrés sur des colonnes amicon® 10 kDa et ultracentrifugés, nous a amenés à isoler un grand nombre de VE d'une part et à mettre en évidence une augmentation de la production de VE par les cellules exposées à l'EO comparée à celle exposées au DMSO.

Considérant le meilleur rendement d'isolement, uniquement les VE isolées par ce protocole ont été caractérisées par western blot et microscopie électronique à transmission. Les résultats obtenus par western blot n'ont pas permis de détecter les marqueurs spécifiques de VE (CD81, CD63, Alix, etc), suggérant la contamination des fractions isolées par des protéines indésirables. En outre, les images prises par la microscopie électronique ont montré que la membrane des VE isolées est abîmée ou partiellement détruite, mettant en question l'impact de l'ultracentrifugation sur l'intégrité de la double couche lipidique des VE.

Comme ces quatre protocoles n'ont pas permis d'isoler des VE pures et intactes, d'autres protocoles, tels que la chromatographie d'exclusion stérique (SEC, colonnes préparées au laboratoire) et la centrifugation en gradient de densité Optiprep (ODG), ont été étudiées. Cette fois-ci, l'optimisation de l'isolement des VE à été effectuée à partir des surnageants de cellules exposées à 15 µg/cm^2 de $PM_{2.5}$ pendant 48h. Le changement des conditions d'exposition a été fait dans le but de se placer dans les conditions des expériences ultérieures. Le milieu conditionnel concentré (CCM) a été préparé selon le protocole décrit par Van Deun et ses collaborateurs, spécialistes des VE et notamment impliqués dans la rédaction des lignes directrices internationales des procédures d'isolement. Ensuite, les deux protocoles, mentionnés ci-dessus, ont été mis en œuvre (Van Deun et al., 2014).

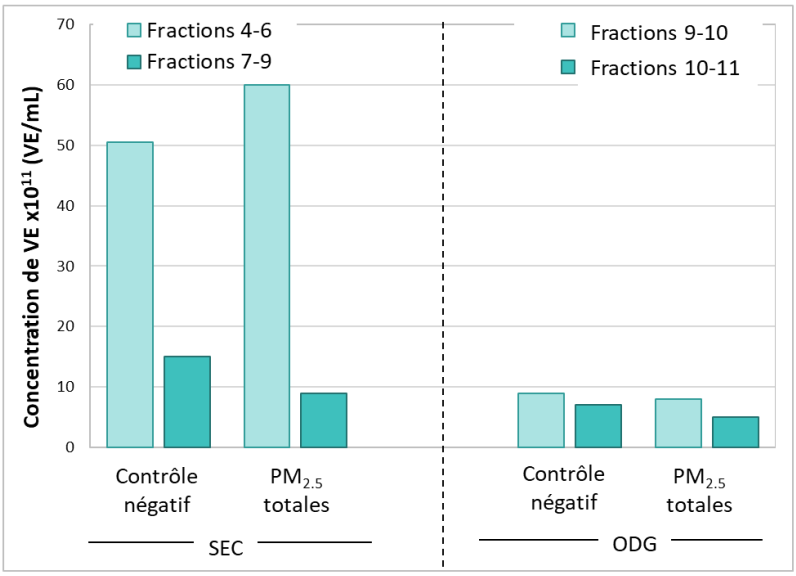


Figure 56: Quantification par NTA des VE isolées par SEC ou ODG.
Les cellules BEAS-2B ont été exposées ou non, pendant 48h, à 15 µg/cm^2 de $PM_{2.5}$. Ensuite les VE ont été isolées des surnageant des cellules en utilisant la chromatographie d'exclusion de taille (SEC) ou par centrifugation sur un gradient de densité Optiprep (ODG).

Conformément à ce qui a été publié dans leur rapport (Van Deun et al., 2014), ces deux techniques ont permis l'isolement d'un grand nombre de VE surtout dans les fractions attendues, 4-6 pour le SEC et 9-10 pour ODG **(Figure 56)**. Ces fractions sont censées contenir non seulement un grand nombre, mais aussi des VE pures, exemptes de contaminations protéiques.

Pour cette raison, la caractérisation des VE s'est poursuivie en effectuant des analyses protéiques de marqueurs membranaires tels que CD81 et CD9, ainsi que de marqueurs intracellulaires comme Alix et Tsg101, en vue de confirmer la présence des VE dans les fractions isolées. En complément, pour garantir la pureté de notre échantillon vésiculaire, le marqueur de contamination argonaute 2 (Ago2), pouvant être facilement co-isolé avec les VE, a également été recherché. Ces trois types de marqueurs ont été étudiés en western blot et les résultats sont présentés dans la **Figure 57**.

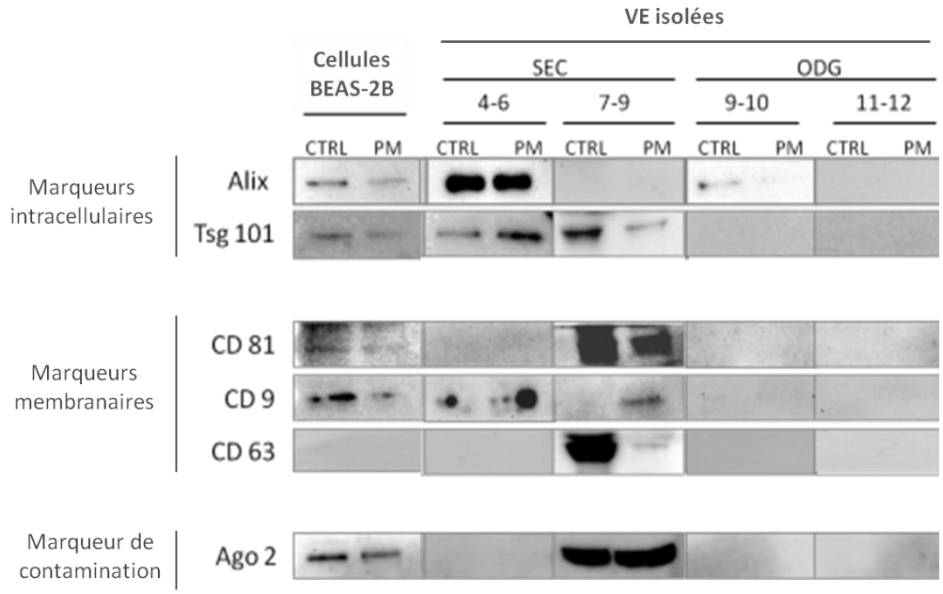


Figure 57: Caractérisation par western blot des VE isolées par SEC ou ODG à partir du surnageant des cellules BEAS-2B exposées aux $PM_{2.5}$.
Après exposition ou non des cellules BEAS-2B, pendant 48h, à 15 µg/cm² aux $PM_{2.5}$, les VE ont été isolées des surnageants en utilisant la chromatographie d'exclusion de taille (SEC) ou par centrifugation sur un gradient de densité Optiprep (ODG). Ensuite, les marqueurs spécifiques des VE (intracellulaire et membranaire) ainsi que des marqueurs de contamination ont été étudiés par western blot. *ODG, Optiprep Density Gradient; SEC, Size Exclusion Chromatography; Alix, ALG-2 interacting protein X; Tsg 101, Tumor susceptibility gene 101; Ago 2, Argonaute 2.*

D'après la **Figure 57**, Alix, Tsg 101 et CD9, ont été détectés dans la fraction 4-6 obtenue par SEC et, dans une moindre mesure, Alix dans la fraction 9-10 obtenue par ODG. Ago 2, marqueur de contamination par les miARN fréquemment co-isolés avec les VE, n'est pas détecté dans la fraction 4-6 de la SEC ni 9-10 de l'ODG. Sa présence a été uniquement détectée dans la fraction 7-9 de la SEC contenant les protéines contaminantes.

Cette phase d'optimisation a mis en évidence que la technique SEC est la méthode adéquate qui permet l'isolement d'un grand nombre et des fractions plus pures des VE à partir du surnageant des cellules mises en culture *in vitro* et exposées aux particules atmosphériques. Cette méthode sera donc celle retenue pour la suite de nos expérimentations.

Partie B : Fractions et voies de signalisation les plus impliquées dans l'induction de la sécrétion des VE par les $PM_{2.5}$

Nous avons poursuivi en exposant les cellules BEAS-2B, cette fois aux 2 concentrations de $PM_{2.5}$ (3 et 15 µg/cm^2) pendant 24 et 48h. Nous avons dans un premier temps étudié l'effet des $PM_{2.5}$ sur la quantité des VE secrétées par les cellules BEAS-2B après exposition et isolement par SEC. Puis nous avons vérifié la pureté des fractions des VE isolées. En fonction des résultats obtenus, nous avons choisi les conditions d'exposition (concentration des $PM_{2.5}$ et durée d'exposition) permettant une sécrétion maximale de VE par les cellules BEAS-2B. En nous basant sur ces conditions, nous avons, dans un deuxième temps, cherché à identifier la fraction ainsi que la voie de signalisation les plus impliquées dans la stimulation de la sécrétion des VE par ce type de cellules.

1. Choix des conditions d'exposition aux $PM_{2.5}$

Pour chaque condition d'exposition, quatre flasques T-150, ensemencées par 3,5 millions de cellules, ont été considérées afin d'obtenir un nombre suffisant de VE pour leur caractérisation. Après avoir exposé les cellules BEAS-2B aux 2 concentrations de $PM_{2.5}$ pendant 24 et 48h, les surnageants ont été récupérés afin d'isoler les VE sur les colonnes SEC, comme mentionné précédemment. Les résultats du comptage des VE par NTA sont représentés dans la **Figure 58**.

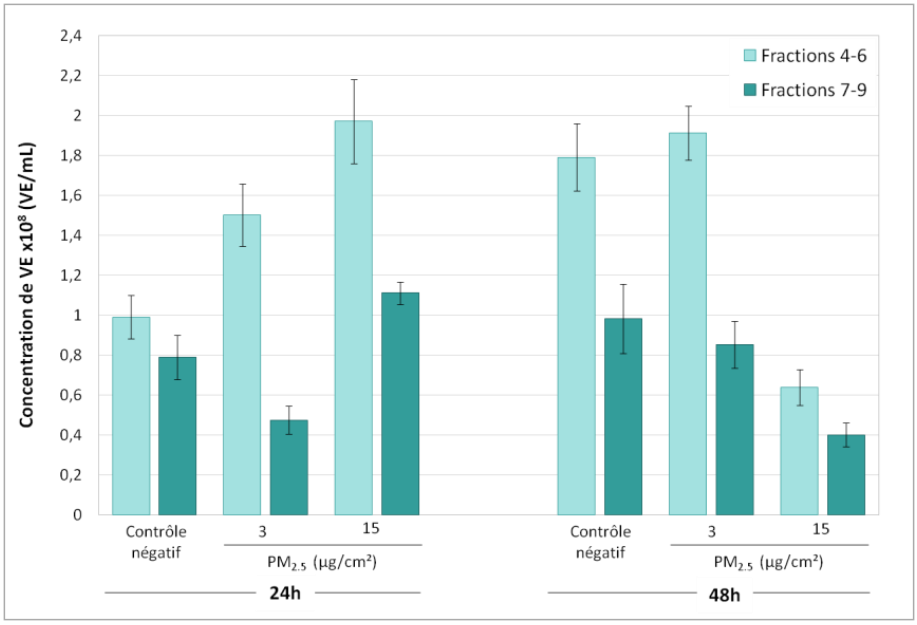


Figure 58: Quantification par NTA des VE isolées par SEC à partir du surnageant des cellules BEAS-2B exposées aux $PM_{2.5}$.

Les cellules BEAS-2B ont été exposées ou non (contrôle négatif) à 3 et 15 µg/cm² de $PM_{2.5}$ pendant 24 et 48h. En utilisant la méthode SEC, les VE ont été isolées du surnageant des cellules exposées et quantifiées par Nanosight particle tracking analysis (NTA).

En absence d'exposition, les cellules secrètent une quantité importante de VE dont la concentration est de $0.99x10^8$ VE/mL à 24h dans la fraction 4-6. Cette sécrétion augmente d'un facteur de 2, correspondant à une concentration de $1.97x10^8$ VE/mL après 24h d'exposition des cellules à 15 µg/cm^2 de $PM_{2.5}$, comparée au témoin négatif. Ce type de résultat a déjà été montré par Bonzini et al., dans le sang de 51 volontaires exposés aux $PM_{2.5}$ et par Pergoli et al., lors de leurs travaux sur les EV libérées par des macrophages et des plaquettes dans les sang des personnes obèses en réponse à l'exposition aux $PM_{2.5}$ (Bonzini et al., 2017; Pergoli et al., 2017). Un profil d'induction différent a été observé à 48h. En effet, l'effet stimulateur de la sécrétion des VE par les $PM_{2.5}$ n'est pas détecté. En revanche, l'exposition des cellules à 15 µg/cm^2 $PM_{2.5}$ a provoqué une diminution de la sécrétion des VE ($0.637x10^8$ VE/mL), comparé au contrôle négatif ($1.79x10^8$ VE/mL). A noter que le nombre de VE isolées dans les fractions 7-9 est plus faible dans toutes les conditions, comparé à celui dans les fractions 4-6, conformément aux lignes directrices de la méthode d'isolement employée (Van Deun et al., 2014).

Ensuite, la pureté des fractions des VE isolées a été vérifiée par la détection des marqueurs protéiques spécifique de VE, mentionnés précédemment dans la partie A de ce

chapitre. Les bandes claires et nettes d'Alix et de CD9, ont été observées uniquement dans les fractions 4-6, tandis que le marqueur de contamination Ago2 n'est pas détecté dans ces fractions (**Figure 59**). Ce résultat suggère que la fraction 4-6 contient une grande quantité de VE pures dépourvues de protéines contaminantes. Quant aux fractions 7-9, l'absence d'Alix et de CD9 et la détection d'Ago2 confirment la contamination de la faible quantité de VE isolées dans ces fractions.

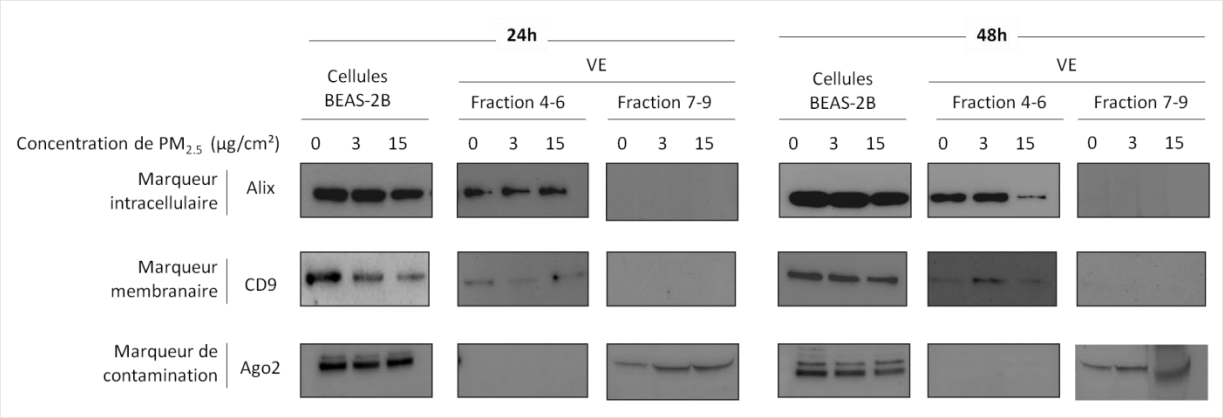


Figure 59: Caractérisation par western blot des VE isolées par SEC à partir du surnageant des cellules BEAS-2B exposées aux $PM_{2.5}$.
Après exposition des cellules BEAS-2B à 3 et 15 µg/cm² de $PM_{2.5}$ pendant 24 et 48h, les VE isolées ont été caractérisées par western blot en détectant la présence des marqueurs spécifiques : Alix (*ALG-2 interacting protein X*, marqueurs intracellulaire*)*, CD9 (marqueurs membranaire) et Ago2 *(Argonaute 2*, marqueur de contamination).

Pour conclure, afin de se placer dans des conditions d'exposition qui assurent une production maximale de VE sans entrainer une réponse toxique importante, notre choix s'est porté sur une exposition à la concentration 15 µg/cm² de $PM_{2.5}$ durant 24h. Ces conditions d'exposition ont donc été utilisées afin d'évaluer d'une part l'influence des fractions dans la toxicité particulaire et d'autre part l'importance des voies de signalisation dans la sécrétion des VE.

2. Détermination de l'influence de la fraction chimique des $PM_{2.5}$ dans la sécrétion des VE

L'un des objectifs de ces travaux de thèse était d'observer l'effet d'une exposition aux particules fines et à leurs extraits sur la libération des VE. Pour cela, les cellules BEAS-2B ont été cultivées dans des flasques des 150 cm² (T150), à raison de 14 millions de cellules et 100 mL de surnageant par condition, puis exposées à 15 µg/cm² de $PM_{2.5}$ ou 15 µg PM eq/cm² de

EO et EH pendant 24h. Tout d'abord, nous avons caractérisé les VE isolées par SEC en termes de quantité et de taille. L'analyse au NTA montre que les VE ont un diamètre moyen variant entre 170 et 210 nm et que les populations de VE contenues dans les fractions 4-6 sont plus homogènes en termes de taille que celles des fractions 7-9.

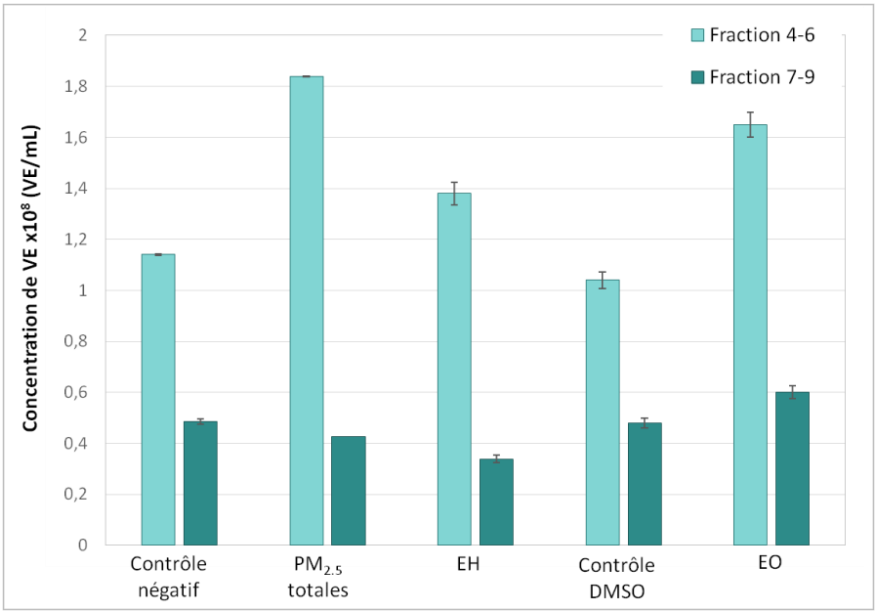


Figure 60: Quantification par NTA des VE isolées par SEC à partir du surnageant des cellules BEAS-2B exposées aux $PM_{2.5}$ et à leurs extraits.
Les cellules BEAS-2B ont été exposées à 15 µg/cm² de $PM_{2.5}$ ou de leurs extraits organique (EO) et hydrosoluble (EH) pendant 24h. Des cellules non exposées ont été utilisées comme contrôle négatif aux $PM_{2.5}$ et EH, tandis que des cellules exposées au DMSO représentent le contrôle négatif à l'exposition à l'EO. En utilisant la méthode SEC, les VE ont été isolées du surnageant des cellules exposées et quantifiées par Nanosight particle tracking analysis (NTA).

Il est tout d'abord évident que les fractions 4-6 contiennent une quantité de VE plus élevées que celle des fractions 7-9, quelles que soient les conditions d'exposition (**Figure 60**). Nous n'avons pas détecté de différence entre la concentration de VE secrétées suite à l'exposition des cellules BEAS-2B au DMSO, qui constitue le contrôle négatif de l'exposition à l'EO, et celle du contrôle négatif des $PM_{2.5}$ et de l'EH. Ce résultat nous a permis de comparer les quantités de VE libérées après exposition à l'EO à celle libérées après exposition aux $PM_{2.5}$ et leur EH afin de pouvoir statuer le rôle joué par chaque fraction de PM dans ce mécanisme.

En termes d'impact des $PM_{2.5}$ et de leurs extraits sur la quantité de VE sécrétées, une évidente augmentation de la production de VE a été constatée après exposition des cellules BEAS-2B à 15 µg/cm² de $PM_{2.5}$ comparée aux cellules non exposées, confirmant que l'exposition à ces particules est capable de stimuler la sécrétion de VE. En outre, les EO et EH

de ces particules augmentent la sécrétion de VE par rapport à leurs contrôles négatifs. Toutefois, cette augmentation est inférieure à celle provoquée par les $PM_{2.5}$. Plus précisément, les $PM_{2.5}$ provoquent une augmentation de 70% de la sécrétion des VE, tandis que les EO et EH n'augmentent celle-ci que de 40% et de 20% respectivement, comparé aux contrôles négatifs.

Afin d'approfondir ce résultat, les VE isolées suite à ces différentes conditions d'exposition ont été caractérisées en termes de marqueurs protéiques spécifiques pour les VE (**Figure 61**). La détection du marqueur intracellulaire Alix et du marqueur membranaire CD9 uniquement dans les fractions 4-6 et l'absence du marqueur de contamination Ago2 dans cette fraction confirment l'isolement de la grande quantité de VE pures par SEC. Dans les fractions 7-9, les 2 marqueurs Alix et CD9 ne sont pas détectés. Seules des bandes intenses d'Ago2 sont observés dans cette fraction. Ce résultat confirme non seulement l'efficacité de l'isolement de VE par SEC mais aussi l'exactitude du résultat du comptage obtenu par NTA.

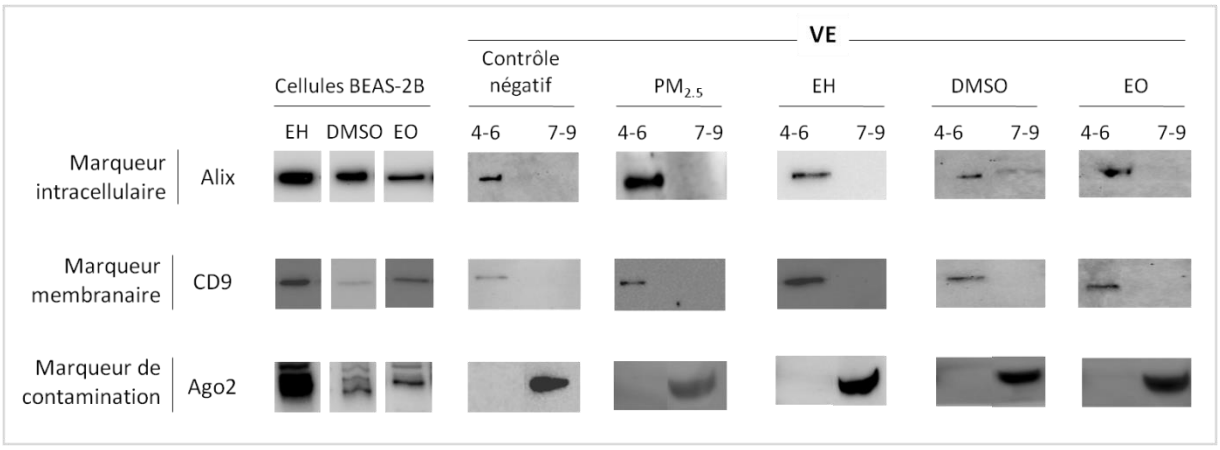


Figure 61: Caractérisation par western blot des VE isolées par SEC à partir du surnageant des cellules BEAS-2B exposées aux $PM_{2.5}$ et à leurs extraits.
Après exposition des cellules BEAS-2B à 15 µg/cm² de $PM_{2.5}$ et de leurs extraits organique (EO) et hydrosoluble (EH) pendant 24h, la présence des marqueurs spécifiques de VE comme Alix (*ALG-2 interacting protein X*, marqueurs intracellulaire*)*, CD9 (marqueurs membranaire) et Ago2 *(Argonaute 2*, marqueur de contamination) a été détectée par western blot. Les cellules non exposées représentent le témoin négatif pour l'exposition aux $PM_{2.5}$ et leurs EH. Les cellules exposées au DMSO sont utilisées comme contrôle négatif pour celles exposées à l'EO.

Les VE sont des effecteurs biologiques puissants, mais les études sur la stimulation de la libération des VE sont peu nombreuses (Conrad et al., 2020). Quelques études ont mis en évidence que la libération de VE est positivement associée à l'exposition aux PM (Neri et al., 2016; Stassen et al., 2019). Cependant, l'effet de chaque fraction de $PM_{2.5}$ sur cette sécrétion n'est pas décrit jusqu'à présent dans la littérature. A la lumière de nos résultats, la fraction

organique suivie de la fraction hydrosoluble déclenchent la libération de VE, suggérant un rôle notable de ces deux fractions. Toutefois, le nombre de VE libérées par les cellules exposées aux extraits des particules bien qu'augmenté par rapport aux cellules non exposées, reste inférieur à celui causé par l'exposition aux $PM_{2.5}$. Ce résultat montre que si chacune des fractions est susceptible d'entrainer la sécrétion de VE, la combinaison des deux fractions au sein des $PM_{2.5}$ s'avère encore plus génératrice de VE.

Des interactions entre les composés chimiques ou biologiques des particules ou au niveau des mécanismes d'action pourraient ainsi survenir et expliquer cette augmentation. À l'heure actuelle, les divers mécanismes qui interviennent dans la stimulation de la sécrétion des VE par les cellules épithéliales pulmonaires exposées aux $PM_{2.5}$, ne sont justement pas entièrement compris. La partie suivante porte sur l'étude de l'implication du stress oxydant et des deux voies de signalisation, TLR4 et AhR, dans l'induction de la sécrétion des VE par les cellules BEAS-2B exposées aux $PM_{2.5}$.

3. Voies de signalisation impliquées dans la sécrétion des VE

Dans le cadre de ma thèse, nous nous sommes également intéressés à l'identification des voies de signalisation impliquées dans la libération des VE induites par les $PM_{2.5}$. Pour cela, les cellules BEAS-2B ont été cultivées dans des flasques de 150 cm^2 (4 flasques/condition), pré-traitées avec les concentrations optimales d'inhibition de chaque inhibiteur séparément, pendant 1h, puis exposées ou non à 15 µg/cm^2 de $PM_{2.5}$. Les conditions d'exposition étaient les suivantes:

- cellules non exposées aux $PM_{2.5}$;
- cellules exposées à 15 µg/cm^2 de $PM_{2.5}$;
- cellules pré-traitées par 10 mM de NAC ;
- cellules pré-traitées par 10 mM de NAC puis exposées aux $PM_{2.5}$ (15 µg/cm^2) ;
- cellules pré-traitées par 1 µM de TAK-242 ;
- cellules pré-traitées par 1 µM de TAK-242 puis exposées aux $PM_{2.5}$ (15 µg/cm^2) ;
- cellules pré-traitées par 10 µM de CH223191 ;
- cellules pré-traitées par 10 µM de CH223191 puis exposées aux $PM_{2.5}$ (15 µg/cm^2).

Après 24h d'exposition, les surnageants des cellules ont été récupérés et regroupés par condition afin de maximiser le nombre de VE et de mettre en œuvre le protocole d'isolement. Nous avons donc obtenu 8 échantillons desquels nous avons isolé les VE.

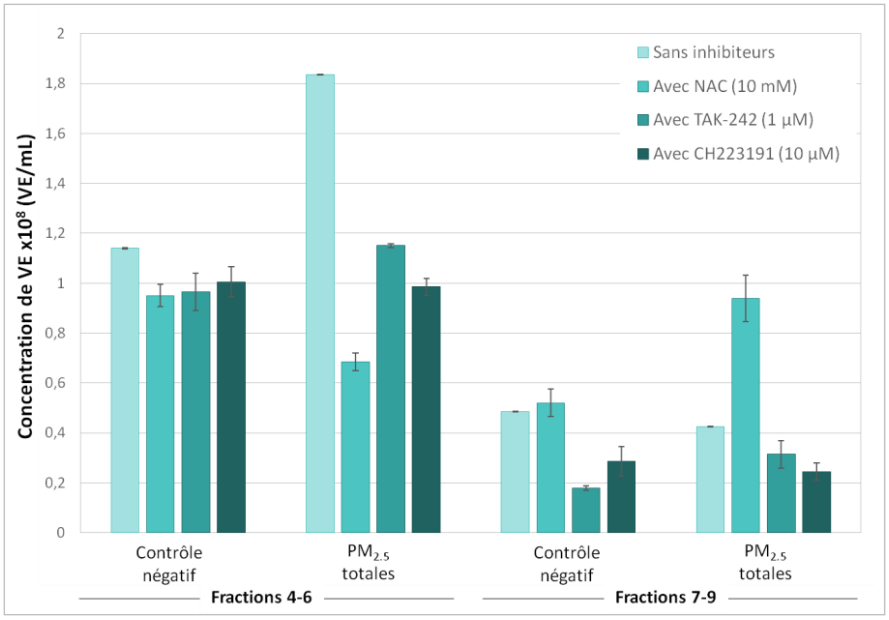


Figure 62: Quantification par NTA des VE isolées par SEC à partir du surnageant des cellules BEAS-2B prétraitées ou non par les 3 inhibiteurs puis exposées ou non aux $PM_{2.5}$.
Les cellules BEAS-2B ont été prétraitées séparément par les 3 inhibiteurs, puis exposées ou non à 15 µg/cm² de $PM_{2.5}$ pendant 24h. Les VE ont été isolées par SEC et quantifiées par la technique Nanosight particle tracking analysis (NTA). Des cellules traitées ou non par les inhibiteurs et non exposées aux $PM_{2.5}$ sont utilisées comme contrôle négatif.

Les VE obtenues ont été quantifiées par NTA (**Figure 62**). Nous avons ainsi observé que nos échantillons sont composés de VE ayant une taille moyenne estimée entre 163 et 170 nm dans les fractions 4-6. Les fractions 7-9 contiennent des populations de VE plus hétérogènes ayant une taille comprise entre 165 et 210 nm. Tout d'abord, nous n'avons pas observé de variation de la libération de VE après traitement des cellules par les trois inhibiteurs, comparativement aux cellules non traitées. En revanche, les mesures révèlent toujours que le stimulus provoqué par l'exposition aux particules, entraine la libération de VE ($1,84x10^8$ VE/mL) suite à l'activation de différentes voies de signalisation. Concernant le stress oxydant, le traitement des cellules par 10 mM de la NAC a diminué d'un facteur de 2.7 la quantité de VE sécrétées par les cellules stimulées par 15 µg/cm² de $PM_{2.5}$ ($6.85x10^7$ VE/mL). Ce résultat souligne un rôle critique et très important du stress oxydant causé par les PM dans l'induction de la libération des VE. Les analyses ont ensuite été poursuivies par la quantification du nombre de VE sécrétées suite à l'inhibition du TLR4 et à l'exposition aux $PM_{2.5}$. Nous avons détecté une diminution de la libération des VE dans le surnageant des cellules exposées aux particules dont la voie TLR4 est inhibée. Dans ces conditions, la quantité de VE sécrétées ($1.15x10^8$ VE/mL) est comparable à celle de leur témoin négatif sans PM, ce qui suggère que le TLR4 participe également au déclenchement de la libération de VE suite à l'exposition aux particules.

En outre, la quantification des VE sécrétées après inhibition de la vie AhR en présence des particules a montré également que l'inhibition de la voie AhR réduit environ à moitié la quantité de VE secrétées ($0.985x10^8$ VE/mL) dans le surnageant des cellules exposées aux $PM_{2.5}$, comparativement à celle retrouvée dans le surnageant des cellules exposées aux $PM_{2.5}$ sans inhibiteurs.

Pour résumer, les trois voies de signalisation activées par les $PM_{2.5}$ contribuent, d'une manière plus ou moins importante, à la libération des VE. Plusieurs études toxicologiques *in vitro* ont montré que le stress oxydant est identifié comme un mécanisme déclencheur de la sécrétion des VE par les cellules exposées (Benedikter et al., 2017), alors que le rôles des voies TLR4 et AhR n'étaient pour le moment pas évidents.

De manière à compléter l'analyse des VE, les trois marqueurs protéiques Alix, CD9 et Ago2, ont été analysés par western blot (**Figure 63**). Les deux protéines spécifiques de VE, Alix et CD9, sont présentes dans les échantillons de VE libérées par les BEAS-2B exposés aux $PM_{2.5}$ déjà prétraitées par les trois inhibiteurs ainsi que dans les VE libérées par les cellules témoins, révélant la présence de VE dans les fractions 4-6 des échantillons. En revanche, ces deux marqueurs ne sont pas détectés dans les fractions 7-9. Quant à Ago2, sa présence a été uniquement détectée dans la fraction 7-9 de chaque échantillon. L'analyse par western blot rejoint la quantification au NTA et confirme l'isolement d'un grand nombre de VE dans les fractions 4-6 des différentes conditions d'exposition étudiées.

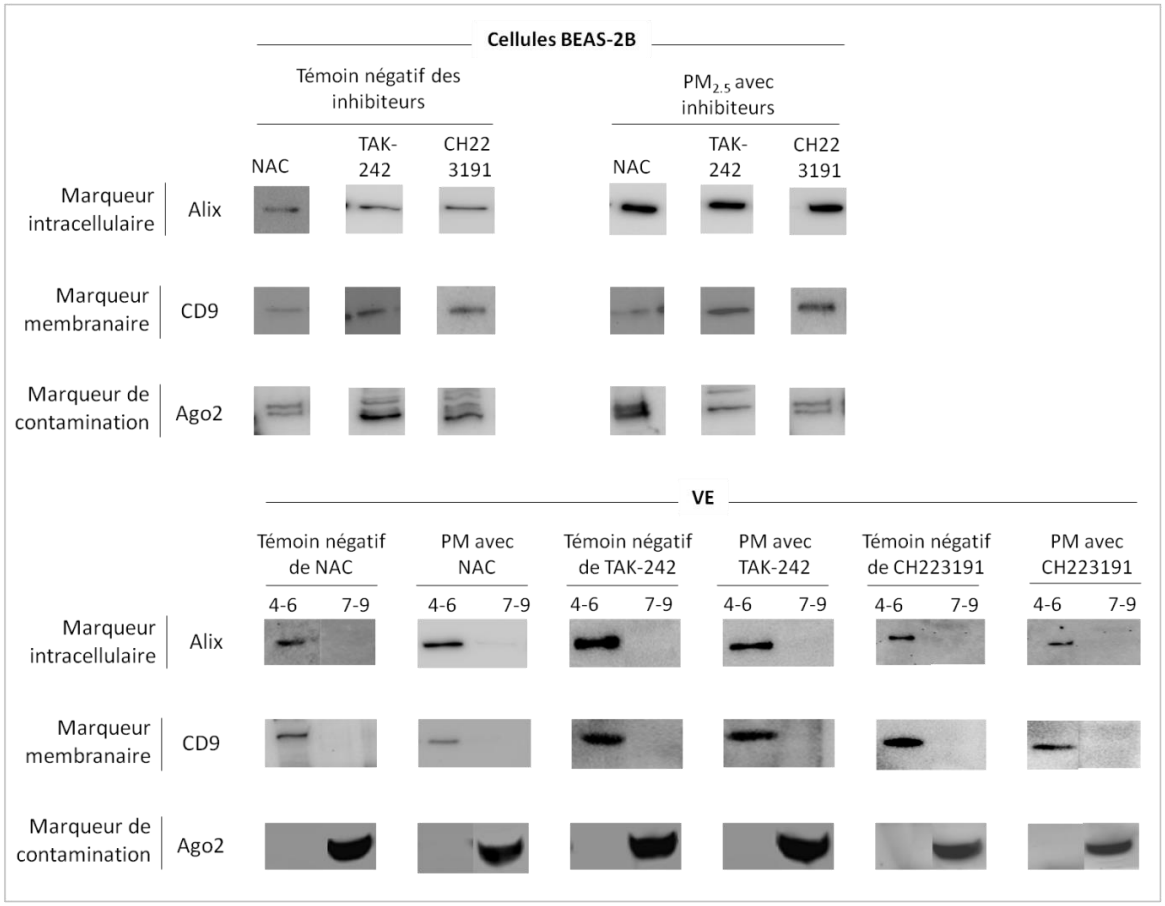


Figure 63: Caractérisation par western blot des VE isolées par SEC à partir du surnageant des cellules BEAS-2B traitées par les inhibiteurs et exposées ou non aux $PM_{2.5}$.

Les cellules BEAS-2B ont été prétraitées séparément par les 3 inhibiteurs, puis exposées ou non à 15 µg/cm² de $PM_{2.5}$ pendant 24h. Les VE isolées ont été caractérisées en termes de protéines spécifiques de VE par western blot : Alix (*ALG-2 interacting protein X*, marqueurs intracellulaire*)*, CD9 (marqueurs membranaire) et Ago2 *(Argonaute 2*, marqueur de contamination).

Ces différentes analyses permettent de confirmer que l'exposition aux $PM_{2.5}$ entraine une libération plus importante de VE *via* l'activation de ces trois mécanismes toxiques, avec une contribution très importante pour le stress oxydant.

4. Discussion

De nombreuses enquêtes épidémiologiques ont montré que l'exposition à court terme à la pollution atmosphérique par les particules fines est associée à une augmentation de la morbidité et de la mortalité, principalement due aux maladies pulmonaires et cardiovasculaires (Atkinson et al., 2014; Jo et al., 2018; Pope et al., 2020). Les particules atmosphériques déclenchent un stress oxydant pulmonaire et des réponses inflammatoires qui conduisent à la libération de signaux moléculaires dans le système circulatoire (Bollati et al., 2015). Déterminer l'identité de ces signaux qui relient l'inhalation de particules à la réponse cellulaire

et à l'augmentation du risque de maladies pulmonaires a été considéré comme un objectif hautement prioritaire dans notre étude.

Les VE sont de plus en plus considérées comme un lien plausible entre les PM et les maladies pulmonaires et cardiovasculaires associées. Les VE suscitent un intérêt croissant lié à leur capacité à transférer du contenu biologique entre cellules d'une part et à servir de réservoir à de potentiels biomarqueurs d'effet ou de sensibilité. Sécrétées par des cellules dans des conditions de stress, telles que l'exposition aux polluants atmosphériques, ces vésicules peuvent encapsuler un large répertoire de protéines et d'acides nucléiques pouvant être transmis aux cellules receveuses, contribuant à la modification de leur phénotype et pouvant aboutir au développement de maladies respiratoires et cardiovasculaires (Alkoussa et al., 2020; Neri et al., 2016). Des preuves de plus en plus nombreuses suggèrent ainsi que les VE jouent un rôle dans le développement des maladies pulmonaires (Lanyu and Feilong, 2019; O'Farrell and Yang, 2019; Wahlund et al., 2017). Le nombre et les types de VE libérées sont différents selon l'état physiopathologique. À ce jour, les études se sont concentrées sur la libération ou les changements de profil en réponse à l'exposition aux particules en suspension dans l'air. Cependant, aucune étude ne s'est intéressée à l'identification des mécanismes moléculaires qui sous-tendent la sécrétion des VE par les cellules exposées aux $PM_{2.5}$.

L'un des objectifs de ces travaux de thèse était d'identifier, pour la première fois, les fractions et les voies de signalisation toxiques induites par les $PM_{2.5}$ qui stimulent la libération de VE par les cellules BEAS-2B en réponse à l'exposition à ce polluant. Puisque cette étude est inédite, il était très important dans un premier temps d'optimiser le protocole d'isolement des VE à partir du surnageant des cellules mises en culture, afin d'obtenir des fractions de VE pures dépourvues de contaminants protéiques. Les surnageants ont été soumis à une centrifugation suivie d'une série de filtrations et de concentrations. A partir de 100 mL de surnageant par condition de culture, nous avons obtenu 2 mL de CCM, contenant des VE qui ont ensuite été isolées par la technique SEC sur des colonnes de sépharose, tout en respectant les lignes directrices validées au niveau international. Séparer les contaminants solubles des VE par les colonnes SEC, où les VE sont éluées dans les premières fractions, tandis que les protéines et les ribonucléoprotéines et certaines lipoprotéines sont éluées plus tard, est la méthode appropriée pour la purification des VE à partir d'une préparation concentrée obtenue par centrifugation ou par concentration (Théry et al., 2018).

Si l'on se penche sur les différentes conditions d'exposition aux $PM_{2.5}$ (durée et dose), nous pouvons observer une induction précoce dose-dépendante de la sécrétion de VE rapidement après 24h d'exposition. Ce profil d'induction n'est pas observé après 48h. Ce résultat est partiellement en accord avec ce qui a été publié dans la littérature (Bonzini et al., 2017; Martin et al., 2019b; Neri et al., 2016; Stassen et al., 2019). Tout d'abord, nous avons mis en évidence encore une fois que les particules fines induisent la libération de VE par les cellules BEAS-2B exposées. Bonzini et al., ont montré que l'exposition pendant 24h aux PM a entraîné une augmentation de la libération des VE par les cellules endothéliales (Bonzini et al., 2017). En revanche, d'autres études comme celles réalisé par Martin et al., ont mis en évidence que la sécrétion de VE par les macrophages exposés aux PM augmente avec le temps pour atteindre un maximum après 48h (Martin et al., 2019b). Il est possible que le type cellulaire influence la cinétique de production et de sécrétion des VE.

A l'issue de ces tests et après analyse des résultats, nous avons choisi d'exposer les cellules BEAS-2B à 15 µg/cm² de $PM_{2.5}$ pendant 24h, afin d'obtenir une sécrétion maximale de VE pour comprendre d'une part l'impact des fractions chimiques des $PM_{2.5}$ et d'autre part le rôle des voies de signalisation impliquées dans la toxicité des $PM_{2.5}$, dans la sécrétion des VE.

4.1. Fractions des $PM_{2.5}$ impliquées dans la libération des VE

Les cellules exposées à l'EH secrètent une quantité plus importante de VE que les cellules non exposées. Cependant, cette quantité est moindre que celle sécrétée suite à l'exposition des cellules BEAS-2B à l'EO et aux $PM_{2.5}$. Jusqu'à présent, l'effet de l'exposition des cellules BEAS-2B aux ions et aux métaux sur la sécrétion des VE n'est pas décrit dans la littérature. Cependant, quelques études ont récemment mis en évidence le rôle des HAP dans la stimulation de la sécrétion de VE (Le Goff et al., 2019; van Meteren et al., 2019). Leurs résultats montrent que l'exposition aux HAP entraine une altération de la fluidité membranaire et une diminution significative du cholestérol cellulaire total dans les hépatocytes primaires de rat et la lignée cellulaire WIF-B9 (van Meteren et al., 2019). Cette déplétion en cholestérol dépendant des HAP est impliquée dans la libération des VE par les hépatocytes ainsi que par d'autres types de cellules. Concernant l'impact des $PM_{2.5}$ sur la sécrétion des VE, celui-ci est décrit dans des populations humaines exposées (Bollati et al., 2015; Pavanello et al., 2016; Rodosthenous et al., 2015; Rota et al., 2020). L'étude de Bonzini et al., a également mis en évidence que la

libération de VE est associée à l'exposition à court terme aux particules et que les sujets en surpoids sont potentiellement plus susceptibles de libérer des VE en réponse à cette exposition (Bonzini et al., 2017). Ces résultats obtenus chez l'homme ont été confortés par une étude *in vitro* réalisée par Stassen et al., qui a montré que l'exposition des cellules épithéliales pulmonaires aux PM_{10} et aux $PM_{2.5}$ augmente également la libération de VE $CD63^+CD81^+$ (Stassen et al., 2019).

Il a été démontré que les métaux et les PM riches en métaux peuvent produire un stress oxydant dans les systèmes *in vitro* et *in vivo*, et nous avons mis en évidence, dans le chapitre précédent, une forte augmentation des marqueurs de stress oxydant associés à l'exposition à des niveaux élevés d'EH des $PM_{2.5}$. Ceci peut être à l'origine de l'augmentation de la sécrétion des VE suite à l'exposition aux EH. De plus, les propriétés oxydantes des HAP sont largement décrites dans la littérature et, selon nos résultats, la concentration la plus élevée d'EO a causé une surproduction des ROS par les cellules BEAS-2B, ce qui explique l'augmentation de la sécrétion des VE en réponse à cette exposition.

Nous avons observé des profils d'induction de VE différents suite à l'exposition aux $PM_{2.5}$ et à leurs extraits, ce qui suggère d'une part une contribution importante de la composition des polluants dans la sécrétion des VE par les cellules exposées et d'autre part une additivité des mécanismes puisque l'exposition aux $PM_{2.5}$ est celle qui provoque la sécrétion la plus importante des trois conditions d'exposition.

4.2. Mécanismes de toxicité induits par les $PM_{2.5}$ impliquées dans la libération des VE

Il est connu que l'exposition aux $PM_{2.5}$ induit un stress oxydant et une inflammation importante *via* la voie TLR4, et entraine également la mise en place de réactions de métabolisation des xénobiotiques induites par l'AhR afin d'éliminer les constituants des $PM_{2.5}$. En revanche, l'implication de ces trois mécanismes de toxicité dans l'induction de la sécrétion des VE en réponse à l'exposition aux $PM_{2.5}$ n'est pas décrite dans la littérature. A notre connaissance, seule une étude menée par Neri et al., a montré que les PM induisent une augmentation précoce (1 h) de la génération des VE par deux types de cellules (HUVEC et PBMC) d'une manière dépendante du taux de calcium intracellulaire, ce qui représente un

mécanisme par lequel les PM stimulent la sécrétion des VE. Selon cette étude, les PM augmentent la concentration de calcium intracellulaire et l'inhibition de la phospholipase C, un canal du calcium, réduit la sécrétion de VE. Ces VE expriment un facteur tissulaire fonctionnel et sont impliquées dans l'augmentation du risque de maladies cardiovasculaires (Neri et al., 2016).

Nos données issues des analyses NTA ont mis en évidence que la sécrétion des VE par les cellules BEAS-2B après 24h d'exposition aux $PM_{2.5}$ a été contrecarrée par la co-incubation avec la NAC, un antioxydant, confirmant le lien entre le stress oxydant induit par les $PM_{2.5}$ et la sécrétion des VE. Conformément à notre étude, d'autre travaux menés dans des lignées cellulaires ont démontré que différents stimuli pro-oxydants augmentent la quantité de VE libérées, y compris les MV ou les exosomes (Benedikter et al., 2017; van Meteren et al., 2020). Par exemple, Atienzar-Aroca et al., ont montré que des conditions de stress oxydant induites par une exposition à l'éthanol provoquaient la libération d'exosomes par les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (Atienzar-Aroca et al., 2016). De même, les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien humain RPE-1 traitées avec la doxorubicine, un inducteur de ROS, ont libéré une plus grande quantité de VE, par rapport aux cellules non traitées (Takasugi et al., 2017). Le stress oxydant induit par l'ionophore de calcium A23187 a stimulé l'excrétion de VE dans HEK293 (Manček-Keber et al., 2015). L'effet du stress oxydant sur la libération des VE semble dépendre du type de cellule et du stimulus. Par exemple, l'exposition cellulaire au 4-HNE augmente la libération de VE-TF^+ (exprimant le facteur tissulaire) par les cellules endothéliales et les fibroblastes, mais pas par les monocytes (Vatsyayan et al., 2013). Les extraits de fumée de cigarette (CSE) et l'acroléine ont induit la libération de VE par les cellules BEAS-2B, alors que H_2O_2 n'a montré aucun effet. De manière cohérente, les antioxydants NAC et GSH ont réduit la libération de VE induite par le CSE (Benedikter et al., 2018a, 2017).

On peut conclure que le stress oxydant est l'un des mécanismes par lesquels les $PM_{2.5}$ stimulent la sécrétion des VE. Ces données appuient le fait que la sécrétion de VE augmente suite à l'exposition aux $PM_{2.5}$ et leurs extraits qui sont tous dotés des propriétés pro-oxydantes, comme démontré dans le chapitre précédent.

Jusqu'à présent, le lien entre le caractère pro-inflammatoire des $PM_{2.5}$ et la sécrétion de VE n'est pas étudié dans la littérature. Nous avons précédemment mis en évidence l'implication du TLR4 non seulement dans la régulation de la réponse pro-inflammatoire mais

aussi dans le renforcement de la cytotoxicité des $PM_{2.5}$ *via* son interaction avec d'autres voies de signalisation. En revanche, le rôle de cette voie dans la libération des VE par les cellules BEAS-2B exposées aux $PM_{2.5}$ n'est pas connu. Nous avons montré que l'inhibition de la transduction du signal pro-inflammatoire par le TLR4 réduit la sécrétion des VE et atténue l'effet stimulateur des $PM_{2.5}$, suggérant un rôle critique de la voie TLR4 dans ce mécanisme. Plusieurs études ont démontré qu'à la suite de différents stimuli pro-inflammatoires, les cellules sont capables d'augmenter leur sécrétion de VE. Nos résultats sont cohérents au vu des études qui montrent qu'un microenvironnement pro-inflammatoire déclenche la libération des VE. Par exemple, un plus grand nombre de VE et des changements dans leur contenu ont été observés chez des macrophages stimulés par le LPS (Z.-G. Li et al., 2018; McDonald et al., 2014). Signalons également qu'Ibáñez et al., ont récemment démontré que l'éthanol induit une inflammation en activant le TLR4 des astrocytes, augmente le nombre de VE sécrétées et modifie leur contenu en altérant certains miARN (mir-146a, mir-182 et mir-200b) et en augmentant les niveaux de protéines liées à l'inflammation (TLR4, NFκB-p65, IL-1R, caspase-1, NLRP3) (Ibáñez et al., 2019). Les VE enrichies en ce type de protéines peuvent modifier le phénotype des cellules réceptrices et agissent comme des transmetteurs cellulaires de la signalisation de l'inflammation en propageant et en amplifiant la réponse inflammatoire.

Le TLR4 étant impliqué dans plusieurs mécanismes de toxicité des $PM_{2.5}$, notamment l'inflammation et le stress oxydant, il semble évident qu'il joue un rôle non négligeable, voire crucial dans la sécrétion de VE suite à l'exposition des cellules BEAS-2B aux $PM_{2.5}$.

Les $PM_{2.5}$ utilisés dans notre étude contiennent un taux élevé de HAP ayant des affinités diverses envers l'AhR. De plus, nous avons mis en évidence dans les cellules BEAS-2B exposées aux $PM_{2.5}$, l'interaction entre ce récepteur et la voie TLR4 et le stress oxydant. Ces observations nous conduisent à émettre l'hypothèse d'une implication de l'AhR dans l'augmentation de la production de VE par les cellules BEAS-2B lors d'une exposition aux $PM_{2.5}$. Nos résultats ont montré que le traitement des cellules BEAS-2B par 10 µM de CH223191, un antagoniste spécifique de l'AhR, réduit la sécrétion des VE après exposition aux $PM_{2.5}$. Quelques études menées dans d'autres modèles cellulaires sont en accord avec nos données qui suggèrent un lien entre l'exposition au $PM_{2.5}$ et l'induction de la sécrétion de VE dépendante de l'AhR et des HAP. A titre d'exemple, van Meteren et ses collaborateurs ont mis en évidence d'une part la capacité des HAP ayant une forte affinité pour l'AhR à induire la sécrétion des VE par des hépatocytes, et d'autre part que le traitement de ces cellules par le

CH223191 et l'α-Naphtoflavone (antagonistes de l'AhR), augmente la fluidité membranaire et réduit la sécrétion de VE par les cellules traitées aux HAP (van Meteren et al., 2019). En outre, le Goff et al., ont également mis en évidence que la capacité des HAP à augmenter les niveaux d'ARNm de CYP1A1 coïncide avec leur capacité à augmenter la production de VE par les cellules HMEC-1 (Le Goff et al., 2019).

Dans le chapitre précedent, nous avions souligné la capacité de l'AhR à induire un stress oxydant et à interagir avec le TLR4 pour renforcer les effets toxiques des $PM_{2.5}$. Il semble que les propriétés pro-inflammatoires et pro-oxydantes de ce récepteur font de la voie AhR un mécanisme clé par lequel les $PM_{2.5}$ stimulent la libération des VE par les cellules BEAS-2B.

5. Conclusion

Les $PM_{2.5}$ sont constituées d'un mélange hétérogène de composés chimiques et biologiques, capables d'activer diverses voies de signalisation toxiques dans des modèles *in vitro, in vivo* et chez les êtres humains et de causer des maladies respiratoires et cardiovasculaires. Les VE sont des structures membranaires de taille nanométriques, libérées par tout type de cellule et caractérisées par leur contenu riche en protéines, lipides et acides nucléiques. Puisque ces VE sont également capables de modifier le phénotype de la cellule receveuse et d'induire des maladies respiratoires, et puisqu'il existe une association entre l'exposition aux $PM_{2.5}$ et l'augmentation de la sécrétion des VE, ce chapitre a porté sur l'identification des fractions de $PM_{2.5}$ et des voies de signalisation toxiques, activées par les $PM_{2.5}$, impliquées dans l'induction de la sécrétion des VE.

Pour cela, le protocole d'isolement des VE à partir du surnageant des cellules BEAS-2B exposées aux $PM_{2.5}$ a été optimisé. Plusieurs protocoles ont été testés afin de choisir de mettre en œuvre la chromatographie d'exclusion de taille qui a permis d'obtenir un grand nombre de VE et des fractions les plus pures possibles à partir de nos échantillons, ce qui a été confirmé par les analyses par NTA et western blot.

Une fois le protocole d'isolement des VE validé, il fallait déterminer les conditions d'exposition aux $PM_{2.5}$ induisaient une plus grande quantité de VE. Deux doses (3 et 15 $\mu g/cm^2$) et deux temps d'exposition (24 et 48h) des cellules BEAS-2B aux $PM_{2.5}$ ont été mis en œuvre avant d'isoler les VE libérées en réponse. A la lumière des résultats obtenus par NTA et western blot, l'exposition des cellules BEAS-2B à 15 $\mu g/cm^2$ de $PM_{2.5}$ pendant 24h a été

choisie pour la suite du travail concernant la recherche de l'importance des voies de toxicité et des fractions dans la sécrétion des VE.

Pour la première fois à notre connaissance, l'effet de chaque fraction de $PM_{2.5}$ sur la libération de VE a été étudié. Pour cela, les extraits organique et hydrosoluble des $PM_{2.5}$ étudiées ont été considérés. Selon nos résultats, les métaux et les ions contenus dans notre échantillon de $PM_{2.5}$ stimulent la sécrétion de VE. Cependant cette stimulation est plus faible qu'après exposition à l'extrait organique des $PM_{2.5}$. Cette production a atteint un maximum suite à l'exposition aux $PM_{2.5}$. La composition complexe et hétérogène des particules, que ce soit en composés organiques, inorganiques ou biologiques semblent être le principal déclencheur de la production de VE.

Dans le cadre de ma thèse, nous nous sommes ensuite focalisés sur le rôle des voies de signalisation toxique activées par les $PM_{2.5}$ dans le déclenchement de la libération des VE. Suite à l'inhibition séparée de chaque voie de signalisation par un inhibiteur spécifique et puissant dans les cellules BEAS-2B et leur exposition aux $PM_{2.5}$, la sécrétion de VE est réduite pour atteindre des valeurs proches de celles du témoin négatif. Ces observations nous ont permis de proposer l'implication des trois voies étudiées dans la libération de VE suite à l'exposition des cellules épithéliales bronchiques aux $PM_{2.5}$.

En complément des mécanismes déjà décrits dans la littérature, notre étude a fourni un nouveau lien direct entre le stress oxydant, la voie AhR et la voie TLR4 et la sécrétion des VE. L'augmentation de la production de ROS, des cytokines pro-inflammatoire et l'induction de l'expression génique des enzymes impliquées dans la métabolisation des xénobiotiques sont tous des acteurs clés dans la stimulation de la sécrétion des VE par les cellules BEAS-2B exposées aux $PM_{2.5}$.

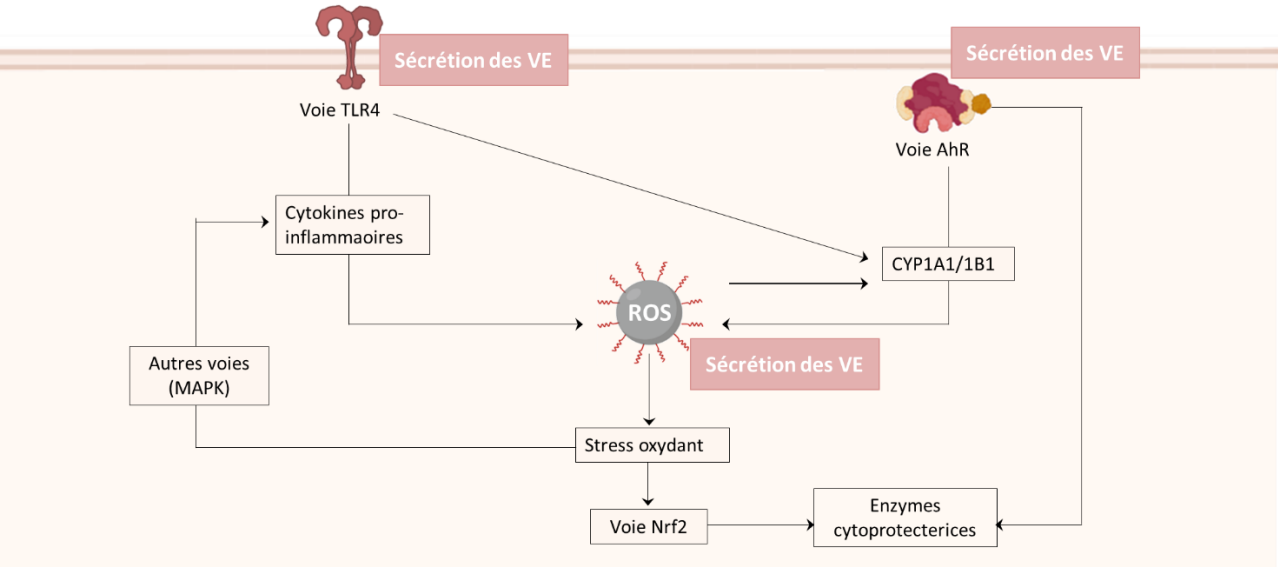


Figure 64: Schéma représentatif des conclusions retirées : Voies de signalisation impliquées dans la sécrétiuon des VE suite à l'exposition des cellules BEAS-2B aux $PM_{2.5}$.

Conclusions générales et perspectives

Conclusions générales et perspectives

Conclusions générales

Dans ce travail consacré à l'étude de la toxicité de la pollution atmosphérique particulaire, nous nous sommes focalisés sur (1) le rôle des $PM_{2.5}$ ainsi que de leurs fractions organique et hydrosoluble dans la toxicité induite par les $PM_{2.5}$, (2) les mécanismes toxicologiques sous-jacents et les interactions entre ces mécanismes et (3) les fractions et les voies de signalisation induites par les $PM_{2.5}$ impliquées dans la sécrétion des VE.

Pour réaliser cette étude, un échantillon de $PM_{2.5}$ collectées à Dunkerque, un site urbano-industriel, a été choisi. En outre, deux extraits, organique et hydrosoluble, de ces $PM_{2.5}$ ont pu être utilisés en tant que fractions principales constituant ces particules. Pour parvenir à atteindre les objectifs de ce projet, nous avons procédé une étude à *in vitro*, en exposant les cellules BEAS-2B à 3 et 15 µg/cm² de $PM_{2.5}$ pendant 24h et/ou 48h en présence des inhibiteurs spécifiques pour le stress oxydant, la voie TLR4 et la voie AhR. La réponse cellulaire en termes de stress oxydant a été suivie par la quantification de la production intracellulaire de ROS, tandis que la réponse inflammatoire a été étudiée en évaluant l'expression génique et la production des cytokines pro-inflammatoires. L'activation métabolique a été examinée par la quantification de l'expression génique des enzymes impliquées dans la métabolisation des xénobiotiques. Quant aux VE, elles ont été isolées par SEC puis caractérisées par différentes techniques comme le nanosight particle tracking analysis et le western blot.

Tout d'abord, nous avons quantifié la production de ROS par les cellules BEAS-2B sous les différentes conditions d'exposition. L'augmentation de la production de ROS en réponse à l'exposition aux $PM_{2.5}$ et leur deux extraits a mis en évidence que toutes les fractions de $PM_{2.5}$ sont dotées de propriétés pro-oxydantes, capables de stimuler la production des ROS. En outre, à l'issue des résultats de la quantification de la production de l'IL-6, nos avons montré que l'EH des $PM_{2.5}$ mais surtout les $PM_{2.5}$ dans leur totalité jouent un rôle important dans la stimulation de la réponse pro-inflammatoire. Nous avons constaté également une divergence entre les propriétés pro-inflammatoires des $PM_{2.5}$ et leurs EO, puisque la sécrétion des cytokines a significativement diminué en réponse à l'exposition aux EO. Quant à l'expression génique du CYP1A1 et les autres enzymes de métabolisation, nos résultats ont montré que les $PM_{2.5}$ et leur EO sont impliqués dans l'activation ce mécanisme d'action. Pour conclure sur cette première partie, la composition complexe des $PM_{2.5}$, en composés chimiques ou

biologiques, est à l'origine de ces effets néfastes sur le système respiratoire. Des contributions différentes on été mesurées pour chaque fraction dans chaque mécanisme de toxicité étudié.

En parallèle, nous avons identifié les mécanismes qui sous-tendent les effets toxiques des $PM_{2.5}$ et les interactions entre ces mécanismes. Nous avons remarqué une diminution de la production des ROS par les cellules exposées aux $PM_{2.5}$ et à leurs extraits suite à l'inhibition des voies AhR et TLR4. Ces observations mettent en évidence le rôle de la voie AhR et de la signalisation en aval (expression génique des enzymes de métabolisation des xénobiotiques), ainsi que de la voie TLR4 et la production des cytokines pro-inflammatoires dans la production des ROS.

D'autre part, nos résultats ont montré que les $PM_{2.5}$ provoquent une production des cytokines pro-inflammatoires, non seulement *via* la voie TLR4, mais aussi suite à l'activation de la voie AhR qui entraine une forte production de ROS. Les ROS sont capables d'activer la voie MAPK, impliquée dans la régulation de la réponse pro-inflammatoire. Ces résultats soulignent une interaction AhR-ROS-MAPK jouant un rôle clé dans la réponse inflammatoire induite après exposition des cellules BEAS-2B aux $PM_{2.5}$.

Concernant l'expression génique des enzymes de métabolisation des xénobiotiques, l'inhibition de la voie AhR, mais aussi de la voie TLR4 et du stress oxydant a entrainé une diminution de l'expression génique du CYP1A1, suggérant deux interactions possibles : AhR-TLR4 et AhR-ROS. L'expression génique de la GSTM1 a été significativement induite uniquement après exposition aux EO des $PM_{2.5}$, montrant ainsi une activation de la voie Nrf2 cytoprotectrice. Ceci peut expliquer le fait que la production des cytokines pro-inflammatoires diminue suite à l'exposition aux EO des $PM_{2.5}$. Nos résultats ont également mis en évidence une interaction entre les voies AhR, TLR4 et Nrf2 qui se traduit par une diminution de l'expression génique de la GSTM1 après inhibition de la voie AhR et TLR4.

L'un des points originaux de ce projet est d'identifier les fractions et les voies de signalisation impliquées dans la stimulation de la libération des VE après exposition des cellules BEAS-2B aux $PM_{2.5}$. Nous avons ainsi quantifié les VE produites par les cellules BEAS-2B en réponse à leur exposition aux $PM_{2.5}$ et à leurs EO et EH. Une nette induction de la sécrétion des VE a été observée après exposition aux $PM_{2.5}$. Celle-ci a été plus importante qu'après exposition aux EO et EH. Cette étude nous a permis de mettre en évidence, pour la première fois, la capacité des métaux et des ions, contenus dans les $PM_{2.5}$ et leur EH dans la

sécrétion des VE. Egalement, nous avons mis l'accent sur le rôle des HAP et des $PM_{2.5}$ dans ce mécanisme. Puisque l'exposition des cellules aux $PM_{2.5}$ a induit une sécrétion de VE en quantité plus importante comparée à l'exposition aux deux extraits, ces résultats suggèrent une additivité des effets des fractions organiques et inorganiques sur la sécrétion des VE. Ces données sont en accord avec nos résultats précédents. En s'appuyant sur les données obtenues dans cette étude, nous avons souligné le rôle de la composition complexe des particules non seulement dans les effets toxiques, mais aussi dans la sécrétion des VE induites après exposition, avec des contributions différentes pour chaque fraction.

En même temps, le traitement des cellules BEAS-2B par des inhibiteurs spécifiques pour le stress oxydant, pour la voie TLR4 et pour la voie AhR séparément, suivi par leur exposition aux $PM_{2.5}$ a montré une diminution remarquable de la sécrétion des VE. Pour la première fois, nos résultats ont mis en évidence, que le stress oxydant, la voie TLR4 et la voie AhR sont impliquées dans l'induction de la sécrétion des VE par les cellules BEAS-2B exposées aux $PM_{2.5}$. Ces données valident également les résultats précédents qui soulignent le rôle de ces trois mécanismes dans la toxicité des $PM_{2.5}$.

Perspectives

Les conclusions de ces travaux de thèse ouvrent sur différentes perspectives. Nous avons identifié deux nouveaux types d'interaction, TLR4-AhR et TLR4-ROS. De manière à compléter ces données, il serait intéressant de tester d'autres paramètres liés aux dommages oxydatifs comme la quantification de la formation des adduits à l'ADN et aux protéines, ou même le dosage des protéines carbonylées et du malondialdéhyde, un produit issu de la peroxydation des lipides. Ces données permettraient de mieux comprendre cette interaction au niveau des effets toxiques ainsi que de la sécrétion de VE après exposition de $PM_{2.5}$.

Outre le stress oxydant, nous avons également mis en évidence que l'expression génique de la GSTM1 est régulée par différents récepteurs comme le TLR4 et l'AhR. Afin d'approfondir la connaissance de ces interactions, il sera crucial d'étudier l'activation du facteur Nrf2, que ce soit au niveau génique, protéique et de son activité avec ou sans inhibition du stress oxydant, de la voie TLR4 et de la voie AhR. Cela nous permettrait de valider certains liens proposés dans ce travail et peut-être d'élucider le rôle de chaque fraction de $PM_{2.5}$ dans les réponses inflammatoires et oxydantes induites après exposition.

Mes travaux de thèse ont mis en évidence la capacité des $PM_{2.5}$ à induire la sécrétion des VE. Il serait maintenant intéressant de caractériser le profil des VE secrétées en réponse à l'exposition aux $PM_{2.5}$ et à leurs EO et EH, en termes de protéines et d'acide nucléiques (ARNm et miARN). La mise en œuvre d'analyses transcriptomiques (RNAseq) et protéomiques (LC-MS) pourrait par exemple permettre d'identifier des différences en termes de profil des VE et contribuer à la détermination du rôle exact de chaque fraction des $PM_{2.5}$.

Enfin, mettre des cellules immunitaires telles que les macrophages alvéolaires en contact avec les VE isolées pourrait permettre d'identifier le rôle des VE secrétées par les cellules épithéliales dans la régulation de l'activation des cellules immunitaires résidentes dans leur microenvironnement.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Abbas, I., Badran, G., Verdin, A., Ledoux, F., Roumié, M., Courcot, D., Garçon, G., 2018. Polycyclic aromatic hydrocarbon derivatives in airborne particulate matter: sources, analysis and toxicity. Environmental Chemistry Letters 16, 439–475. https://doi.org/10.1007/s10311-017-0697-0

Abbas, I., Badran, G., Verdin, A., Ledoux, F., Roumie, M., Lo Guidice, J.-M., Courcot, D., Garçon, G., 2019. In vitro evaluation of organic extractable matter from ambient PM2.5 using human bronchial epithelial BEAS-2B cells: Cytotoxicity, oxidative stress, pro-inflammatory response, genotoxicity, and cell cycle deregulation. Environmental Research 171, 510–522. https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.01.052

Abbas, I., Saint-Georges, F., Billet, S., Verdin, A., Mulliez, P., Shirali, P., Garçon, G., 2009. Air pollution particulate matter (PM2.5)-induced gene expression of volatile organic compound and/or polycyclic aromatic hydrocarbon-metabolizing enzymes in an in vitro coculture lung model. Toxicology in Vitro 23, 37–46. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2008.09.020

Abdel-Shafy, H.I., Mansour, M.S.M., 2016. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. Egyptian Journal of Petroleum 25, 107–123. https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.03.011

Abels, E.R., Breakefield, X.O., 2016. Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. Cellular and Molecular Neurobiology 36, 301–312. https://doi.org/10.1007/s10571-016-0366-z

Admyre, C., Johansson, S.M., Paulie, S., Gabrielsson, S., 2006. Direct exosome stimulation of peripheral humanT cells detected by ELISPOT. European Journal of Immunology 36, 1772–1781. https://doi.org/10.1002/eji.200535615

Ahmad, S., 2017. Protein oxidation an overview of metabolism of sulphur containing amino acid cysteine. Front Biosci 9, 71–87. https://doi.org/10.2741/s474

Akira, S., 2003. Toll-like Receptor Signaling. Journal of Biological Chemistry 278, 38105–38108. https://doi.org/10.1074/jbc.R300028200

Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O., 2006. Pathogen Recognition and Innate Immunity. Cell 124, 783–801. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015

Alkoussa, S., Hulo, S., Courcot, D., Billet, S., Martin, P.J., 2020. Extracellular vesicles as actors in the air pollution related cardiopulmonary diseases. Critical Reviews in Toxicology 50, 402–423. https://doi.org/10.1080/10408444.2020.1763252

Ambroz, A., Vlkova, V., Rossner, P., Rossnerova, A., Svecova, V., Milcova, A., Pulkrabova, J., Hajslova, J., Veleminsky, M., Solansky, I., Sram, R.J., 2016. Impact of air pollution on oxidative DNA damage and lipid peroxidation in mothers and their newborns. International Journal of Hygiene and Environmental Health 219, 545–556. https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2016.05.010

An, Z., Jin, Y., Li, J., Li, W., Wu, W., 2018. Impact of Particulate Air Pollution on Cardiovascular Health. Current Allergy and Asthma Reports 18. https://doi.org/10.1007/s11882-018-0768-8

André, V., Billet, S., Pottier, D., Goff, J.L., Pottier, I., Garçon, G., Shirali, P., Sichel, F., 2011. Mutagenicity and genotoxicity of PM2.5 issued from an urbanoindustrialized area of

Dunkerque (France). Journal of applied toxicology 31, 131–138. https://doi.org/doi:10.1002/jat.1572.

Andreeva, A.V., Kutuzov, M.A., Voyno-Yasenetskaya, T.A., 2007. Regulation of surfactant secretion in alveolar type II cells. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology 293, L259–L271. https://doi.org/10.1152/ajplung.00112.2007

Andreu, Z., Yáñez-Mó, M., 2014. Tetraspanins in Extracellular Vesicle Formation and Function. Frontiers in Immunology 5. https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00442

Anenberg, S.C., Henze, D.K., Tinney, V., Kinney, P.L., Raich, W., Fann, N., Malley, C.S., Roman, H., Lamsal, L., Duncan, B., Martin, R.V., van Donkelaar, A., Brauer, M., Doherty, R., Jonson, J.E., Davila, Y., Sudo, K., Kuylenstierna, J.C.I., 2018. Estimates of the Global Burden of Ambient PM2.5, Ozone, and NO2 on Asthma Incidence and Emergency Room Visits. Environmental Health Perspectives 126, 107004. https://doi.org/10.1289/EHP3766

Antelmann, H., Helmann, J.D., 2011. Thiol-Based Redox Switches and Gene Regulation. Antioxidants & Redox Signaling 14, 1049–1063. https://doi.org/10.1089/ars.2010.3400

Arlt, V.M., Poirier, M.C., Sykes, S.E., John, K., Moserova, M., Stiborova, M., Roland Wolf, C., Henderson, C.J., Phillips, D.H., 2012. Exposure to benzo[a]pyrene of Hepatic Cytochrome P450 Reductase Null (HRN) and P450 Reductase Conditional Null (RCN) mice: Detection of benzo[a]pyrene diol epoxide-DNA adducts by immunohistochemistry and 32P-postlabelling. Toxicology Letters 213, 160–166. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.06.016

Atienzar-Aroca, S., Flores-Bellver, M., Serrano-Heras, G., Martinez-Gil, N., Barcia, J.M., Aparicio, S., Perez-Cremades, D., Garcia-Verdugo, J.M., Diaz-Llopis, M., Romero, F.J., Sancho-Pelluz, J., 2016. Oxidative stress in retinal pigment epithelium cells increases exosome secretion and promotes angiogenesis in endothelial cells. J. Cell. Mol. Med. 20, 1457–1466. https://doi.org/10.1111/jcmm.12834

Atkinson, R.W., Kang, S., Anderson, H.R., Mills, I.C., Walton, H.A., 2014. Epidemiological time series studies of PM $_{2.5}$ and daily mortality and hospital admissions: a systematic review and meta-analysis. Thorax 69, 660–665. https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2013-204492

Badimon, L., Suades, R., Fuentes, E., Palomo, I., Padró, T., 2016. Role of Platelet-Derived Microvesicles As Crosstalk Mediators in Atherothrombosis and Future Pharmacology Targets: A Link between Inflammation, Atherosclerosis, and Thrombosis. Frontiers in Pharmacology 07. https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00293

Bahadar Zeb, B., Khan Alam, K., Armin Sorooshian, A., Blaschke, T., Ahmad, I., Shahid, I., 2018. On the Morphology and Composition of Particulate Matter in an Urban Environment. Aerosol and Air Quality Research 18, 1431–1447. https://doi.org/10.4209/aaqr.2017.09.0340

Bai, Y., Sun, Q., 2015. Macrophage recruitment in obese adipose tissue: Obesity-induced inflammation. Obesity Reviews 16, 127–136. https://doi.org/10.1111/obr.12242

Barnes, P.J., 2014. Cellular and Molecular Mechanisms of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Clinics in Chest Medicine 35, 71–86. https://doi.org/10.1016/j.ccm.2013.10.004

Barnes, P.J., 2008. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. Nature Reviews Immunology 8, 183–192. https://doi.org/10.1038/nri2254

Baulig, A., Singh, S., Marchand, A., Schins, R., Barouki, R., Garlatti, M., Marano, F., Baeza-Squiban, A., 2009. Role of Paris PM2.5 components in the pro-inflammatory response induced in airway epithelial cells. Toxicology 261, 126–135. https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.05.007

Becker, S., Dailey, L., Soukup, J.M., Silbajoris, R., Devlin, R.B., 2005. TLR-2 is involved in airway epithelial cell response to air pollution particles. Toxicology and Applied Pharmacology 203, 45–52. https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.07.007

Becker, S., Soukup, J.M., Gilmour, M.I., Devlin, R.B., 1996. Stimulation of Human and Rat Alveolar Macrophages by Urban Air Particulates: Effects on Oxidant Radical Generation and Cytokine Production. Toxicology and Applied Pharmacology 141, 637–648. https://doi.org/10.1006/taap.1996.0330

Behera, S.N., Sharma, M., Aneja, V.P., Balasubramanian, R., 2013. Ammonia in the atmosphere: a review on emission sources, atmospheric chemistry and deposition on terrestrial bodies. Environ Sci Pollut Res 20, 8092–8131. https://doi.org/10.1007/s11356-013-2051-9

Belis, C.A., Karagulian, F., Larsen, B.R., Hopke, P.K., 2013. Critical review and meta-analysis of ambient particulate matter source apportionment using receptor models in Europe. Atmospheric Environment 69, 94–108. https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2012.11.009

Bell, M.L., Davis, D.L., 2001. Reassessment of the Lethal London Fog of 1952: Novel Indicators of Acute and Chronic Consequences of Acute Exposure to Air Pollution 389–394. https://doi.org/10.1289/ehp.01109s3389

Benbrahim-Tallaa, L., Baan, R.A., Grosse, Y., Lauby-Secretan, B., El Ghissassi, F., Bouvard, V., Guha, N., Loomis, D., Straif, K., 2012. Carcinogenicity of diesel-engine and gasoline-engine exhausts and some nitroarenes. The Lancet Oncology 13, 663–664. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70280-2

Benedet, J.A., Shibamoto, T., 2008. Role of transition metals, Fe(II), Cr(II), Pb(II), and Cd(II) in lipid peroxidation. Food Chemistry 107, 165–168. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.076

Benedikter, B.J., Volgers, C., van Eijck, P.H., Wouters, E.F.M., Savelkoul, P.H.M., Reynaert, N.L., Haenen, G.R.M.M., Rohde, G.G.U., Weseler, A.R., Stassen, F.R.M., 2017. Cigarette smoke extract induced exosome release is mediated by depletion of exofacial thiols and can be inhibited by thiol-antioxidants. Free Radical Biology and Medicine 108, 334–344. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.03.026

Benedikter, B.J., Weseler, A.R., Wouters, E.F.M., Savelkoul, P.H.M., Rohde, G.G.U., Stassen, F.R.M., 2018a. Redox-dependent thiol modifications: implications for the release of extracellular vesicles. Cellular and Molecular Life Sciences 75, 2321–2337. https://doi.org/10.1007/s00018-018-2806-z

Benedikter, B.J., Wouters, E.F.M., Savelkoul, P.H.M., Rohde, G.G.U., Stassen, F.R.M., 2018b. Extracellular vesicles released in response to respiratory exposures: implications for chronic disease. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B 21, 142–160. https://doi.org/10.1080/10937404.2018.1466380

BéruBé, K., Prytherch, Z., Job, C., Hughes, T., 2010. Human primary bronchial lung cell constructs: The new respiratory models. Toxicology 278, 311–318. https://doi.org/10.1016/j.tox.2010.04.004

Billet, S., Garçon, G., Dagher, Z., Verdin, A., Ledoux, F., Cazier, F., Courcot, D., Aboukais, A., Shirali, P., 2007. Ambient particulate matter (PM2.5): Physicochemical characterization and metabolic activation of the organic fraction in human lung epithelial cells (A549). Environmental Research 105, 212–223. https://doi.org/10.1016/j.envres.2007.03.001

Billet, S., Landkocz, Y., Martin, P.J., Verdin, A., Ledoux, F., Lepers, C., André, V., Cazier, F., Sichel, F., Shirali, P., Gosset, P., Courcot, D., 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 71, 168–178. https://doi.org/10.1016/j.jes.2018.04.022

Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O., 2012. Oxidative Stress and Antioxidant Defense: World Allergy Organization Journal 5, 9–19. https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613

Biron, C.A., 2016. Innate Immunity, in: Viral Pathogenesis. Elsevier, pp. 41–55. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800964-2.00004-5

Black, C., Tesfaigzi, Y., Bassein, J.A., Miller, L.A., 2017. Wildfire smoke exposure and human health: Significant gaps in research for a growing public health issue. Environmental Toxicology and Pharmacology 55, 186–195. https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.08.022

Blasius, A.L., Beutler, B., 2010. Intracellular Toll-like Receptors. Immunity 32, 305–315. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.03.012

Bodega, G., Alique, M., Puebla, L., Carracedo, J., Ramírez, R.M., 2019. Microvesicles: ROS scavengers and ROS producers. Journal of Extracellular Vesicles 8, 1626654. https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1626654

Boichu, M., Favez, O., Riffault, V., Petit, J.-E., Zhang, Y., Brogniez, C., Sciare, J., Chiapello, I., Clarisse, L., Zhang, S., Pujol-Söhne, N., Tison, E., Delbarre, H., Goloub, P., 2019. Large-scale particulate air pollution and chemical fingerprint of volcanic sulfate aerosols from the 2014–2015 Holuhraun flood lava eruption of Bárðarbunga volcano (Iceland). Atmospheric Chemistry and Physics 19, 14253–14287. https://doi.org/10.5194/acp-19-14253-2019

Bollati, V., Angelici, L., Rizzo, G., Pergoli, L., Rota, F., Hoxha, M., Nordio, F., Bonzini, M., Tarantini, L., Cantone, L., Pesatori, A.C., Apostoli, P., Baccarelli, A.A., Bertazzi, P.A., 2015. Microvesicle-associated microRNA expression is altered upon particulate matter exposure in healthy workers and in A549 cells: Particulate matter exposure and microvesicles. Journal of Applied Toxicology 35, 59–67. https://doi.org/10.1002/jat.2987

Bollati, V., Iodice, S., Favero, C., Angelici, L., Albetti, B., Cacace, R., Cantone, L., Carugno, M., Cavalleri, T., De Giorgio, B., Dioni, L., Fustinoni, S., Hoxha, M., Marinelli, B., Motta, V., Patrini, L., Pergoli, L., Riboldi, L., Rizzo, G., Rota, F., Sucato, S., Tarantini, L., Tirelli, A.S., Vigna, L., Bertazzi, P., Pesatori, A.C., 2014. Susceptibility to particle health effects, miRNA and exosomes: rationale and study protocol of the SPHERE study. BMC Public Health 14. https://doi.org/10.1186/1471-2458-14-1137

Bonvallot, V., Baeza-Squiban, A., Baulig, A., Brulant, S., Boland, S., Muzeau, F., Barouki, R., Marano, F., 2001. Organic Compounds from Diesel Exhaust Particles Elicit a Proinflammatory Response in Human Airway Epithelial Cells and Induce Cytochrome p450 1A1 Expression. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology 25, 515–521. https://doi.org/10.1165/ajrcmb.25.4.4515

Bonzini, M., Pergoli, L., Cantone, L., Hoxha, M., Spinazzè, A., Del Buono, L., Favero, C., Carugno, M., Angelici, L., Broggi, L., Cattaneo, A., Pesatori, A.C., Bollati, V., 2017. Short-term particulate matter exposure induces extracellular vesicle release in overweight subjects. Environmental Research 155, 228–234. https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.02.014

Borgie, M., Ledoux, F., Verdin, A., Cazier, F., Greige, H., Shirali, P., Courcot, D., Dagher, Z., 2015. Genotoxic and epigenotoxic effects of fine particulate matter from rural and urban sites in Lebanon on human bronchial epithelial cells. Environmental Research 136, 352–362. https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.10.010

Bradley Stringer Physiology Program, 1998. ENVIRONMENTAL PARTICULATE-MEDIATED CYTOKINE PRODUCTION IN LUNG EPITHELIAL CELLS (A549): ROLE OF PREEXISTING INFLAMMATION AND OXIDANT STRESS. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A 55, 31–44. https://doi.org/10.1080/009841098158601

Brinchmann, B.C., Skuland, T., Rambøl, M.H., Szoke, K., Brinchmann, J.E., Gutleb, A.C., Moschini, E., Kubátová, A., Kukowski, K., Le Ferrec, E., Lagadic-Gossmann, D., Schwarze, P.E., Låg, M., Refsnes, M., Øvrevik, J., Holme, J.A., 2018. Lipophilic components of diesel exhaust particles induce pro-inflammatory responses in human endothelial cells through AhR dependent pathway(s). Part Fibre Toxicol 15, 21. https://doi.org/10.1186/s12989-018-0257-1

Brügger, B., Bankaitis, V.A., 2012. Lipids and vesicular transport. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids 1821, 1039. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2012.05.005

Burger, D., Kwart, D.G., Montezano, A.C., Read, N.C., Kennedy, C.R.J., Thompson, C.S., Touyz, R.M., 2012. Microparticles Induce Cell Cycle Arrest Through Redox-Sensitive Processes in Endothelial Cells: Implications in Vascular Senescence. Journal of the American Heart Association 1. https://doi.org/10.1161/JAHA.112.001842

Burton, G.J., Jauniaux, E., 2011. Oxidative stress. Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology 25, 287–299. https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2010.10.016

Buteau, S., Geng, X., Labelle, R., Smargiassi, A., 2019. Review of the effect of air pollution exposure from industrial point sources on asthma-related effects in childhood. Environmental Epidemiology 3, e077. https://doi.org/10.1097/EE9.0000000000000077

Campolim, C.M., Weissmann, L., Ferreira, C.K. de O., Zordão, O.P., Dornellas, A.P.S., de Castro, G., Zanotto, T.M., Boico, V.F., Quaresma, P.G.F., Lima, R.P.A., Donato, J., Veras, M.M., Saldiva, P.H.N., Kim, Y.-B., Prada, P.O., 2020. Short-term exposure to air pollution (PM2.5) induces hypothalamic inflammation, and long-term leads to leptin resistance and obesity via Tlr4/Ikbke in mice. Sci Rep 10, 10160. https://doi.org/10.1038/s41598-020-67040-3

Carnino, J.M., Lee, H., Jin, Y., 2019. Isolation and characterization of extracellular vesicles from Broncho-alveolar lavage fluid: a review and comparison of different methods. Respir Res 20, 240. https://doi.org/10.1186/s12931-019-1210-z

Carver, K.A., Yang, D., 2016. *N* -Acetylcysteine Amide Protects Against Oxidative Stress–Induced Microparticle Release From Human Retinal Pigment Epithelial Cells. Investigative Opthalmology & Visual Science 57, 360. https://doi.org/10.1167/iovs.15-17117

Castañeda, A.R., Pinkerton, K.E., Bein, K.J., Magaña-Méndez, A., Yang, H.T., Ashwood, P., Vogel, C.F.A., 2018. Ambient particulate matter activates the aryl hydrocarbon receptor in dendritic

cells and enhances Th17 polarization. Toxicology Letters 292, 85–96. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.04.020

Castillo, J.R., Peters, S.P., Busse, W.W., 2017. Asthma Exacerbations: Pathogenesis, Prevention, and Treatment. The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice 5, 918–927. https://doi.org/10.1016/j.jaip.2017.05.001

Catalano, M., O'Driscoll, L., 2020. Inhibiting extracellular vesicles formation and release: a review of EV inhibitors. Journal of Extracellular Vesicles 9, 1703244. https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1703244

Celhar, T., Magalhães, R., Fairhurst, A.-M., 2012. TLR7 and TLR9 in SLE: when sensing self goes wrong. Immunologic Research 53, 58–77. https://doi.org/10.1007/s12026-012-8270-1

Chanez, P., Bourdin, A., 2008. Pathophysiology of Asthma. Clinical Asthma 23–34.

Chen, T., Jin, H., Wang, H., Yao, Y., Aniagu, S., Tong, J., Jiang, Y., 2019. Aryl hydrocarbon receptor mediates the cardiac developmental toxicity of EOM from PM2.5 in P19 embryonic carcinoma cells. Chemosphere 216, 372–378. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.160

Chiba, T., Uchi, H., Tsuji, G., Gondo, H., Moroi, Y., Furue, M., 2011. Arylhydrocarbon receptor (AhR) activation in airway epithelial cells induces MUC5AC via reactive oxygen species (ROS) production. Pulmonary Pharmacology & Therapeutics 24, 133–140. https://doi.org/10.1016/j.pupt.2010.08.002

Cicolella, A., 2008. Les composés organiques volatils (COV) : définition, classification et propriétés. Revue des Maladies Respiratoires 25, 155–163. https://doi.org/10.1016/S0761-8425(08)71513-4

Coban, C., Igari, Y., Yagi, M., Reimer, T., Koyama, S., Aoshi, T., Ohata, K., Tsukui, T., Takeshita, F., Sakurai, K., Ikegami, T., Nakagawa, A., Horii, T., Nuñez, G., Ishii, K.J., Akira, S., 2010. Immunogenicity of Whole-Parasite Vaccines against Plasmodium falciparum Involves Malarial Hemozoin and Host TLR9. Cell Host & Microbe 7, 50–61. https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.12.003

Cohen, A.J., Samet, J.M., Straif, K., International Agency for Research on Cancer, 2013. Air pollution and cancer. International Agency for Research on Cancer, Lyon.

Colombo, M., Raposo, G., Théry, C., 2014. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. Annual Review of Cell and Developmental Biology 30, 255–289. https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326

Conrad, K.P., Tuna, K.M., Mestre, C.T., Banwatt, E.S., Alli, A.A., 2020. Activation of multiple receptors stimulates extracellular vesicle release from trophoblast cells. Physiol Rep 8. https://doi.org/10.14814/phy2.14592

Cooper, D.M., Loxham, M., 2019. Particulate matter and the airway epithelium: the special case of the underground? Eur Respir Rev 28, 190066. https://doi.org/10.1183/16000617.0066-2019

Cordazzo, C., Petrini, S., Neri, T., Lombardi, S., Carmazzi, Y., Pedrinelli, R., Paggiaro, P., Celi, A., 2014. Rapid shedding of proinflammatory microparticles by human mononuclear cells exposed to cigarette smoke is dependent on Ca2+ mobilization. Inflammation Research 63, 539–547. https://doi.org/10.1007/s00011-014-0723-7

Costa, C., Catania, S., De Pasquale, R., Stancanelli, R., Scribano, G.M., Melchini, A., 2010. Exposure of human skin to benzo[a]pyrene: Role of CYP1A1 and aryl hydrocarbon receptor in oxidative stress generation. Toxicology 271, 83–86. https://doi.org/10.1016/j.tox.2010.02.014

Courcot, E., Leclerc, J., Lafitte, J.-J., Mensier, E., Jaillard, S., Gosset, P., Shirali, P., Pottier, N., Broly, F., Lo-Guidice, J.-M., 2012. Xenobiotic Metabolism and Disposition in Human Lung Cell Models: Comparison with In Vivo Expression Profiles. Drug Metabolism and Disposition 40, 1953–1965. https://doi.org/10.1124/dmd.112.046896

Courter, L.A., Musafia-Jeknic, T., Fischer, K., Bildfell, R., Giovanini, J., Pereira, C., Baird, W.M., 2007. Urban Dust Particulate Matter Alters PAH-Induced Carcinogenesis by Inhibition of CYP1A1 and CYP1B1. Toxicological Sciences 95, 63–73. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfl137

Creagh, E.M., O'Neill, L.A.J., 2006. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. Trends in Immunology 27, 352–357. https://doi.org/10.1016/j.it.2006.06.003

Crescitelli, R., Lässer, C., Lötvall, J., 2021. Isolation and characterization of extracellular vesicle subpopulations from tissues. Nat Protoc 16, 1548–1580. https://doi.org/10.1038/s41596-020-00466-1

Croom, E., 2012. Metabolism of Xenobiotics of Human Environments, in: Progress in Molecular Biology and Translational Science. Elsevier, pp. 31–88. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415813-9.00003-9

Dalton, A.J., 1975. Microvesicles and Vesicles of Multivesicular Bodies Versus "Virus-Like" Particles. JNCI: Journal of the National Cancer Institute 54, 1137–1148. https://doi.org/10.1093/jnci/54.5.1137

del Conde, I., 2005. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. Blood 106, 1604–1611. https://doi.org/10.1182/blood-2004-03-1095

Deng, C., Dang, F., Gao, J., Zhao, H., Qi, S., Gao, M., 2018. Acute benzo[a]pyrene treatment causes different antioxidant response and DNA damage in liver, lung, brain, stomach and kidney. Heliyon 4, e00898. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00898

Deng, X., Rui, W., Zhang, F., Ding, W., 2013a. PM2.5 induces Nrf2-mediated defense mechanisms against oxidative stress by activating PIK3/AKT signaling pathway in human lung alveolar epithelial A549 cells. Cell Biology and Toxicology 29, 143–157. https://doi.org/10.1007/s10565-013-9242-5

Deng, X., Zhang, F., Rui, W., Long, F., Wang, L., Feng, Z., Chen, D., Ding, W., 2013b. PM2.5-induced oxidative stress triggers autophagy in human lung epithelial A549 cells. Toxicology in Vitro 27, 1762–1770. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.05.004

Denman, K.L., Brasseur, G., Chidthaisong, A., et al., 2007. Couplings Between Changes in the Climate System and Biogeochemistry 90.

Dergham, M., Lepers, C., Verdin, A., Billet, S., Cazier, F., Courcot, D., Shirali, P., Garçon, G., 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). Chem. Res. Toxicol. 25, 904–919. https://doi.org/10.1021/tx200529v

Dergham, M., Lepers, C., Verdin, A., Cazier, F., Billet, S., Courcot, D., Shirali, P., Garçon, G., 2015. Temporal–spatial variations of the physicochemical characteristics of air pollution Particulate Matter (PM2.5–0.3) and toxicological effects in human bronchial epithelial cells (BEAS-2B). Environmental Research 137, 256–267. https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.12.015

Devulder, J., Baker, J., Donnelly, L., Barnes, P.J., 2020. Extracellular Vesicles Produced by Bronchial Epithelial Cells in Response to Oxidative Stress Contain Micro-RNAs Associated with Cellular Senescence, in: B65. COPD PATHOGENESIS: CELL AND ANIMAL MODELS. Presented at the American Thoracic Society 2020 International Conference, May 15-20, 2020 - Philadelphia, PA, American Thoracic Society, pp. A4081–A4081. https://doi.org/10.1164/ajrccm-conference.2020.201.1_MeetingAbstracts.A4081

Dietrich, C., 2016. Antioxidant Functions of the Aryl Hydrocarbon Receptor. Stem Cells International 2016, 1–10. https://doi.org/10.1155/2016/7943495

Domagala-Kulawik, J., 2020. The relevance of bronchoalveolar lavage fluid analysis for lung cancer patients. Expert Review of Respiratory Medicine 14, 329–337. https://doi.org/10.1080/17476348.2020.1708720

Doyle, L.M., Wang, M.Z., 2019. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. Cells 8, 727. https://doi.org/10.3390/cells8070727

Dumax-Vorzet, A.F., Tate, M., Walmsley, R., Elder, R.H., Povey, A.C., 2015. Cytotoxicity and genotoxicity of urban particulate matter in mammalian cells. MUTAGE 30, 621–633. https://doi.org/10.1093/mutage/gev025

EEA, 2018. Air quality in Europe: 2018 report. Publications Office, LU.

Eilstein, D., 2010. Exposition prolongée à la pollution atmosphérique et mortalité par pathologies respiratoires. Revue Française d'Allergologie 50, 51–61. https://doi.org/10.1016/j.reval.2010.01.007

Eken, C., Martin, P.J., Sadallah, S., Treves, S., Schaller, M., Schifferli, J.A., 2010. Ectosomes Released by Polymorphonuclear Neutrophils Induce a MerTK-dependent Anti-inflammatory Pathway in Macrophages. Journal of Biological Chemistry 285, 39914–39921. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.126748

Eken, C., Sadallah, S., Martin, P.J., Treves, S., Schifferli, J.A., 2013. Ectosomes of polymorphonuclear neutrophils activate multiple signaling pathways in macrophages. Immunobiology 218, 382–392. https://doi.org/10.1016/j.imbio.2012.05.021

Emmerechts, J., Jacobs, L., Van Kerckhoven, S., Loyen, S., Mathieu, C., Fierens, F., Nemery, B., Nawrot, T.S., Hoylaerts, M.F., 2012. Air pollution-associated procoagulant changes: the role of circulating microvesicles: Air pollution and procoagulant microvesicles. Journal of Thrombosis and Haemostasis 10, 96–106. https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2011.04557.x

European Environment Agency, 2015. European Union emission inventory report 1990-2013 under the UNECE Convention on Long-range Transboundary Air Pollution (LRTAP). Publications Office, Luxembourg.

Falcon-Rodriguez, C.I., Osornio-Vargas, A.R., Sada-Ovalle, I., Segura-Medina, P., 2016. Aeroparticles, Composition, and Lung Diseases. Frontiers in Immunology 7. https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00003

Fang, T., Lakey, P.S.J., Weber, R.J., Shiraiwa, M., 2019. Oxidative Potential of Particulate Matter and Generation of Reactive Oxygen Species in Epithelial Lining Fluid. Environ. Sci. Technol. 53, 12784–12792. https://doi.org/10.1021/acs.est.9b03823

Feng, D., Zhao, W.-L., Ye, Y.-Y., Bai, X.-C., Liu, R.-Q., Chang, L.-F., Zhou, Q., Sui, S.-F., 2010. Cellular Internalization of Exosomes Occurs Through Phagocytosis. Traffic 11, 675–687. https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2010.01041.x

Feng, S., Duan, E., Shi, X., Zhang, H., Li, H., Zhao, Y., Chao, L., Zhong, X., Zhang, W., Li, R., Yan, X., 2019. Hydrogen ameliorates lung injury in a rat model of subacute exposure to concentrated ambient PM2.5 via Aryl hydrocarbon receptor. International Immunopharmacology 77, 105939. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.105939

Ferecatu, I., Borot, M.-C., Bossard, C., Leroux, M., Boggetto, N., Marano, F., Baeza-Squiban, A., Andreau, K., 2010. Polycyclic aromatic hydrocarbon components contribute to the mitochondria-antiapoptotic effect of fine particulate matter on human bronchial epithelial cells via the aryl hydrocarbon receptor. Part Fibre Toxicol 7, 18. https://doi.org/10.1186/1743-8977-7-18

Fernvik, E., Halldéen, G., Hed, J., Lundahl, J., 1995. Intracellular and surface distribution of CD9 in human eosinophils. APMIS 103, 699–706. https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1995.tb01426.x

Finlayson-Pitts, B.J., 1997. Tropospheric Air Pollution: Ozone, Airborne Toxics, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, and Particles. Science 276, 1045–1051. https://doi.org/10.1126/science.276.5315.1045

Forouzanfar, M.H., Afshin, A., Alexander, L.T., et al., 2016. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. The Lancet 388, 1659–1724. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31679-8

Francisco-Garcia, A.S., Garrido-Martín, E.M., Rupani, H., Lau, L.C.K., Martinez-Nunez, R.T., Howarth, P.H., Sanchez-Elsner, T., 2019. Small RNA Species and microRNA Profiles are Altered in Severe Asthma Nanovesicles from Broncho Alveolar Lavage and Associate with Impaired Lung Function and Inflammation. Non-Coding RNA 5, 51. https://doi.org/10.3390/ncrna5040051

Frydrychowicz, M., Kolecka-Bednarczyk, A., Madejczyk, M., Yasar, S., Dworacki, G., 2015. Exosomes - Structure, Biogenesis and Biological Role in Non-Small-Cell Lung Cancer. Scandinavian Journal of Immunology 81, 2–10. https://doi.org/10.1111/sji.12247

Fu, H., Liu, X., Li, W., Zu, Y., Zhou, F., Shou, Q., Ding, Z., 2020. PM2.5 Exposure Induces Inflammatory Response in Macrophages via the TLR4/COX-2/NF-κB Pathway. Inflammation 43, 1948–1958. https://doi.org/10.1007/s10753-020-01269-y

Fujita, Y., Araya, J., Ito, S., Kobayashi, K., Kosaka, N., Yoshioka, Y., Kadota, T., Hara, H., Kuwano, K., Ochiya, T., 2015a. Suppression of autophagy by extracellular vesicles promotes myofibroblast differentiation in COPD pathogenesis. Journal of Extracellular Vesicles 4, 28388. https://doi.org/10.3402/jev.v4.28388

Fujita, Y., Araya, J., Ochiya, T., 2015b. Extracellular vesicles in smoking-related lung diseases. Oncotarget 6, 43144–43145. https://doi.org/10.18632/oncotarget.6556

Fujita, Y., Kosaka, N., Araya, J., Kuwano, K., Ochiya, T., 2015c. Extracellular vesicles in lung microenvironment and pathogenesis. Trends in Molecular Medicine 21, 533–542. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2015.07.004

Fujita, Y., Kuwano, K., Ochiya, T., 2015d. Development of Small RNA Delivery Systems for Lung Cancer Therapy. International Journal of Molecular Sciences 16, 5254–5270. https://doi.org/10.3390/ijms16035254

Fujita, Y., Kuwano, K., Ochiya, T., Takeshita, F., 2014. The Impact of Extracellular Vesicle-Encapsulated Circulating MicroRNAs in Lung Cancer Research. BioMed Research International 2014, 1–8. https://doi.org/10.1155/2014/486413

Fujita, Y., Takeshita, F., Kuwano, K., Ochiya, T., 2013. RNAi Therapeutic Platforms for Lung Diseases. Pharmaceuticals 6, 223–250. https://doi.org/10.3390/ph6020223

Furlan-Freguia, C., Marchese, P., Gruber, A., Ruggeri, Z.M., Ruf, W., 2011. P2X7 receptor signaling contributes to tissue factor–dependent thrombosis in mice. Journal of Clinical Investigation 121, 2932–2944. https://doi.org/10.1172/JCI46129

Gan, W.Q., FitzGerald, J.M., Carlsten, C., Sadatsafavi, M., Brauer, M., 2013. Associations of Ambient Air Pollution with Chronic Obstructive Pulmonary Disease Hospitalization and Mortality. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 187, 721–727. https://doi.org/10.1164/rccm.201211-2004OC

Gangwar, R.S., Bevan, G.H., Palanivel, R., Das, L., Rajagopalan, S., 2020. Oxidative stress pathways of air pollution mediated toxicity: Recent insights. Redox Biology 34, 101545. https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101545

Genschmer, K.R., Russell, D.W., Lal, C., Szul, T., Bratcher, P.E., Noerager, B.D., Abdul Roda, M., Xu, X., Rezonzew, G., Viera, L., Dobosh, B.S., Margaroli, C., Abdalla, T.H., King, R.W., McNicholas, C.M., Wells, J.M., Dransfield, M.T., Tirouvanziam, R., Gaggar, A., Blalock, J.E., 2019. Activated PMN Exosomes: Pathogenic Entities Causing Matrix Destruction and Disease in the Lung. Cell 176, 113-126.e15. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.12.002

Gold, R., Stoll, G., Kieseier, B.C., Hartung, H.-P., Toyka, K.V., 2005. Experimental Autoimmune Neuritis 609–633. https://doi.org/10.1016/B978-0-7216-9491-7.50030-2

Goldie, B.J., Dun, M.D., Lin, M., Smith, N.D., Verrills, N.M., Dayas, C.V., Cairns, M.J., 2014. Activity-associated miRNA are packaged in Map1b-enriched exosomes released from depolarized neurons. Nucleic Acids Research 42, 9195–9208. https://doi.org/10.1093/nar/gku594

González-Flecha, B., 2004. Oxidant mechanisms in response to ambient air particles. Molecular Aspects of Medicine 25, 169–182. https://doi.org/10.1016/j.mam.2004.02.017

Göran Ronquist, K., 2019. Extracellular vesicles and energy metabolism. Clinica Chimica Acta 488, 116–121. https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.10.044

Gordon, C., Gudi, K., Krause, A., Sackrowitz, R., Harvey, B.-G., Strulovici-Barel, Y., Mezey, J.G., Crystal, R.G., 2011. Circulating Endothelial Microparticles as a Measure of Early Lung Destruction in Cigarette Smokers. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 184, 224–232. https://doi.org/10.1164/rccm.201012-2061OC

Greeley, M.A., 2016. Respiratory System, in: Atlas of Histology of the Juvenile Rat. Elsevier, pp. 89–125. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802682-3.00004-5

Guevara, M., 2016. Emissions of Primary Particulate Matter, in: Harrison, R.M., Hester, R.E., Querol, X. (Eds.), Issues in Environmental Science and Technology. Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 1–34. https://doi.org/10.1039/9781782626589-00001

Guevara, M., Martínez, F., Arévalo, G., Gassó, S., Baldasano, J.M., 2013. An improved system for modelling Spanish emissions: HERMESv2.0. Atmospheric Environment 81, 209–221. https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2013.08.053

Guiducci, C., Gong, M., Cepika, A.-M., Xu, Z., Tripodo, C., Bennett, L., Crain, C., Quartier, P., Cush, J.J., Pascual, V., Coffman, R.L., Barrat, F.J., 2013. RNA recognition by human TLR8 can lead to autoimmune inflammation. The Journal of Experimental Medicine 210, 2903–2919. https://doi.org/10.1084/jem.20131044

Gulland, A., 2016. France's air pollution causes 48 000 deaths a year. BMJ i3523. https://doi.org/10.1136/bmj.i3523

Gupta, R.K., Patel, A.K., Kumari, R., Chugh, S., Shrivastav, C., Mehra, S., Sharma, A.N., 2012. Interactions between Oxidative Stress, Lipid Profile and Antioxidants in Breast Cancer: A Case Control Study. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention 13, 6295–6298. https://doi.org/10.7314/APJCP.2012.13.12.6295

Guyot, E., Chevallier, A., Barouki, R., Coumoul, X., 2013. The AhR twist: ligand-dependent AhR signaling and pharmaco-toxicological implications. Drug Discovery Today 18, 479–486. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.11.014

Haarmann-Stemmann, T., Abel, J., Fritsche, E., Krutmann, J., 2012. The AhR–Nrf2 Pathway in Keratinocytes: On the Road to Chemoprevention? Journal of Investigative Dermatology 132, 7–9. https://doi.org/10.1038/jid.2011.359

Haberzettl, P., Bhatnagar, A., Conklin, D.J., 2014. Particulate Matter and Oxidative Stress – Pulmonary and Cardiovascular Targets and Consequences, in: Laher, I. (Ed.), Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 1557–1586. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30018-9_120

Haggadone, M.D., Peters-Golden, M., 2018. Microenvironmental Influences on Extracellular Vesicle-Mediated Communication in the Lung. Trends in Molecular Medicine 24, 963–975. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.08.006

Hamilton, K.K., Hattori, R., Charles T., E., Sims, P.J., 1990. Complement Proteins C5b-9 Induce Vesiculation of the Endothelial Plasma Membrane and Expose Catalytic Surface for Assembly of the Prothrombinase Enzyme Complex. Journal of Biological Chemistry 3809–3814. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)39666-8

Hamra, G.B., Guha, N., Cohen, A., Laden, F., Raaschou-Nielsen, O., Samet, J.M., Vineis, P., Forastiere, F., Saldiva, P., Yorifuji, T., Loomis, D., 2014. Outdoor Particulate Matter Exposure and Lung Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. Environmental Health Perspectives. https://doi.org/10.1289/ehp.1408092

Hanson, P.I., Cashikar, A., 2012. Multivesicular Body Morphogenesis. Annual Review of Cell and Developmental Biology 28, 337–362. https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154152

Harding, C., Heuser, J., Stahl, P., 1983. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. The Journal of Cell Biology 97, 329–339. https://doi.org/10.1083/jcb.97.2.329

Harkema, J.R., Nikula, K.J., Haschek, W.M., 2013. Respiratory System, in: Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology. Elsevier, pp. 1935–2003. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415759-0.00051-0

Harmon, A.C., Hebert, V.Y., Cormier, S.A., Subramanian, B., Reed, J.R., Backes, W.L., Dugas, T.R., 2018. Particulate matter containing environmentally persistent free radicals induces AhR-dependent cytokine and reactive oxygen species production in human bronchial epithelial cells. PLoS ONE 13, e0205412. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205412

Harrison, R.M., 2020. Airborne particulate matter. Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences 378, 20190319. https://doi.org/10.1098/rsta.2019.0319

Hartwig, J.H., Chambers, K.A., Stossel, T.P., 1989. Association of gelsolin with actin filaments and cell membranes of macrophages and platelets. The Journal of Cell Biology 108, 467–479. https://doi.org/10.1083/jcb.108.2.467

Hayes, J.D., Dinkova-Kostova, A.T., McMahon, M., 2009. Cross-talk between Transcription Factors AhR and Nrf2: Lessons for Cancer Chemoprevention from Dioxin. Toxicological Sciences 111, 199–201. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp168

Hayes, J.D., McMahon, M., 2009. NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer. Trends in Biochemical Sciences 34, 176–188. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2008.12.008

He, M., Ichinose, T., Yoshida, S., Ito, T., He, C., Yoshida, Y., Arashidani, K., Takano, H., Sun, G., Shibamoto, T., 2017a. PM2.5-induced lung inflammation in mice: Differences of inflammatory response in macrophages and type II alveolar cells: PM2.5 caused lung inflammation: macrophages vs. alveolar cells. J. Appl. Toxicol. 37, 1203–1218. https://doi.org/10.1002/jat.3482

He, M., Ichinose, T., Yoshida, S., Ito, T., He, C., Yoshida, Y., Arashidani, K., Takano, H., Sun, G., Shibamoto, T., 2017b. PM2.5-induced lung inflammation in mice: Differences of inflammatory response in macrophages and type II alveolar cells. J Appl Toxicol 37, 1203–1218. https://doi.org/10.1002/jat.3482

He, M., Ichinose, T., Yoshida, Y., Arashidani, K., Yoshida, S., Takano, H., Sun, G., Shibamoto, T., 2017c. Urban PM2.5 exacerbates allergic inflammation in the murine lung via a TLR2/TLR4/MyD88-signaling pathway. Sci Rep 7, 11027. https://doi.org/10.1038/s41598-017-11471-y

Héliot, A., Landkocz, Y., Roy Saint-Georges, F., Gosset, P., Billet, S., Shirali, P., Courcot, D., Martin, P.J., 2017. Smoker extracellular vesicles influence status of human bronchial epithelial cells. International Journal of Hygiene and Environmental Health 220, 445–454. https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2016.12.010

Henne, W.M., Buchkovich, N.J., Emr, S.D., 2011. The ESCRT Pathway. Developmental Cell 21, 77–91. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.05.015

Hessvik, N.P., Llorente, A., 2018. Current knowledge on exosome biogenesis and release. Cellular and Molecular Life Sciences 75, 193–208. https://doi.org/10.1007/s00018-017-2595-9

Hong, C.-W., 2018. Extracellular Vesicles of Neutrophils. Immune Network 18. https://doi.org/10.4110/in.2018.18.e43

Hough, K.P., Wilson, L.S., Trevor, J.L., Strenkowski, J.G., Maina, N., Kim, Y.-I., Spell, M.L., Wang, Y., Chanda, D., Dager, J.R., Sharma, N.S., Curtiss, M., Antony, V.B., Dransfield, M.T., Chaplin, D.D., Steele, C., Barnes, S., Duncan, S.R., Prasain, J.K., Thannickal, V.J., Deshane, J.S., 2018. Unique Lipid Signatures of Extracellular Vesicles from the Airways of Asthmatics. Scientific Reports 8. https://doi.org/10.1038/s41598-018-28655-9

Huang, F., Pan, B., Wu, J., Chen, E., Chen, L., 2017. Relationship between exposure to PM2.5 and lung cancer incidence and mortality: A meta-analysis. Oncotarget 8, 43322–43331. https://doi.org/10.18632/oncotarget.17313

Huang, K., Li, W., Chen, Y., Zhu, J., 2018. Effect of PM2.5 on invasion and proliferation of HeLa cells and the expression of inflammatory cytokines IL-1 and IL-6. Oncol Lett. https://doi.org/10.3892/ol.2018.9516

Huang, X., Shi, X., Zhou, J., Li, S., Zhang, L., Zhao, H., Kuang, X., Li, J., 2020. The activation of antioxidant and apoptosis pathways involved in damage of human proximal tubule epithelial cells by PM2.5 exposure. Environ Sci Eur 32, 2. https://doi.org/10.1186/s12302-019-0284-z

Huber, V., Fais, S., Iero, M., Lugini, L., Canese, P., Squarcina, P., Zaccheddu, A., Colone, M., Arancia, G., Gentile, M., Seregni, E., Valenti, R., Ballabio, G., Belli, F., Leo, E., Parmiani, G., Rivoltini, L., 2005. Human Colorectal Cancer Cells Induce T-Cell Death Through Release of Proapoptotic Microvesicles: Role in Immune Escape. Gastroenterology 128, 1796–1804. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.03.045

Ibáñez, F., Montesinos, J., Ureña-Peralta, J.R., Guerri, C., Pascual, M., 2019. TLR4 participates in the transmission of ethanol-induced neuroinflammation via astrocyte-derived extracellular vesicles. J Neuroinflammation 16, 136. https://doi.org/10.1186/s12974-019-1529-x

Ikeda, M., Kihara, A., Igarashi, Y., 2006. Lipid Asymmetry of the Eukaryotic Plasma Membrane: Functions and Related Enzymes. Biological & Pharmaceutical Bulletin 29, 1542–1546. https://doi.org/10.1248/bpb.29.1542

Inal, J.M., Kosgodage, U., Azam, S., Stratton, D., Antwi-Baffour, S., Lange, S., 2013. Blood/plasma secretome and microvesicles. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics 1834, 2317–2325. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.04.005

Ismail, N., Wang, Y., Dakhlallah, D., Moldovan, L., Agarwal, K., Batte, K., Shah, P., Wisler, J., Eubank, T.D., Tridandapani, S., Paulaitis, M.E., Piper, M.G., Marsh, C.B., 2013. Macrophage microvesicles induce macrophage differentiation and miR-223 transfer. Blood 121, 984–995. https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-374793

Jameson, C.W., 2019. Polycyclic aromatic hydrocarbons and associated occupational exposures 6.

Janeway, C.A., Medzhitov, R., 2002. Innate immune recognition. Annual Review of Immunology 20, 197–216. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359

Jang, H. sung, Lee, J. eun, Myung, C. hwan, Park, J. il, Jo, C. song, Hwang, J.S., 2019. Particulate Matter-Induced Aryl Hydrocarbon Receptor Regulates Autophagy in Keratinocytes. Biomolecules & Therapeutics 27, 570–576. https://doi.org/10.4062/biomolther.2019.025

Jankovičová, J., Sečová, P., Michalková, K., Antalíková, J., 2020. Tetraspanins, More than Markers of Extracellular Vesicles in Reproduction. International Journal of Molecular Sciences 21, 7568. https://doi.org/10.3390/ijms21207568

Jerotic, D., Matic, M., Suvakov, S., Vucicevic, K., Damjanovic, T., Savic-Radojevic, A., Pljesa-Ercegovac, M., Coric, V., Stefanovic, A., Ivanisevic, J., Jelic-Ivanovic, Z., McClements, L., Dimkovic, N., Simic, T., 2019. Association of Nrf2, SOD2 and GPX1 Polymorphisms with Biomarkers of Oxidative Distress and Survival in End-Stage Renal Disease Patients. Toxins 11, 431. https://doi.org/10.3390/toxins11070431

Jia, H., Liu, Y., Guo, D., He, W., Zhao, L., Xia, S., 2021. PM2 .5-induced pulmonary inflammation via activating of the NLRP3 /caspase-1 signaling pathway. Environmental Toxicology 36, 298–307. https://doi.org/10.1002/tox.23035

Jo, Y.S., Lim, M.N., Han, Y.J., Kim, W.J., 2018. Epidemiological study of $PM_{2.5}$ and risk of COPD-related hospital visits in association with particle constituents in Chuncheon, Korea. COPD Volume 13, 299–307. https://doi.org/10.2147/COPD.S149469

Johnson-Arbor, K.K., Quental, A.S., Li, D., 2014. A Comparison of Carbon Monoxide Exposures After Snowstorms and Power Outages. American Journal of Preventive Medicine 46, 481–486. https://doi.org/10.1016/j.amepre.2014.01.006

Joo, Suh, Lee, Bang, Lee, 2020. Current Knowledge and Future Perspectives on Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes as a New Therapeutic Agent. International Journal of Molecular Sciences 21, 727. https://doi.org/10.3390/ijms21030727

Joshi, N., Walter, J.M., Misharin, A.V., 2018. Alveolar Macrophages. Cellular Immunology 330, 86–90. https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.01.005

Joubert, B.R., Håberg, S.E., Nilsen, R.M., Wang, X., Vollset, S.E., Murphy, S.K., Huang, Z., Hoyo, C., Midttun, Ø., Cupul-Uicab, L.A., Ueland, P.M., Wu, M.C., Nystad, W., Bell, D.A., Peddada, S.D., London, S.J., 2012. 450K Epigenome-Wide Scan Identifies Differential DNA Methylation in Newborns Related to Maternal Smoking during Pregnancy. Environmental Health Perspectives 120, 1425–1431. https://doi.org/10.1289/ehp.1205412

Kadota, T., Fujita, Y., Yoshioka, Y., Araya, J., Kuwano, K., Ochiya, T., 2016. Extracellular Vesicles in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. International Journal of Molecular Sciences 17, 1801. https://doi.org/10.3390/ijms17111801

Kadota, T., Yoshioka, Y., Fujita, Y., Kuwano, K., Ochiya, T., 2017. Extracellular vesicles in lung cancer—From bench to bedside. Seminars in Cell & Developmental Biology 67, 39–47. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.03.001

Kalra, H., Simpson, R.J., Ji, H., Aikawa, E., Altevogt, P., Askenase, P., Bond, V.C., Borràs, F.E., Breakefield, X., Budnik, V., Buzas, E., Camussi, G., Clayton, A., Cocucci, E., Falcon-Perez, J.M., Gabrielsson, S., Gho, Y.S., Gupta, D., Harsha, H.C., Hendrix, A., Hill, A.F., Inal, J.M., Jenster, G., Krämer-Albers, E.-M., Lim, S.K., Llorente, A., Lötvall, J., Marcilla, A., Mincheva-Nilsson, L., Nazarenko, I., Nieuwland, R., Nolte-'t Hoen, E.N.M., Pandey, A., Patel, T., Piper, M.G., Pluchino, S., Prasad, T.S.K., Rajendran, L., Raposo, G., Record, M., Reid, G.E., Sánchez-Madrid, F., Schiffelers, R.M., Siljander, P., Stensballe, A., Stoorvogel, W., Taylor, D.,

Thery, C., Valadi, H., van Balkom, B.W.M., Vázquez, J., Vidal, M., Wauben, M.H.M., Yáñez-Mó, M., Zoeller, M., Mathivanan, S., 2012. Vesiclepedia: A Compendium for Extracellular Vesicles with Continuous Community Annotation. PLoS Biology 10, e1001450. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001450

Kampfrath, T., Maiseyeu, A., Ying, Z., Shah, Z., Deiuliis, J.A., Xu, X., Kherada, N., Brook, R.D., Reddy, K.M., Padture, N.P., Parthasarathy, S., Chen, L.C., Moffatt-Bruce, S., Sun, Q., Morawietz, H., Rajagopalan, S., 2011. Chronic Fine Particulate Matter Exposure Induces Systemic Vascular Dysfunction via NADPH Oxidase and TLR4 Pathways. Circulation Research 108, 716–726. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.237560

Karagulian, F., Belis, C.A., Dora, C.F.C., Prüss-Ustün, A.M., Bonjour, S., Adair-Rohani, H., Amann, M., 2015. Contributions to cities' ambient particulate matter (PM): A systematic review of local source contributions at global level. Atmospheric Environment 120, 475–483. https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2015.08.087

Kasala, E.R., Bodduluru, L.N., Barua, C.C., Sriram, C.S., Gogoi, R., 2015. Benzo(a)pyrene induced lung cancer: Role of dietary phytochemicals in chemoprevention. Pharmacological Reports 67, 996–1009. https://doi.org/10.1016/j.pharep.2015.03.004

Kawai, T., Akira, S., 2011. Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. Immunity 34, 637–650. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.05.006

Kawai, T., Akira, S., 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. Nature Immunology 11, 373–384. https://doi.org/10.1038/ni.1863

Kawasaki, T., Kawai, T., 2014. Toll-Like Receptor Signaling Pathways. Frontiers in Immunology 5. https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00461

Keller, S., Rupp, C., Stoeck, A., Runz, S., Fogel, M., Lugert, S., Hager, H.-D., Abdel-Bakky, M.S., Gutwein, P., Altevogt, P., 2007. CD24 is a marker of exosomes secreted into urine and amniotic fluid. Kidney International 72, 1095–1102. https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002486

Keller, S., Sanderson, M.P., Stoeck, A., Altevogt, P., 2006. Exosomes: From biogenesis and secretion to biological function. Immunology Letters 107, 102–108. https://doi.org/10.1016/j.imlet.2006.09.005

Kelly, F.J., Fussell, J.C., 2012. Size, source and chemical composition as determinants of toxicity attributable to ambient particulate matter. Atmospheric Environment 60, 504–526. https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2012.06.039

Kim, H., Shim, J., Park, B., Lee, Y., 2018. Long-Term Exposure to Air Pollutants and Cancer Mortality: A Meta-Analysis of Cohort Studies. International Journal of Environmental Research and Public Health 15, 2608. https://doi.org/10.3390/ijerph15112608

Kim, J.E., Eom, J.S., Kim, W., Jo, E.J., Mok, J., Lee, K., Kim, K.U., Park, H., Lee, M.K., Kim, M., 2018. Diagnostic value of microRNAs derived from exosomes in bronchoalveolar lavage fluid of early-stage lung adenocarcinoma: A pilot study: BAL exosomal miRNAs of lung ADC. Thoracic Cancer 9, 911–915. https://doi.org/10.1111/1759-7714.12756

Kim, K.-H., Kabir, E., Kabir, S., 2015. A review on the human health impact of airborne particulate matter. Environment International 74, 136–143. https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.10.005

Kirby, B., 2014. Larynx, in: Feline Soft Tissue and General Surgery. Elsevier, pp. 635–644. https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-4336-9.00052-4

Knaapen, A.M., Shi, T., Borm, P.J.A., Schins, R.P.F., 2002. Soluble metals as well as the insoluble particle fraction are involved in cellular DNA damage induced by particulate matter, in: Vallyathan, V., Shi, X., Castranova, V. (Eds.), Oxygen/Nitrogen Radicals: Cell Injury and Disease. Springer US, Boston, MA, pp. 317–326. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1087-1_36

Kono, H., Rock, K.L., 2008. How dying cells alert the immune system to danger. Nature Reviews Immunology 8, 279–289. https://doi.org/10.1038/nri2215

Korbecki, J., Baranowska-Bosiacka, I., Gutowska, I., Chlubek, D., 2013. The effect of reactive oxygen species on the synthesis of prostanoids from arachidonic acid. Journal of physiology and pharmacology 4, 409–421.

Kosaka, N., Iguchi, H., Yoshioka, Y., Takeshita, F., Matsuki, Y., Ochiya, T., 2010. Secretory Mechanisms and Intercellular Transfer of MicroRNAs in Living Cells. Journal of Biological Chemistry 285, 17442–17452. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.107821

Kouassi, K.S., Billet, S., Garçon, G., Verdin, A., Diouf, A., Cazier, F., Djaman, J., Courcot, D., Shirali, P., 2010. Oxidative damage induced in A549 cells by physically and chemically characterized air particulate matter (PM2.5) collected in Abidjan, Côte d'Ivoire. J Appl Toxicol 30, 310–320. https://doi.org/10.1002/jat.1496

Kowal, J., Arras, G., Colombo, M., Jouve, M., Morath, J.P., Primdal-Bengtson, B., Dingli, F., Loew, D., Tkach, M., Théry, C., 2016. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. Proceedings of the National Academy of Sciences 113, E968–E977. https://doi.org/10.1073/pnas.1521230113

Kubo, H., 2018. Extracellular Vesicles in Lung Disease. Chest 153, 210–216. https://doi.org/10.1016/j.chest.2017.06.026

Kulshreshtha, A., Ahmad, T., Agrawal, A., Ghosh, B., 2013. Proinflammatory role of epithelial cell–derived exosomes in allergic airway inflammation. Journal of Allergy and Clinical Immunology 131, 1194-1203.e14. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.12.1565

Kyung, S.Y., Jeong, S.H., 2020. Particulate-Matter Related Respiratory Diseases. Tuberculosis and Respiratory Diseases 83, 116. https://doi.org/10.4046/trd.2019.0025

Lambrecht, B.N., Hammad, H., 2015. The immunology of asthma. Nature Immunology 16, 45–56. https://doi.org/10.1038/ni.3049

Landkocz, Y., Ledoux, F., André, V., Cazier, F., Genevray, P., Dewaele, D., Martin, P.J., Lepers, C., Verdin, A., Courcot, L., Boushina, S., Sichel, F., Gualtieri, M., Shirali, P., Courcot, D., Billet, S., 2017. Fine and ultrafine atmospheric particulate matter at a multi-influenced urban site: Physicochemical characterization, mutagenicity and cytotoxicity. Environmental Pollution 221, 130–140. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.11.054

Lanyu, Z., Feilong, H., 2019. Emerging role of extracellular vesicles in lung injury and inflammation. Biomedicine & Pharmacotherapy 113, 108748. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108748

Larigot, L., 2018. AhR signaling pathways and regulatory functions. Biochimie Open 9.

Larson, M.C., Hillery, C.A., Hogg, N., 2014. Circulating membrane-derived microvesicles in redox biology. Free Radical Biology and Medicine 73, 214–228. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.04.017

Lässer, C., O'Neil, S.E., Ekerljung, L., Ekström, K., Sjöstrand, M., Lötvall, J., 2011. RNA-containing Exosomes in Human Nasal Secretions. American Journal of Rhinology & Allergy 25, 89–93. https://doi.org/10.2500/ajra.2011.25.3573

Lawrence, S., Sokhi, R., Ravindra, K., 2016. Quantification of vehicle fleet PM 10 particulate matter emission factors from exhaust and non-exhaust sources using tunnel measurement techniques. Environmental Pollution 210, 419–428. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.01.011

Le Goff, M., Lagadic-Gossmann, D., Latour, R., Podechard, N., Grova, N., Gauffre, F., Chevance, S., Burel, A., Appenzeller, B.M.R., Ulmann, L., Sergent, O., Le Ferrec, E., 2019. PAHs increase the production of extracellular vesicles both in vitro in endothelial cells and in vivo in urines from rats. Environmental Pollution 255, 113171. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113171

Leclercq, B., Kluza, J., Antherieu, S., Sotty, J., Alleman, L.Y., Perdrix, E., Loyens, A., Coddeville, P., Lo Guidice, J.-M., Marchetti, P., Garçon, G., 2018. Air pollution-derived PM2.5 impairs mitochondrial function in healthy and chronic obstructive pulmonary diseased human bronchial epithelial cells. Environmental Pollution 243, 1434–1449. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.09.062

Ledoux, F., Roche, C., Cazier, F., Beaugard, C., Courcot, D., 2018. Influence of ship emissions on NOx, SO2, O3 and PM concentrations in a North-Sea harbor in France. Journal of Environmental Sciences 71, 56–66. https://doi.org/10.1016/j.jes.2018.03.030

Lee, H., Abston, E., Zhang, D., Rai, A., Jin, Y., 2018. Extracellular Vesicle: An Emerging Mediator of Intercellular Crosstalk in Lung Inflammation and Injury. Frontiers in Immunology 9. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00924

Lee, S.M.Y., Kok, K.-H., Jaume, M., Cheung, T.K.W., Yip, T.-F., Lai, J.C.C., Guan, Y., Webster, R.G., Jin, D.-Y., Peiris, J.S.M., 2014. Toll-like receptor 10 is involved in induction of innate immune responses to influenza virus infection. Proceedings of the National Academy of Sciences 111, 3793–3798. https://doi.org/10.1073/pnas.1324266111

Lelieveld, J., Evans, J.S., Fnais, M., Giannadaki, D., Pozzer, A., 2015. The contribution of outdoor air pollution sources to premature mortality on a global scale. Nature 525, 367–371. https://doi.org/10.1038/nature15371

Lelieveld, J., Klingmüller, K., Pozzer, A., Pöschl, U., Fnais, M., Daiber, A., Münzel, T., 2019. Cardiovascular disease burden from ambient air pollution in Europe reassessed using novel hazard ratio functions. European Heart Journal 40, 1590–1596. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz135

Lepers, C., Billet, S., Dergham, M., Gosset, P., Verdin, A., Garçon, G., Pottier, D., Andre, V., Shirali, P., Sichel, F., 2013. Génotoxicité comparée de particules atmosphériques PM2.5 en fonction de leur origine industrielle, urbaine ou rurale. Pollution atmosphérique. https://doi.org/10.4267/pollution-atmospherique.834

Li, J., Liu, Y., An, Z., Li, W., Zeng, X., Li, H., Jiang, J., Song, J., Wu, W., 2020. Seasonal Variations in PM2.5-induced Oxidative Stress and Up-regulation of Pro-inflammatory Mediators. Aerosol Air Qual. Res. 20, 679–687. https://doi.org/10.4209/aaqr.2019.06.0288

Li, J.-K., Liu, X.-D., Shen, L., Zeng, W.-M., Qiu, G.-Z., 2016. Natural plant polyphenols for alleviating oxidative damage in man: Current status and future perspectives. Tropical Journal of Pharmaceutical Research 15, 1089. https://doi.org/10.4314/tjpr.v15i5.27

Li, M., Yu, D., Williams, K.J., Liu, M.-L., 2010. Tobacco Smoke Induces the Generation of Procoagulant Microvesicles From Human Monocytes/Macrophages. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 30, 1818–1824. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.209577

Li, R., Ning, Z., Cui, J., Khalsa, B., Ai, L., Takabe, W., Beebe, T., Majumdar, R., Sioutas, C., Hsiai, T., 2009. Ultrafine particles from diesel engines induce vascular oxidative stress via JNK activation. Free Radical Biology and Medicine 46, 775–782. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.11.025

Li, R., Zhou, R., Zhang, J., 2018. Function of PM2.5 in the pathogenesis of lung cancer and chronic airway inflammatory diseases (Review). Oncol Lett. https://doi.org/10.3892/ol.2018.8355

Li, T., Hu, R., Chen, Z., Li, Q., Huang, S., Zhu, Z., Zhou, L.-F., 2018. Fine particulate matter (PM2.5): The culprit for chronic lung diseases in China. Chronic Diseases and Translational Medicine 4, 176–186. https://doi.org/10.1016/j.cdtm.2018.07.002

Li, W., Dorans, K.S., Wilker, E.H., Rice, M.B., Ljungman, P.L., Schwartz, J.D., Coull, B.A., Koutrakis, P., Gold, D.R., Keaney, J.F., Vasan, R.S., Benjamin, E.J., Mittleman, M.A., 2019. Short-term exposure to ambient air pollution and circulating biomarkers of endothelial cell activation: The Framingham Heart Study. Environmental Research 171, 36–43. https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.10.027

Li, Z.-G., Scott, M.J., Brzóska, T., Sundd, P., Li, Y.-H., Billiar, T.R., Wilson, M.A., Wang, P., Fan, J., 2018. Lung epithelial cell-derived IL-25 negatively regulates LPS-induced exosome release from macrophages. Military Med Res 5, 24. https://doi.org/10.1186/s40779-018-0173-6

Libalova, H., Milcova, A., Cervena, T., Vrbova, K., Rossnerova, A., Novakova, Z., Topinka, J., Rossner, P., 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, 50–58. https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.01.006

Lim, H., Kwon, H.-J., Lim, J.-A., Choi, J.H., Ha, M., Hwang, S.-S., Choi, W.-J., 2016. Short-term Effect of Fine Particulate Matter on Children's Hospital Admissions and Emergency Department Visits for Asthma: A Systematic Review and Meta-analysis. Journal of Preventive Medicine and Public Health 49, 205–219. https://doi.org/10.3961/jpmph.16.037

Lim, K.-M., Kim, S., Noh, J.-Y., Kim, K., Jang, W.-H., Bae, O.-N., Chung, S.-M., Chung, J.-H., 2010. Low-Level Mercury Can Enhance Procoagulant Activity of Erythrocytes: A New Contributing Factor for Mercury-Related Thrombotic Disease. Environmental Health Perspectives 118, 928–935. https://doi.org/10.1289/ehp.0901473

Liu, C.-W., Lee, T.-L., Chen, Y.-C., Liang, C.-J., Wang, S.-H., Lue, J.-H., Tsai, J.-S., Lee, S.-W., Chen, S.-H., Yang, Y.-F., Chuang, T.-Y., Chen, Y.-L., 2018. PM2.5-induced oxidative stress increases intercellular adhesion molecule-1 expression in lung epithelial cells through the IL-6/AKT/STAT3/NF-κB-dependent pathway. Part Fibre Toxicol 15, 4. https://doi.org/10.1186/s12989-018-0240-x

Liu, Y., Pan, J., Zhang, H., Shi, C., Li, G., Peng, Z., Ma, J., Zhou, Y., Zhang, L., 2019. Short-Term Exposure to Ambient Air Pollution and Asthma Mortality. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 200, 24–32. https://doi.org/10.1164/rccm.201810-1823OC

Llorente, A., Skotland, T., Sylvänne, T., Kauhanen, D., Róg, T., Orłowski, A., Vattulainen, I., Ekroos, K., Sandvig, K., 2013. Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids 1831, 1302–1309. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.04.011

Lodovici, M., Bigagli, E., 2011. Oxidative Stress and Air Pollution Exposure. Journal of Toxicology 2011, 1–9. https://doi.org/10.1155/2011/487074

Longhin, E., Holme, J.A., Gualtieri, M., Camatini, M., Øvrevik, J., 2018. Milan winter fine particulate matter (wPM2.5) induces IL-6 and IL-8 synthesis in human bronchial BEAS-2B cells, but specifically impairs IL-8 release. Toxicology in Vitro 52, 365–373. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.07.016

Longhin, E., Holme, J.A., Gutzkow, K.B., Arlt, V.M., Kucab, J.E., Camatini, M., Gualtieri, M., 2013. Cell cycle alterations induced by urban PM2.5 in bronchial epithelial cells: characterization of the process and possible mechanisms involved. Part Fibre Toxicol 10, 63. https://doi.org/10.1186/1743-8977-10-63

Loomis, D., Grosse, Y., Lauby-Secretan, B., Ghissassi, F.E., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Baan, R., Mattock, H., Straif, K., 2013. The carcinogenicity of outdoor air pollution. The Lancet Oncology 14, 1262–1263. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70487-X

LSCQA, 2020. Evolution sur le long terme de la composition chimique des PM2,5.

Lu, Y.-C., Yeh, W.-C., Ohashi, P.S., 2008. LPS/TLR4 signal transduction pathway. Cytokine 42, 145–151. https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.01.006

Lu, Z., Zhang, Q., Streets, D.G., 2011. Sulfur dioxide and primary carbonaceous aerosol emissions in China and India, 1996–2010. Atmos. Chem. Phys. 11, 9839–9864. https://doi.org/10.5194/acp-11-9839-2011

Lukic, A., Ji, J., Idborg, H., Samuelsson, B., Palmberg, L., Gabrielsson, S., Rådmark, O., 2016. Pulmonary epithelial cancer cells and their exosomes metabolize myeloid cell-derived leukotriene C4 to leukotriene D4. Journal of Lipid Research 57, 1659–1669. https://doi.org/10.1194/jlr.M066910

Lushchak, V.I., 2014. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. Chemico-Biological Interactions 224, 164–175. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.10.016

M. Guevara, G., 2016. Emissions of Primary Particulate Matter.

Ma, J.Y.C., Ma, J.K.H., 2002. The dual effect of the particulate and organic components of diesel exhaust particles on the alteration of pulmonary immune/inflammatory responses and metabolic enzymes. Journal of Environmental Science and Health, Part C 20, 117–147. https://doi.org/10.1081/GNC-120016202

Ma, Q., 2013. Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 53, 401–426. https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320

Maas, S.L.N., Breakefield, X.O., Weaver, A.M., 2017. Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles. Trends in Cell Biology 27, 172–188. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.11.003

Macherey, A.-C., Dansette, P.M., 2015. Biotransformations Leading to Toxic Metabolites, in: The Practice of Medicinal Chemistry. Elsevier, pp. 585–614. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417205-0.00025-0

MacIntyre, E.A., Gehring, U., Mölter, A., Fuertes, E., Klümper, C., Krämer, U., Quass, U., Hoffmann, B., Gascon, M., Brunekreef, B., Koppelman, G.H., Beelen, R., Hoek, G., Birk, M., de Jongste, J.C., Smit, H.A., Cyrys, J., Gruzieva, O., Korek, M., Bergström, A., Agius, R.M., de Vocht, F., Simpson, A., Porta, D., Forastiere, F., Badaloni, C., Cesaroni, G., Esplugues, A., Fernández-Somoano, A., Lerxundi, A., Sunyer, J., Cirach, M., Nieuwenhuijsen, M.J., Pershagen, G., Heinrich, J., 2014. Air Pollution and Respiratory Infections during Early Childhood: An Analysis of 10 European Birth Cohorts within the ESCAPE Project. Environmental Health Perspectives 122, 107–113. https://doi.org/10.1289/ehp.1306755

Manček-Keber, M., Frank-Bertoncelj, M., Hafner-Bratkovič, I., Smole, A., Zorko, M., Pirher, N., Hayer, S., Kralj-Iglič, V., Rozman, B., Ilc, N., Horvat, S., Jerala, R., 2015. Toll-like receptor 4 senses oxidative stress mediated by the oxidation of phospholipids in extracellular vesicles. Sci. Signal. 8. https://doi.org/10.1126/scisignal.2005860

Manigrasso, M., Capannesi, G., Rosada, A., Lammardo, M., Ceci, P., Petrucci, A., Avino, P., 2020. Deep Inorganic Fraction Characterization of PM10, PM2.5, and PM1 in an Industrial Area Located in Central Italy by Means of Instrumental Neutron Activation Analysis. Applied Sciences 10, 2532. https://doi.org/10.3390/app10072532

Manisalidis, I., Stavropoulou, E., Stavropoulos, A., Bezirtzoglou, E., 2020. Environmental and Health Impacts of Air Pollution: A Review. Frontiers in Public Health 8. https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.00014

Mar, V., Querol, X., Alastuey, A., Colette, A., Couvidat, F., Drevet, J., Bessagne, B., Lükewille, A., 2016. Secondary inorganic aerosols from agriculture in Europe.

Marinković, N., Pašalić, D., Potočki, S., 2013. Polymorphisms of genes involved in polycyclic aromatic hydrocarbons'biotransformation and atherosclerosis. Biochem Med 255–265. https://doi.org/10.11613/BM.2013.032

Martin, P.J., Héliot, A., Trémolet, G., Landkocz, Y., Dewaele, D., Cazier, F., Ledoux, F., Courcot, D., 2019a. Cellular response and extracellular vesicles characterization of human macrophages exposed to fine atmospheric particulate matter. Environmental Pollution 254, 112933. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.07.101

Martin, P.J., Héliot, A., Trémolet, G., Landkocz, Y., Dewaele, D., Cazier, F., Ledoux, F., Courcot, D., 2019b. Cellular response and extracellular vesicles characterization of human macrophages exposed to fine atmospheric particulate matter. Environmental Pollution 254, 112933. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.07.101

Masyuk, A.I., Huang, B.Q., Ward, C.J., Gradilone, S.A., Banales, J.M., Masyuk, T.V., Radtke, B., Splinter, P.L., LaRusso, N.F., 2010. Biliary exosomes influence cholangiocyte regulatory mechanisms and proliferation through interaction with primary cilia. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology 299, G990–G999. https://doi.org/10.1152/ajpgi.00093.2010

Mateescu, B., Kowal, E.J.K., van Balkom, B.W.M., Bartel, S., Bhattacharyya, S.N., Buzás, E.I., Buck, A.H., de Candia, P., Chow, F.W.N., Das, S., Driedonks, T.A.P., Fernández-Messina, L., Haderk, F., Hill, A.F., Jones, J.C., Van Keuren-Jensen, K.R., Lai, C.P., Lässer, C., di Liegro, I., Lunavat, T.R., Lorenowicz, M.J., Maas, S.L.N., Mäger, I., Mittelbrunn, M., Momma, S., Mukherjee, K., Nawaz, M., Pegtel, D.M., Pfaffl, M.W., Schiffelers, R.M., Tahara, H., Théry, C., Tosar, J.P., Wauben, M.H.M., Witwer, K.W., Nolte-'t Hoen, E.N.M., 2017. Obstacles and opportunities in the functional analysis of extracellular vesicle RNA – an ISEV position paper. Journal of Extracellular Vesicles 6, 1286095. https://doi.org/10.1080/20013078.2017.1286095

Matsumoto, A., Takahashi, Y., Nishikawa, M., Sano, K., Morishita, M., Charoenviriyakul, C., Saji, H., Takakura, Y., 2017. Accelerated growth of B16 BL 6 tumor in mice through efficient uptake of their own exosomes by B16 BL 6 cells. Cancer Science 108, 1803–1810. https://doi.org/10.1111/cas.13310

Matsumoto, Y., Ide, F., Kishi, R., Akutagawa, T., Sakai, S., Nakamura, M., Ishikawa, T., Fujii-Kuriyama, Y., Nakatsuru, Y., 2007. Aryl Hydrocarbon Receptor Plays a Significant Role in Mediating Airborne Particulate-Induced Carcinogenesis in Mice. Environmental Science & Technology 41, 3775–3780. https://doi.org/10.1021/es062793g

Mazuryk, O., Stochel, G., Brindell, M., 2020. Variations in Reactive Oxygen Species Generation by Urban Airborne Particulate Matter in Lung Epithelial Cells—Impact of Inorganic Fraction. Front. Chem. 8, 581752. https://doi.org/10.3389/fchem.2020.581752

Mazzeo, C., Cañas, J.A., Zafra, M.P., Rojas Marco, A., Fernández-Nieto, M., Sanz, V., Mittelbrunn, M., Izquierdo, M., Baixaulli, F., Sastre, J., del Pozo, V., 2015. Exosome secretion by eosinophils: A possible role in asthma pathogenesis. Journal of Allergy and Clinical Immunology 135, 1603–1613. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.11.026

McAndrews, K.M., Kalluri, R., 2019. Mechanisms associated with biogenesis of exosomes in cancer. Molecular Cancer 18. https://doi.org/10.1186/s12943-019-0963-9

McBride, M.W., Brosnan, M.J., Mathers, J., McLellan, L.I., Miller, W.H., Graham, D., Hanlon, N., Hamilton, C.A., Polke, J.M., Lee, W.K., Dominiczak, A.F., 2005. Reduction of *Gstm1* Expression in the Stroke-Prone Spontaneously Hypertension Rat Contributes to Increased Oxidative Stress. Hypertension 45, 786–792. https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000154879.49245.39

McDonald, M.K., Tian, Y., Qureshi, R.A., Gormley, M., Ertel, A., Gao, R., Aradillas Lopez, E., Alexander, G.M., Sacan, A., Fortina, P., Ajit, S.K., 2014. Functional significance of macrophage-derived exosomes in inflammation and pain. Pain 155, 1527–1539. https://doi.org/10.1016/j.pain.2014.04.029

McMahon, H.T., Boucrot, E., 2015. Membrane curvature at a glance. Journal of Cell Science 128, 1065–1070. https://doi.org/10.1242/jcs.114454

McVey, M.J., Spring, C.M., Semple, J.W., Maishan, M., Kuebler, W.M., 2016. Microparticles as biomarkers of lung disease: enumeration in biological fluids using lipid bilayer microspheres. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology 310, L802–L814. https://doi.org/10.1152/ajplung.00369.2015

Menck, K., Bleckmann, A., Schulz, M., Ries, L., Binder, C., 2017. Isolation and Characterization of Microvesicles from Peripheral Blood. Journal of Visualized Experiments. https://doi.org/10.3791/55057

Meulenbelt, J., 2012. Nitrogen and nitrogen oxides. Medicine 40, 139. https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2011.12.020

Mills, J.T., Schwenzer, A., Marsh, E.K., Edwards, M.R., Sabroe, I., Midwood, K.S., Parker, L.C., 2019. Airway Epithelial Cells Generate Pro-inflammatory Tenascin-C and Small Extracellular Vesicles in Response to TLR3 Stimuli and Rhinovirus Infection. Front. Immunol. 10, 1987. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01987

Mills, P.R., Davies, R.J., Devalia, J.L., 1999. Airway Epithelial Cells, Cytokines, and Pollutants. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 160, S38–S43. https://doi.org/10.1164/ajrccm.160.supplement_1.11

Mitsuhashi, M., Taub, D.D., Kapogiannis, D., Eitan, E., Zukley, L., Mattson, M.P., Ferrucci, L., Schwartz, J.B., Goetzl, E.J., 2013. Aging enhances release of exosomal cytokine mRNAs by $A\beta_{1\text{-}42}$ -stimulated macrophages. The FASEB Journal 27, 5141–5150. https://doi.org/10.1096/fj.13-238980

Mittelbrunn, M., Gutiérrez-Vázquez, C., Villarroya-Beltri, C., González, S., Sánchez-Cabo, F., González, M.Á., Bernad, A., Sánchez-Madrid, F., 2011. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. Nature Communications 2. https://doi.org/10.1038/ncomms1285

Miyoshi, H., Umeshita, K., Sakon, M., Imajoh-Ohmi, S., Fujitani, K., Gotoh, M., Oiki, E., Kambayashi, J., Monden, M., 1996. Calpain activation in plasma membrane bleb formation during tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatocyte injury. Gastroenterology 110, 1897–1904. https://doi.org/10.1053/gast.1996.v110.pm8964416

Mohan, S., Gupta, D., 2018. Crosstalk of toll-like receptors signaling and Nrf2 pathway for regulation of inflammation. Biomedicine & Pharmacotherapy 108, 1866–1878. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.019

Montigny, C., Lyons, J., Champeil, P., Nissen, P., Lenoir, G., 2016. On the molecular mechanism of flippase- and scramblase-mediated phospholipid transport. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids 1861, 767–783. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2015.12.020

Moorthy, B., Chu, C., Carlin, D.J., 2015. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: From Metabolism to Lung Cancer. Toxicological Sciences 145, 5–15. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv040

Mulcahy, L.A., Pink, R.C., Carter, D.R.F., 2014. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. Journal of Extracellular Vesicles 3, 24641. https://doi.org/10.3402/jev.v3.24641

Nagano, T., Katsurada, M., Dokuni, R., Hazama, D., Kiriu, T., Umezawa, K., Kobayashi, K., Nishimura, Y., 2019. Crucial Role of Extracellular Vesicles in Bronchial Asthma. International Journal of Molecular Sciences 20, 2589. https://doi.org/10.3390/ijms20102589

Nebert, D.W., Dalton, T.P., Okey, A.B., Gonzalez, F.J., 2004. Role of Aryl Hydrocarbon Receptor-mediated Induction of the CYP1 Enzymes in Environmental Toxicity and Cancer. Journal of Biological Chemistry 279, 23847–23850. https://doi.org/10.1074/jbc.R400004200

Nemery, B., Hoet, P.H., Nemmar, A., 2001. The Meuse Valley fog of 1930: an air pollution disaster. The Lancet 357, 704–708. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04135-0

Neri, T., Pergoli, L., Petrini, S., Gravendonk, L., Balia, C., Scalise, V., Amoruso, A., Pedrinelli, R., Paggiaro, P., Bollati, V., Celi, A., 2016. Particulate matter induces prothrombotic microparticle shedding by human mononuclear and endothelial cells. Toxicology in Vitro 32, 333–338. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.02.001

Ni, Y., Shi, G., Qu, J., 2020. Indoor PM2.5, tobacco smoking and chronic lung diseases: A narrative review. Environmental Research 181, 108910. https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108910

Nicol, C.J., Zielenski, J., Tsui, L., Wells, P.G., 2000. An embryoprotective role for glucose-6-phosphate dehydrogenase in developmental oxidative stress and chemical teratogenesis. The FASEB Journal 14, 111–127. https://doi.org/10.1096/fasebj.14.1.111

Nielsen, G.D., Larsen, S.T., Wolkoff, P., 2017. Re-evaluation of the WHO (2010) formaldehyde indoor air quality guideline for cancer risk assessment. Archives of Toxicology 91, 35–61. https://doi.org/10.1007/s00204-016-1733-8

Novelli, F., Neri, T., Tavanti, L., Armani, C., Noce, C., Falaschi, F., Bartoli, M.L., Martino, F., Palla, A., Celi, A., Paggiaro, P., 2014. Procoagulant, Tissue Factor-Bearing Microparticles in Bronchoalveolar Lavage of Interstitial Lung Disease Patients: An Observational Study. PLoS ONE 9, e95013. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095013

Nurkiewicz, T.R., Frisbee, J.C., Boegehold, M.A., 2010. Assessment of Vascular Reactivity 16.

Oberdörster, G., Oberdörster, E., Oberdörster, J., 2005. Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. Environmental Health Perspectives 113, 823–839. https://doi.org/10.1289/ehp.7339

Oberdörster, G., Sharp, Z., Atudorei, V., Elder, A., Gelein, R., Lunts, A., Kreyling, W., Cox, C., 2002. Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A 65, 1531–1543. https://doi.org/10.1080/00984100290071658

O'Farrell, H.E., Yang, I.A., 2019. Extracellular vesicles in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). J. Thorac. Dis. 11, S2141–S2154. https://doi.org/10.21037/jtd.2019.10.16

Ogawa, Y., Kanai-Azuma, M., Akimoto, Y., Kawakami, H., Yanoshita, R., 2008. Exosome-Like Vesicles with Dipeptidyl Peptidase IV in Human Saliva. Biological & Pharmaceutical Bulletin 31, 1059–1062. https://doi.org/10.1248/bpb.31.1059

Ogino, K., Nagaoka, K., Okuda, T., Oka, A., Kubo, M., Eguchi, E., Fujikura, Y., 2017. PM2.5-induced airway inflammation and hyperresponsiveness in NC/Nga mice: PM2.5 INDUCES AIRWAY INFLAMMATION. Environmental Toxicology 32, 1047–1054. https://doi.org/10.1002/tox.22303

Oneal, R.M., Beil, R.J., Schlesinger, J., 1999. Surgical anatomy of the nose 37.

Øvrevik, J., Låg, M., Lecureur, V., Gilot, D., Lagadic-Gossmann, D., Refsnes, M., Schwarze, P.E., Skuland, T., Becher, R., Holme, J.A., 2014. AhR and Arnt differentially regulate NF-κB signaling and chemokine responses in human bronchial epithelial cells. Cell Commun Signal 12, 48. https://doi.org/10.1186/s12964-014-0048-8

Owens, A.P., Mackman, N., 2011. Microparticles in Hemostasis and Thrombosis. Circulation Research 108, 1284–1297. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.233056

Pa, E.M., O'Neill, L.A.J., 2004. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4 10.

Pan, B.-T., Johnstone, R.M., 1983. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: Selective externalization of the receptor. Cell 33, 967–978. https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90040-5

Pang, Y., Huang, W., Luo, X.-S., Chen, Q., Zhao, Z., Tang, M., Hong, Y., Chen, J., Li, H., 2020. In-vitro human lung cell injuries induced by urban PM2.5 during a severe air pollution episode: Variations associated with particle components. Ecotoxicology and Environmental Safety 206, 111406. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111406

Park, E.-Y., Hong, Y.-C., Lee, K.-H., Im, M.-W., Ha, E., Kim, Y.J., Ha, M., 2008. Maternal exposure to environmental tobacco smoke, GSTM1/T1 polymorphisms and oxidative stress. Reproductive Toxicology 26, 197–202. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2008.08.010

Park, M., Joo, H.S., Lee, K., Jang, M., Kim, S.D., Kim, I., Borlaza, L.J.S., Lim, H., Shin, H., Chung, K.H., Choi, Y.-H., Park, S.G., Bae, M.-S., Lee, J., Song, H., Park, K., 2018. Differential toxicities of fine particulate matters from various sources. Scientific Reports 8. https://doi.org/10.1038/s41598-018-35398-0

Pasquet, J.-M., Dachary-Prigent, J., Nurden, A.T., 1996. Calcium Influx is a Determining Factor of Calpain Activation and Microparticle Formation in Platelets. European Journal of Biochemistry 239, 647–654. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.0647u.x

Patterson, A.D., Gonzalez, F.J., Idle, J.R., 2010. Xenobiotic Metabolism: A View through the Metabolometer. Chemical Research in Toxicology 23, 851–860. https://doi.org/10.1021/tx100020p

Patwa, A., Shah, A., 2015. Anatomy and physiology of respiratory system relevant to anaesthesia. Indian Journal of Anaesthesia 59, 533. https://doi.org/10.4103/0019-5049.165849

Pavanello, S., Bonzini, M., Angelici, L., Motta, V., Pergoli, L., Hoxha, M., Cantone, L., Pesatori, A.C., Apostoli, P., Tripodi, A., Baccarelli, A., Bollati, V., 2016. Extracellular vesicle-driven information mediates the long-term effects of particulate matter exposure on coagulation and inflammation pathways. Toxicology Letters 259, 143–150. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.08.002

Pei, X.-H., Nakanishi, Y., Inoue, H., Takayama, K., Bai, F., Hara, N., 2002. POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS INDUCE IL-8 EXPRESSION THROUGH NUCLEAR FACTOR κB ACTIVATION IN A549 CELL LINE. Cytokine 19, 236–241. https://doi.org/10.1006/cyto.2002.1967

Pereira, C.E.L., Heck, T.G., Saldiva, P.H.N., Rhoden, C.R., 2007. Ambient particulate air pollution from vehicles promotes lipid peroxidation and inflammatory responses in rat lung. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 40, 1353–1359. https://doi.org/10.1590/S0100-879X2006005000164

Pergoli, L., Cantone, L., Favero, C., Angelici, L., Iodice, S., Pinatel, E., Hoxha, M., Dioni, L., Letizia, M., Albetti, B., Tarantini, L., Rota, F., Bertazzi, P.A., Tirelli, A.S., Dolo, V., Cattaneo, A., Vigna, L., Battaglia, C., Carugno, M., Bonzini, M., Pesatori, A.C., Bollati, V., 2017. Extracellular vesicle-packaged miRNA release after short-term exposure to particulate matter is associated with increased coagulation. Particle and Fibre Toxicology 14. https://doi.org/10.1186/s12989-017-0214-4

Phuyal, S., Hessvik, N.P., Skotland, T., Sandvig, K., Llorente, A., 2014. Regulation of exosome release by glycosphingolipids and flotillins. FEBS Journal 281, 2214–2227. https://doi.org/10.1111/febs.12775

Pilcer, G., Amighi, K., 2010. Formulation strategy and use of excipients in pulmonary drug delivery. International Journal of Pharmaceutics 392, 1–19. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.03.017

Piqueras, P., Vizenor, A., 2016. The rapidly growing death toll attributed to air pollution: A global responsibility 4.

Pisitkun, T., Shen, R.-F., Knepper, M.A., 2004. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. Proceedings of the National Academy of Sciences 101, 13368–13373. https://doi.org/10.1073/pnas.0403453101

Plé, C., Fan, Y., Ait Yahia, S., Vorng, H., Everaere, L., Chenivesse, C., Balsamelli, J., Azzaoui, I., de Nadai, P., Wallaert, B., Lazennec, G., Tsicopoulos, A., 2015. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Reciprocally Regulate IL-22 and IL-17 Cytokines in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Both Healthy and Asthmatic Subjects. PLOS ONE 10, e0122372. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122372

Płóciennikowska, A., Hromada-Judycka, A., Borzęcka, K., Kwiatkowska, K., 2015. Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. Cell. Mol. Life Sci. 72, 557–581. https://doi.org/10.1007/s00018-014-1762-5

Plopper, C.G., Harkema, J.R., 2005. The Respiratory System and its Use in Research, in: The Laboratory Primate. Elsevier, pp. 503–526. https://doi.org/10.1016/B978-012080261-6/50030-1

Poliakov, A., Spilman, M., Dokland, T., Amling, C.L., Mobley, J.A., 2009. Structural heterogeneity and protein composition of exosome-like vesicles (prostasomes) in human semen. The Prostate 69, 159–167. https://doi.org/10.1002/pros.20860

Poole, L.B., 2015. The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry. Free Radical Biology and Medicine 80, 148–157. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.11.013

Pope, C.A., Bhatnagar, A., McCracken, J.P., Abplanalp, W., Conklin, D.J., O'Toole, T., 2016. Exposure to Fine Particulate Air Pollution Is Associated With Endothelial Injury and Systemic Inflammation. Circulation Research 119, 1204–1214. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309279

Pope, C.A., Coleman, N., Pond, Z.A., Burnett, R.T., 2020. Fine particulate air pollution and human mortality: 25+ years of cohort studies. Environmental Research 183, 108924. https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108924

Porcelli, S.A., 2017. Innate Immunity, in: Kelley and Firestein's Textbook of Rheumatology. Elsevier, pp. 274–287. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-31696-5.00017-6

Prada, I., Meldolesi, J., 2016. Binding and Fusion of Extracellular Vesicles to the Plasma Membrane of Their Cell Targets. International Journal of Molecular Sciences 17, 1296. https://doi.org/10.3390/ijms17081296

Pratviel, G., 2012. Oxidative DNA Damage Mediated by Transition Metal Ions and Their Complexes, in: Sigel, A., Sigel, H., Sigel, R.K.O. (Eds.), Interplay between Metal Ions and Nucleic Acids. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 201–216. https://doi.org/10.1007/978-94-007-2172-2_7

Pražnikar, Z., Pražnikar, J., 2012. The effects of particulate matter air pollution on respiratory health and on the cardiovascular system. Slovenian Journal of Public Health 51, 190–199. https://doi.org/10.2478/v10152-012-0022-z

Pryor, W.A., Houk, K.N., Foote, C.S., Fukuto, J.M., Ignarro, L.J., Squadrito, G.L., Davies, K.J.A., 2006. Free radical biology and medicine: it's a gas, man! American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 291, R491–R511. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00614.2005

Puchelle, E., Zahm, J.-M., Tournier, J.-M., Coraux, C., 2006. Airway Epithelial Repair, Regeneration, and Remodeling after Injury in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Proceedings of the American Thoracic Society 3, 726–733. https://doi.org/10.1513/pats.200605-126SF

Puddu, P., Puddu, G.M., Cravero, E., Muscari, S., Muscari, A., 2010. The involvement of circulating microparticles in inflammation, coagulation and cardiovascular diseases. Canadian Journal of Cardiology 26, e140–e145. https://doi.org/10.1016/S0828-282X(10)70371-8

Puga, A., Ma, C., Marlowe, J.L., 2009. The aryl hydrocarbon receptor cross-talks with multiple signal transduction pathways. Biochemical Pharmacology 77, 713–722. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.08.031

Raaschou-Nielsen, O., Andersen, Z.J., Beelen, R., 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, 813–822. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70279-1

Raghunath, A., Sundarraj, K., Nagarajan, R., Arfuso, F., Bian, J., Kumar, A.P., Sethi, G., Perumal, E., 2018. Antioxidant response elements: Discovery, classes, regulation and potential applications. Redox Biology 17, 297–314. https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.05.002

Raiborg, C., Stenmark, H., 2009. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. Nature 458, 445–452. https://doi.org/10.1038/nature07961

Rana, S., Malinowska, K., Zöller, M., 2013. Exosomal Tumor MicroRNA Modulates Premetastatic Organ Cells. Neoplasia 15, 281-IN31. https://doi.org/10.1593/neo.122010

Rao, X., Zhong, J., Brook, R.D., Rajagopalan, S., 2018. Effect of Particulate Matter Air Pollution on Cardiovascular Oxidative Stress Pathways. Antioxidants & Redox Signaling 28, 797–818. https://doi.org/10.1089/ars.2017.7394

Raposo, G., Nijman, H.W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C.V., Melief, C.J., Geuze, H.J., 1996. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. The Journal of Experimental Medicine 183, 1161–1172. https://doi.org/10.1084/jem.183.3.1161

Raposo, G., Stoorvogel, W., 2013. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. The Journal of Cell Biology 200, 373–383. https://doi.org/10.1083/jcb.201211138

Reboul, C., Boissière, J., André, L., Meyer, G., Bideaux, P., Fouret, G., Feillet-Coudray, C., Obert, P., Lacampagne, A., Thireau, J., Cazorla, O., Richard, S., 2017. Carbon monoxide pollution

aggravates ischemic heart failure through oxidative stress pathway. Sci Rep 7, 39715. https://doi.org/10.1038/srep39715

Regan, T., Nally, K., Carmody, R., Houston, A., Shanahan, F., MacSharry, J., Brint, E., 2013. Identification of TLR10 as a Key Mediator of the Inflammatory Response to *Listeria monocytogenes* in Intestinal Epithelial Cells and Macrophages. The Journal of Immunology 191, 6084–6092. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203245

Reikard, G., 2019. Volcanic emissions and air pollution: Forecasts from time series models. Atmospheric Environment: X 1, 100001. https://doi.org/10.1016/j.aeaoa.2018.100001

Ren, F., Ji, C., Huang, Y., Aniagu, S., Jiang, Y., Chen, T., 2020. AHR-mediated ROS production contributes to the cardiac developmental toxicity of PM2.5 in zebrafish embryos. Science of The Total Environment 719, 135097. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135097

Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M., Aggarwal, B.B., 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? Free Radical Biology and Medicine 49, 1603–1616. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006

Revenfeld, A.L.S., Bæk, R., Nielsen, M.H., Stensballe, A., Varming, K., Jørgensen, M., 2014. Diagnostic and Prognostic Potential of Extracellular Vesicles in Peripheral Blood. Clinical Therapeutics 36, 830–846. https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2014.05.008

Risom, L., Møller, P., Loft, S., 2005. Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 592, 119–137. https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.06.012

Rock, K.L., Lai, J.-J., Kono, H., 2011. Innate and adaptive immune responses to cell death: Immunological reaction to cell death. Immunological Reviews 243, 191–205. https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01040.x

Rodosthenous, R.S., Coull, B.A., Lu, Q., Vokonas, P.S., Schwartz, J.D., Baccarelli, A.A., 2015. Ambient particulate matter and microRNAs in extracellular vesicles: a pilot study of older individuals. Particle and Fibre Toxicology 13. https://doi.org/10.1186/s12989-016-0121-0

Roh, J.S., Sohn, D.H., 2018. Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. Immune Network 18. https://doi.org/10.4110/in.2018.18.e27

Roper, C., Chubb, L.G., Cambal, L., Tunno, B., Clougherty, J.E., Fattman, C., Mischler, S.E., 2017. Association of IL-6 with PM2.5 Components: Importance of Characterizing Filter-Based PM2.5 Following Extraction. Water Air Soil Pollut 228, 43. https://doi.org/10.1007/s11270-016-3219-y

Rota, F., Ferrari, L., Hoxha, M., Favero, C., Antonioli, R., Pergoli, L., Greco, M.F., Mariani, J., Lazzari, L., Bollati, V., 2020. Blood-derived extracellular vesicles isolated from healthy donors exposed to air pollution modulate in vitro endothelial cells behavior. Sci Rep 10, 20138. https://doi.org/10.1038/s41598-020-77097-9

Royo, F., Théry, C., Falcón-Pérez, J.M., Nieuwland, R., Witwer, K.W., 2020. Methods for Separation and Characterization of Extracellular Vesicles: Results of a Worldwide Survey Performed by the ISEV Rigor and Standardization Subcommittee. Cells 9, 1955. https://doi.org/10.3390/cells9091955

Russell, A.E., Sneider, A., Witwer, K.W., et al., 2019. Biological membranes in EV biogenesis, stability, uptake, and cargo transfer: an ISEV position paper arising from the ISEV membranes and EVs workshop. Journal of Extracellular Vesicles 8, 1684862. https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1684862

Ryu, A.-R., Kim, D.H., Kim, E., Lee, M.Y., 2018. The Potential Roles of Extracellular Vesicles in Cigarette Smoke-Associated Diseases. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2018, 1–8. https://doi.org/10.1155/2018/4692081

Ryu, Y.S., Kang, K.A., Piao, M.J., Ahn, M.J., Yi, J.M., Hyun, Y.-M., Kim, S.H., Ko, M.K., Park, C.O., Hyun, J.W., 2019. Particulate matter induces inflammatory cytokine production via activation of NFκB by TLR5-NOX4-ROS signaling in human skin keratinocyte and mouse skin. Redox Biology 21, 101080. https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.101080

Sachdeva, M., Karan, M., Singh, T., Dhingra, S., 2014. Oxidants and Antioxidants in Complementary and Alternative Medicine: A Review. Spatula DD - Peer Reviewed Journal on Complementary Medicine and Drug Discovery 4, 1. https://doi.org/10.5455/spatula.20140131074751

Saengtienchai, A., Ikenaka, Y., Nakayama, S.M.M., Mizukawa, H., Kakehi, M., Bortey-Sam, N., Darwish, W.S., Tsubota, T., Terasaki, M., Poapolathep, A., Ishizuka, M., 2014. Identification of interspecific differences in phase II reactions: Determination of metabolites in the urine of 16 mammalian species exposed to environmental pyrene: Interspecific differences in phase II reaction of pyrene. Environmental Toxicology and Chemistry 33, 2062–2069. https://doi.org/10.1002/etc.2656

Saint-Georges, F., Abbas, I., Billet, S., Verdin, A., Gosset, P., Mulliez, P., Shirali, P., Garçon, G., 2008. Gene expression induction of volatile organic compound and/or polycyclic aromatic hydrocarbon-metabolizing enzymes in isolated human alveolar macrophages in response to airborne particulate matter ($PM_{2.5}$). Toxicology 244, 220–230. https://doi.org/10.1016/j.tox.2007.11.016

Sancini, G., Farina, F., Battaglia, C., Cifola, I., Mangano, E., Mantecca, P., Camatini, M., Palestini, P., 2014. Health Risk Assessment for Air Pollutants: Alterations in Lung and Cardiac Gene Expression in Mice Exposed to Milano Winter Fine Particulate Matter (PM2.5). PLoS ONE 9, e109685. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109685

Sato, H., Sone, H., Sagai, M., Suzuki, K.T., Aoki, Y., 2000. Increase in mutation frequency in lung of Big Blue® rat by exposure to diesel exhaust 9.

Satta, N., Toti, F., Feugeas, O., Bohbot, A., Dachary-Prigent, J., Hedman, H., Freyssinet, J.M., 1994. Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide. 12.

Schmidt, J.V., Bradfield, C.A., 1996. AH RECEPTOR SIGNALING PATHWAYS. Annual Review of Cell and Developmental Biology 12, 55–89. https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.12.1.55

Schmidt, O., Teis, D., 2012. The ESCRT machinery. Current Biology 22, R116–R120. https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.01.028

Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. Nat Protoc 3, 1101–1108. https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73

Schraufnagel, D.E., Balmes, J.R., Cowl, C.T., De Matteis, S., Jung, S.-H., Mortimer, K., Perez-Padilla, R., Rice, M.B., Riojas-Rodriguez, H., Sood, A., Thurston, G.D., To, T., Vanker, A., Wuebbles,

D.J., 2019. Air Pollution and Noncommunicable Diseases. Chest 155, 417–426. https://doi.org/10.1016/j.chest.2018.10.041

Schwab, M. (Ed.), 2011. Encyclopedia of Cancer. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-16483-5

Schwarze, P.E., Totlandsdal, A.I., Låg, M., Refsnes, M., Holme, J.A., Øvrevik, J., 2013. Inflammation-Related Effects of Diesel Engine Exhaust Particles: Studies on Lung Cells *In Vitro*. BioMed Research International 2013, 1–13. https://doi.org/10.1155/2013/685142

Sharath Babu, G.R., Anand, T., Ilaiyaraja, N., Khanum, F., Gopalan, N., 2017. Pelargonidin Modulates Keap1/Nrf2 Pathway Gene Expression and Ameliorates Citrinin-Induced Oxidative Stress in HepG2 Cells. Front. Pharmacol. 8, 868. https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00868

Shen, Y., Zhang, Z.-H., Hu, D., Ke, X., Gu, Z., Zou, Q.-Y., Hu, G.-H., Song, S.-H., Kang, H.-Y., Hong, S.-L., 2018. The airway inflammation induced by nasal inoculation of PM2.5 and the treatment of bacterial lysates in rats. Sci Rep 8, 9816. https://doi.org/10.1038/s41598-018-28156-9

Shimaoka, M., Kawamoto, E., Gaowa, A., Okamoto, T., Park, E., 2019. Connexins and Integrins in Exosomes. Cancers 11, 106. https://doi.org/10.3390/cancers11010106

Shoenfelt, J., Mitkus, R.J., Zeisler, R., Spatz, R.O., Powell, J., Fenton, M.J., Squibb, K.A., Medvedev, A.E., 2009. Involvement of TLR2 and TLR4 in inflammatory immune responses induced by fine and coarse ambient air particulate matter. Journal of Leukocyte Biology 86, 303–312. https://doi.org/10.1189/jlb.1008587

Shukla, A., Timblin, C., BeruBe, K., Gordon, T., McKinney, W., Driscoll, K., Vacek, P., Mossman, B.T., 2000. Inhaled Particulate Matter Causes Expression of Nuclear Factor (NF)- κ B–Related Genes and Oxidant-Dependent NF- κ B Activation *In Vitro*. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology 23, 182–187. https://doi.org/10.1165/ajrcmb.23.2.4035

Shuster-Meiseles, T., Shafer, M.M., Heo, J., Pardo, M., Antkiewicz, D.S., Schauer, J.J., Rudich, A., Rudich, Y., 2016. ROS-generating/ARE-activating capacity of metals in roadway particulate matter deposited in urban environment. Environmental Research 146, 252–262. https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.01.009

Sies, H., 2019. Oxidative Stress, in: Stress: Physiology, Biochemistry, and Pathology. Elsevier, pp. 153–163. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813146-6.00013-8

Skog, J., Würdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D.H., Gainche, L., Curry, W.T., Carter, B.S., Krichevsky, A.M., Breakefield, X.O., 2008. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. Nature Cell Biology 10, 1470–1476. https://doi.org/10.1038/ncb1800

Skotland, T., Sandvig, K., Llorente, A., 2017. Lipids in exosomes: Current knowledge and the way forward. Progress in Lipid Research 66, 30–41. https://doi.org/10.1016/j.plipres.2017.03.001

Skriner, K., Adolph, K., Jungblut, P.R., Burmester, G.R., 2006. Association of citrullinated proteins with synovial exosomes. Arthritis & Rheumatism 54, 3809–3814. https://doi.org/10.1002/art.22276

Song, J., Lu, S., Wu, Y., Zhou, C., Li, X., Li, J., 2020. Migration and distribution characteristics of organic and inorganic fractions in condensable particulate matter emitted from an ultralow

emission coal-fired power plant. Chemosphere 243, 125346. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125346

Squadrito, G.L., Cueto, R., Dellinger, B., Pryor, W.A., 2001. Quinoid redox cycling as a mechanism for sustained free radical generation by inhaled airborne particulate matter. Free Radical Biology and Medicine 31, 1132–1138. https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00703-1

Squadrito, M.L., Baer, C., Burdet, F., Maderna, C., Gilfillan, G.D., Lyle, R., Ibberson, M., De Palma, M., 2014. Endogenous RNAs Modulate MicroRNA Sorting to Exosomes and Transfer to Acceptor Cells. Cell Reports 8, 1432–1446. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.07.035

Srinivas, U.S., Tan, B.W.Q., Vellayappan, B.A., Jeyasekharan, A.D., 2019. ROS and the DNA damage response in cancer. Redox Biology 25, 101084. https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.101084

Srivastava, D., Favez, O., Bonnaire, N., Lucarelli, F., Haeffelin, M., Perraudin, E., Gros, V., Villenave, E., Albinet, A., 2018. Speciation of organic fractions does matter for aerosol source apportionment. Part 2: Intensive short-term campaign in the Paris area (France). Science of The Total Environment 634, 267–278. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.296

Ståhl, A., Johansson, K., Mossberg, M., Kahn, R., Karpman, D., 2019. Exosomes and microvesicles in normal physiology, pathophysiology, and renal diseases. Pediatric Nephrology 34, 11–30. https://doi.org/10.1007/s00467-017-3816-z

Stanek, L.W., Brown, J.S., 2019. Air Pollution: Sources, Regulation, and Health Effects, in: Reference Module in Biomedical Sciences. Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.11384-4

Stassen, F.R.M., van Eijck, P.H., Savelkoul, P.H.M., Wouters, E.F.M., Rohde, G.G.U., Briedé, J.J., Reynaert, N.L., de Kok, T.M., Benedikter, B.J., 2019. Cell Type- and Exposure-Specific Modulation of CD63/CD81-Positive and Tissue Factor-Positive Extracellular Vesicle Release in response to Respiratory Toxicants. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2019, 1–9. https://doi.org/10.1155/2019/5204218

Stoorvogel, W., Kleijmeer, M.J., Geuze, H.J., Raposo, G., 2002. The Biogenesis and Functions of Exosomes. Traffic 3, 321–330. https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2002.30502.x

Su, L.-J., Zhang, J.-H., Gomez, H., Murugan, R., Hong, X., Xu, D., Jiang, F., Peng, Z.-Y., 2019. Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2019, 1–13. https://doi.org/10.1155/2019/5080843

Sunyer, J., Basagaña, X., 2001. Particles, and not gases, are associated with the risk of death in patients with chronic obstructive pulmonary disease. International Journal of Epidemiology 30, 1138–1140. https://doi.org/10.1093/ije/30.5.1138

Suzuki, M., Otsuki, A., Keleku-Lukwete, N., Yamamoto, M., 2016. Overview of redox regulation by Keap1–Nrf2 system in toxicology and cancer. Current Opinion in Toxicology 1, 29–36. https://doi.org/10.1016/j.cotox.2016.10.001

Szabó-Taylor, K., Ryan, B., Osteikoetxea, X., Szabó, T.G., Sódar, B., Holub, M., Németh, A., Pálóczi, K., Pállinger, É., Winyard, P., Buzás, E.I., 2015. Oxidative and other posttranslational modifications in extracellular vesicle biology. Seminars in Cell & Developmental Biology 40, 8–16. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.02.012

Takahashi, T., Kobayashi, S., Fujino, N., Suzuki, T., Ota, C., He, M., Yamada, M., Suzuki, S., Yanai, M., Kurosawa, S., Yamaya, M., Kubo, H., 2012. Increased circulating endothelial microparticles in COPD patients: a potential biomarker for COPD exacerbation susceptibility. Thorax 67, 1067–1074. https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2011-201395

Takasugi, M., Okada, R., Takahashi, A., Virya Chen, D., Watanabe, S., Hara, E., 2017. Small extracellular vesicles secreted from senescent cells promote cancer cell proliferation through EphA2. Nat Commun 8, 15729. https://doi.org/10.1038/ncomms15728

Takeda, K., Akira, S., 2004. TLR signaling pathways. Seminars in Immunology 16, 3–9. https://doi.org/10.1016/j.smim.2003.10.003

Takeuchi, O., Akira, S., 2010. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. Cell 140, 805–820. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022

Tamaki, A., Hayashi, H., Nakajima, H., Takii, T., Katagiri, D., Miyazawa, K., Hirose, K., Onozaki, K., 2004. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Increases mRNA Level for Interleukin 1 Beta in Human Fibroblast-Like Synoviocyte Line via Aryl Hydrocarbon Receptor. Biological & Pharmaceutical Bulletin 27, 407–410. https://doi.org/10.1248/bpb.27.407

Tang, D., Kang, R., Coyne, C.B., Zeh, H.J., Lotze, M.T., 2012. PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. Immunological Reviews 249, 158–175. https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01146.x

Taylor, D.D., Gercel-Taylor, C., 2008. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. Gynecologic Oncology 110, 13–21. https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2008.04.033

Théry, C., Ostrowski, M., Segura, E., 2009. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. Nature Reviews Immunology 9, 581–593. https://doi.org/10.1038/nri2567

Théry, C., Witwer, K.W., Aikawa, E., et al., 2018. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. Journal of Extracellular Vesicles 7, 1535750. https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750

Thurston, G.D., 2017. Outdoor Air Pollution: Sources, Atmospheric Transport, and Human Health Effects, in: International Encyclopedia of Public Health. Elsevier, pp. 367–377. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803678-5.00320-9

Tian, T., Zhu, Y.-L., Zhou, Y.-Y., Liang, G.-F., Wang, Y.-Y., Hu, F.-H., Xiao, Z.-D., 2014. Exosome Uptake through Clathrin-mediated Endocytosis and Macropinocytosis and Mediating miR-21 Delivery. Journal of Biological Chemistry 289, 22258–22267. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.588046

Tian, Y., Xiang, X., Juan, J., Sun, K., Song, J., Cao, Y., Hu, Y., 2017. Fine particulate air pollution and hospital visits for asthma in Beijing, China. Environmental Pollution 230, 227–233. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.06.029

Tomasoni, S., Longaretti, L., Rota, C., Morigi, M., Conti, S., Gotti, E., Capelli, C., Introna, M., Remuzzi, G., Benigni, A., 2013. Transfer of Growth Factor Receptor mRNA Via Exosomes Unravels the Regenerative Effect of Mesenchymal Stem Cells. Stem Cells and Development 22, 772–780. https://doi.org/10.1089/scd.2012.0266

Tonelli, C., Chio, I.I.C., Tuveson, D.A., 2018. Transcriptional Regulation by Nrf2. Antioxidants & Redox Signaling 29, 1727–1745. https://doi.org/10.1089/ars.2017.7342

Torregrosa Paredes, P., Esser, J., Admyre, C., Nord, M., Rahman, Q.K., Lukic, A., Rådmark, O., Grönneberg, R., Grunewald, J., Eklund, A., Scheynius, A., Gabrielsson, S., 2012. Bronchoalveolar lavage fluid exosomes contribute to cytokine and leukotriene production in allergic asthma. Allergy 67, 911–919. https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2012.02835.x

Totlandsdal, A.I., Cassee, F.R., Schwarze, P., Refsnes, M., Låg, M., 2010. Diesel exhaust particles induce CYP1A1 and pro-inflammatory responses via differential pathways in human bronchial epithelial cells. Part Fibre Toxicol 7, 41. https://doi.org/10.1186/1743-8977-7-41

Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brugger, B., Simons, M., 2008. Ceramide Triggers Budding of Exosome Vesicles into Multivesicular Endosomes. Science 319, 1244–1247. https://doi.org/10.1126/science.1153124

Trams, E.G., Lauter, C.J., Norman Salem, Jr., Heine, U., 1981. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 645, 63–70. https://doi.org/10.1016/0005-2736(81)90512-5

Tripathi, P., Deng, F., Scruggs, A.M., Chen, Y., Huang, S.K., 2018. Variation in doses and duration of particulate matter exposure in bronchial epithelial cells results in upregulation of different genes associated with airway disorders. Toxicology in Vitro 51, 95–105. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.05.004

Tsay, J.J., Tchou-Wong, K.-M., Greenberg, A.K., Pass, H., Rom, W.N., 2013. Aryl Hydrocarbon Receptor and Lung Cancer 16.

Tsou, T.-C., Chao, H.-R., Yeh, S.-C., Tsai, F.-Y., Lin, H.-J., 2011. Zinc induces chemokine and inflammatory cytokine release from human promonocytes. Journal of Hazardous Materials S0304389411011356. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.09.035

Tsou, T.-C., Liou, S.-H., Yeh, S.-C., Tsai, F.-Y., Chao, H.-R., 2013. Crucial role of Toll-like receptors in the zinc/nickel-induced inflammatory response in vascular endothelial cells. Toxicology and Applied Pharmacology 273, 492–499. https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.09.014

Tsou, T.-C., Yeh, S.-C., Tsai, F.-Y., Lin, H.-J., Cheng, T.-J., Chao, H.-R., Tai, L.-A., 2010. Zinc oxide particles induce inflammatory responses in vascular endothelial cells via NF-κB signaling. Journal of Hazardous Materials 183, 182–188. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.07.010

Turturici, G., Tinnirello, R., Sconzo, G., Geraci, F., 2014. Extracellular membrane vesicles as a mechanism of cell-to-cell communication: advantages and disadvantages. American Journal of Physiology-Cell Physiology 306, C621–C633. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00228.2013

Union Européenne, 2016. DIRECTIVE (EU) 2016/2284 DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL du 14 décembre 2016 31.

Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J.J., Lötvall, J.O., 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. Nature Cell Biology 9, 654–659. https://doi.org/10.1038/ncb1596

Valavanidis, A., Fiotakis, K., Bakeas, E., Vlahogianni, T., 2005. Electron paramagnetic resonance study of the generation of reactive oxygen species catalysed by transition metals and quinoid redox

cycling by inhalable ambient particulate matter. Redox Report 10, 37–51. https://doi.org/10.1179/135100005X21606

Valavanidis, A., Fiotakis, K., Vlachogianni, T., 2008a. Airborne Particulate Matter and Human Health: Toxicological Assessment and Importance of Size and Composition of Particles for Oxidative Damage and Carcinogenic Mechanisms. Journal of Environmental Science and Health, Part C 26, 339–362. https://doi.org/10.1080/10590500802494538

Valavanidis, A., Fiotakis, K., Vlachogianni, T., 2008b. Airborne Particulate Matter and Human Health: Toxicological Assessment and Importance of Size and Composition of Particles for Oxidative Damage and Carcinogenic Mechanisms. Journal of Environmental Science and Health, Part C 26, 339–362. https://doi.org/10.1080/10590500802494538

Valavanidis, A., Fiotakis, K., Vlahogianni, T., Bakeas, E.B., Triantafillaki, S., Paraskevopoulou, V., Dassenakis, M., 2006. Characterization of atmospheric particulates, particle-bound transition metals and polycyclic aromatic hydrocarbons of urban air in the centre of Athens (Greece). Chemosphere 65, 760–768. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.03.052

Valavanidis, A., Vlachogianni, T., 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 27, 120–139. https://doi.org/10.1080/10590500902885684

Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J., Telser, J., 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. Molecular and Cellular Biochemistry 266, 37–56. https://doi.org/10.1023/B:MCBI.0000049134.69131.89

Van Deun, J., Mestdagh, P., Sormunen, R., Cocquyt, V., Vermaelen, K., Vandesompele, J., Bracke, M., De Wever, O., Hendrix, A., 2014. The impact of disparate isolation methods for extracellular vesicles on downstream RNA profiling. Journal of Extracellular Vesicles 3, 24858. https://doi.org/10.3402/jev.v3.24858

van Meteren, N., Lagadic-Gossmann, D., Chevanne, M., Gallais, I., Gobart, D., Burel, A., Bucher, S., Grova, N., Fromenty, B., Appenzeller, B.M.R., Chevance, S., Gauffre, F., Le Ferrec, E., Sergent, O., 2019. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Can Trigger Hepatocyte Release of Extracellular Vesicles by Various Mechanisms of Action Depending on Their Affinity for the Aryl Hydrocarbon Receptor. Toxicological Sciences 171, 443–462. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz157

van Meteren, N., Lagadic-Gossmann, D., Podechard, N., Gobart, D., Gallais, I., Chevanne, M., Collin, A., Burel, A., Dupont, A., Rault, L., Chevance, S., Gauffre, F., Le Ferrec, E., Sergent, O., 2020. Extracellular vesicles released by polycyclic aromatic hydrocarbons-treated hepatocytes trigger oxidative stress in recipient hepatocytes by delivering iron. Free Radical Biology and Medicine 160, 246–262. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.08.001

van Niel, G., D'Angelo, G., Raposo, G., 2018. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. Nature Reviews Molecular Cell Biology 19, 213–228. https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125

Vanni, I., Alama, A., Grossi, F., Dal Bello, M.G., Coco, S., 2017. Exosomes: a new horizon in lung cancer. Drug Discovery Today 22, 927–936. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.03.004

van Niel, G., Charrin, S., Simoes, S., Romao, M., Rochin, L., Saftig, P., Marks, M.S., Rubinstein, E., Raposo, G., 2011. The Tetraspanin CD63 Regulates ESCRT-Independent and -Dependent

Endosomal Sorting during Melanogenesis. Developmental Cell 21, 708–721. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.08.019

Vatsyayan, R., Kothari, H., Pendurthi, U.R., Rao, L.V.M., 2013. 4-Hydroxy-2-Nonenal Enhances Tissue Factor Activity in Human Monocytic Cells via p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Activation-Dependent Phosphatidylserine Exposure. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 33, 1601–1611. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.300972

Vella, L.J., Greenwood, D.L.V., Cappai, R., Scheerlinck, J.-P.Y., Hill, A.F., 2008. Enrichment of prion protein in exosomes derived from ovine cerebral spinal fluid. Veterinary Immunology and Immunopathology 124, 385–393. https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.04.002

Viana, M., Hammingh, P., Colette, A., Querol, X., Degraeuwe, B., Vlieger, I. de, van Aardenne, J., 2014. Impact of maritime transport emissions on coastal air quality in Europe. Atmospheric Environment 90, 96–105. https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2014.03.046

Viana, M., Kuhlbusch, T.A.J., Querol, X., Alastuey, A., Harrison, R.M., Hopke, P.K., Winiwarter, W., Vallius, M., Szidat, S., Prévôt, A.S.H., Hueglin, C., Bloemen, H., Wåhlin, P., Vecchi, R., Miranda, A.I., Kasper-Giebl, A., Maenhaut, W., Hitzenberger, R., 2008. Source apportionment of particulate matter in Europe: A review of methods and results. Journal of Aerosol Science 39, 827–849. https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2008.05.007

Virchow, J., Barnes, P., 2012. Asthma. Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine 33, 577–578. https://doi.org/10.1055/s-0032-1326958

Vogel, C.F.A., Li, W., Wu, D., Miller, J.K., Sweeney, C., Lazennec, G., Fujisawa, Y., Matsumura, F., 2011. Interaction of aryl hydrocarbon receptor and NF-κB subunit RelB in breast cancer is associated with interleukin-8 overexpression. Archives of Biochemistry and Biophysics 512, 78–86. https://doi.org/10.1016/j.abb.2011.05.011

Vogel, C.F.A., Van Winkle, L.S., Esser, C., Haarmann-Stemmann, T., 2020. The aryl hydrocarbon receptor as a target of environmental stressors – Implications for pollution mediated stress and inflammatory responses. Redox Biology 34, 101530. https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101530

Wahlund, C.J.E., Eklund, A., Grunewald, J., Gabrielsson, S., 2017. Pulmonary Extracellular Vesicles as Mediators of Local and Systemic Inflammation. Frontiers in Cell and Developmental Biology 5. https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00039

Wan, D., Han, Z., Yang, J., Yang, G., Liu, X., 2016. Heavy Metal Pollution in Settled Dust Associated with Different Urban Functional Areas in a Heavily Air-Polluted City in North China. IJERPH 13, 1119. https://doi.org/10.3390/ijerph13111119

Wang, D., Pakbin, P., Shafer, M.M., Antkiewicz, D., Schauer, J.J., Sioutas, C., 2013. Macrophage reactive oxygen species activity of water-soluble and water-insoluble fractions of ambient coarse, PM2.5 and ultrafine particulate matter (PM) in Los Angeles. Atmospheric Environment 77, 301–310. https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2013.05.031

Wang, G., Zhang, G., Gao, X., Zhang, Y., Fan, W., Jiang, J., An, Z., Li, J., Song, J., Wu, W., 2020. Oxidative stress-mediated epidermal growth factor receptor activation regulates PM2.5-induced over-secretion of pro-inflammatory mediators from human bronchial epithelial cells. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects 1864, 129672. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129672

Wang, J., Guo, Z., Zhang, R., Han, Z., Huang, Y., Deng, C., Dong, W., Zhuang, G., 2020. Effects of N-acetylcysteine on oxidative stress and inflammation reactions in a rat model of allergic rhinitis after PM2.5 exposure. Biochemical and Biophysical Research Communications 533, 275–281. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.09.022

Wang, Y., Tang, M., 2019. PM2.5 induces ferroptosis in human endothelial cells through iron overload and redox imbalance. Environmental Pollution 254, 112937. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.07.105

Weissenberg, A., Sydlik, U., Peuschel, H., Schroeder, P., Schneider, M., Schins, R.P.F., Abel, J., Unfried, K., 2010. Reactive oxygen species as mediators of membrane-dependent signaling induced by ultrafine particles. Free Radical Biology and Medicine 49, 597–605. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.05.011

WHO, 2018. Qualité de l'air ambiant et santé [WWW Document]. URL https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/ambient-(outdoor)-air-quality-and-health (accessed 11.7.19).

WHO, W., 2016. Ambient air pollution: A global assessment of exposure and burden of disease.

Widdicombe, J.H., 2019. Early studies of airway submucosal glands. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology 316, L990–L998. https://doi.org/10.1152/ajplung.00068.2019

Willms, E., Cabañas, C., Mäger, I., Wood, M.J.A., Vader, P., 2018. Extracellular Vesicle Heterogeneity: Subpopulations, Isolation Techniques, and Diverse Functions in Cancer Progression. Frontiers in Immunology 9. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00738

Withrow, J., 2016. Extracellular vesicles in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and osteoarthritis 12.

Wolf, P., 1967. The Nature and Significance of Platelet Products in Human Plasma. British Journal of Haematology 13, 269–288. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1967.tb08741.x

Wong, T.-H., Lee, Chon-Lin, Su, H.-H., Lee, Chin-Lai, Wu, C.-C., Wang, C.-C., Sheu, C.-C., Lai, R.-S., Leung, S.-Y., Lin, C.-C., Wei, Y.-F., Wang, C.-J., Lin, Y.-C., Chen, H.-L., Huang, M.-S., Yen, J.-H., Huang, S.-K., Suen, J.-L., 2018. A prominent air pollutant, Indeno[1,2,3-cd]pyrene, enhances allergic lung inflammation via aryl hydrocarbon receptor. Sci Rep 8, 5198. https://doi.org/10.1038/s41598-018-23542-9

Wyciszkiewicz, A., Kalinowska-Łyszczarz, A., Nowakowski, B., Kaźmierczak, K., Osztynowicz, K., Michalak, S., 2019. Expression of small heat shock proteins in exosomes from patients with gynecologic cancers. Scientific Reports 9. https://doi.org/10.1038/s41598-019-46221-9

Xiao, D., Ohlendorf, J., Chen, Y., Taylor, D.D., Rai, S.N., Waigel, S., Zacharias, W., Hao, H., McMasters, K.M., 2012. Identifying mRNA, MicroRNA and Protein Profiles of Melanoma Exosomes. PLoS ONE 7, e46874. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046874

Xing, Y.-F., Xu, Y.-H., Shi, M.-H., Lian, Y.-X., 2016. The impact of PM2.5 on the human respiratory system. Journal of Thoracic Disease 8, 6.

Xu, Z., Wang, N., Xu, Y., Hua, L., Zhou, D., Zheng, M., Deng, X., 2019. Effects of chronic PM2.5 exposure on pulmonary epithelia: Transcriptome analysis of mRNA-exosomal miRNA interactions. Toxicology Letters 316, 49–59. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.09.010

Yagishita, Y., Uruno, A., Yamamoto, M., 2016. NRF2-Mediated Gene Regulation and Glucose Homeostasis, in: Molecular Nutrition and Diabetes. Elsevier, pp. 331–348. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801585-8.00027-0

Yáñez-Mó, M., Siljander, P.R.-M., Andreu, Z., et al., 2015. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. Journal of Extracellular Vesicles 4, 27066. https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066

Yang, J., Kim, E.K., Park, H.J., McDowell, A., Kim, Y.-K., 2020. The impact of bacteria-derived ultrafine dust particles on pulmonary diseases. Experimental & Molecular Medicine 52, 338–347. https://doi.org/10.1038/s12276-019-0367-3

Yang, L., Li, C., Tang, X., 2020. The Impact of PM2.5 on the Host Defense of Respiratory System. Front. Cell Dev. Biol. 8, 91. https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00091

Yang, L., Liu, G., Lin, Z., Wang, Y., He, H., Liu, T., Kamp, D.W., 2016. Pro-inflammatory response and oxidative stress induced by specific components in ambient particulate matter in human bronchial epithelial cells: The Elemental NI in PM2.5 Increased the Expression of IL-1β. Environ. Toxicol. 31, 923–936. https://doi.org/10.1002/tox.22102

Yang, L., Wang, W.-C., Lung, S.-C.C., Sun, Z., Chen, C., Chen, J.-K., Zou, Q., Lin, Y.-H., Lin, C.-H., 2017. Polycyclic aromatic hydrocarbons are associated with increased risk of chronic obstructive pulmonary disease during haze events in China. Science of The Total Environment 574, 1649–1658. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.08.211

Yang, Y., Parsons, K.K., Chi, L., Malakauskas, S.M., Le, T.H., 2009. Glutathione *S* -Transferase-µ1 Regulates Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation, Migration, and Oxidative Stress. Hypertension 54, 1360–1368. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.139428

Yang, Y., Pun, V.C., Sun, S., Lin, H., Mason, T.G., Qiu, H., 2018. Particulate matter components and health: a literature review on exposure assessment. Journal of Public Health and Emergency 2, 14–14. https://doi.org/10.21037/jphe.2018.03.03

Yao, L., Yang, L., Yuan, Q., Yan, C., Dong, C., Meng, C., Sui, X., Yang, F., Lu, Y., Wang, W., 2016. Sources apportionment of PM 2.5 in a background site in the North China Plain. Science of The Total Environment 541, 590–598. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.123

Ye, X., Peng, L., Kan, H., Wang, W., Geng, F., Mu, Z., Zhou, J., Yang, D., 2016. Acute Effects of Particulate Air Pollution on the Incidence of Coronary Heart Disease in Shanghai, China. PLOS ONE 11, e0151119. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151119

Yeager, R.L., Reisman, S.A., Aleksunes, L.M., Klaassen, C.D., 2009. Introducing the "TCDD-Inducible AhR-Nrf2 Gene Battery." Toxicological Sciences 111, 238–246. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp115

Yeh, S.-C., Tsai, F.-Y., Chao, H.-R., Tsou, T.-C., 2011. Zinc Ions Induce Inflammatory Responses in Vascular Endothelial Cells. Bull Environ Contam Toxicol 87, 113–116. https://doi.org/10.1007/s00128-011-0317-9

Yin, S., Cao, W., 2015. Toll-Like Receptor Signaling Induces Nrf2 Pathway Activation through p62-Triggered Keap1 Degradation. Molecular and Cellular Biology 35, 2673–2683. https://doi.org/10.1128/MCB.00105-15

Yuan, Q., Chen, Y., Li, X., Zhang, Z., Chu, H., 2019. Ambient fine particulate matter (PM2.5) induces oxidative stress and pro-inflammatory response via up-regulating the expression of CYP1A1/1B1 in human bronchial epithelial cells in vitro. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 839, 40–48. https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.12.005

Yuana, Y., Sturk, A., Nieuwland, R., 2013. Extracellular vesicles in physiological and pathological conditions. Blood Reviews 27, 31–39. https://doi.org/10.1016/j.blre.2012.12.002

Zaas, A.K., Schwartz, D.A., 2005. Innate Immunity and the Lung: Defense at the Interface Between Host and Environment. Trends in Cardiovascular Medicine 15, 195–202. https://doi.org/10.1016/j.tcm.2005.07.001

Zalakeviciute, R., Alexandrino, K., Rybarczyk, Y., Debut, A., Vizuete, K., Diaz, M., 2020. Seasonal variations in PM10 inorganic composition in the Andean city. Scientific Reports 10. https://doi.org/10.1038/s41598-020-72541-2

Zhang, J., Li, S., Li, L., Li, M., Guo, C., Yao, J., Mi, S., 2015. Exosome and Exosomal MicroRNA: Trafficking, Sorting, and Function. Genomics, Proteomics & Bioinformatics 13, 17–24. https://doi.org/10.1016/j.gpb.2015.02.001

Zhang, Y., Liu, Y., Liu, H., Tang, W.H., 2019. Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. Cell & Bioscience 9. https://doi.org/10.1186/s13578-019-0282-2

Zhao, Q., Chen, H., Yang, T., Rui, W., Liu, F., Zhang, F., Zhao, Y., Ding, W., 2016. Direct effects of airborne PM2.5 exposure on macrophage polarizations. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects 1860, 2835–2843. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.03.033

Zhao, Y., Usatyuk, P.V., Gorshkova, I.A., He, D., Wang, T., Moreno-Vinasco, L., Geyh, A.S., Breysse, P.N., Samet, J.M., Spannhake, E.Wm., Garcia, J.G.N., Natarajan, V., 2009. Regulation of COX-2 Expression and IL-6 Release by Particulate Matter in Airway Epithelial Cells. Am J Respir Cell Mol Biol 40, 19–30. https://doi.org/10.1165/rcmb.2008-0105OC

Zhou, Z., Liu, Y., Duan, F., Qin, M., Wu, F., Sheng, W., Yang, L., Liu, J., He, K., 2015. Transcriptomic Analyses of the Biological Effects of Airborne PM2.5 Exposure on Human Bronchial Epithelial Cells. PLoS ONE 10, e0138267. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138267

Zhu, K., Meng, Q., Zhang, Z., Yi, T., He, Y., Zheng, J., Lei, W., 2019. Aryl hydrocarbon receptor pathway: Role, regulation and intervention in atherosclerosis therapy (Review). Mol Med Report. https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10748

Zieliński, M., Gąsior, M., Jastrzębski, D., Desperak, A., Ziora, D., 2018. Influence of particulate matter air pollution on exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease depending on aerodynamic diameter and the time of exposure in the selected population with coexistent cardiovascular diseases. Advances in Respiratory Medicine 86, 227–233. https://doi.org/10.5603/ARM.2018.0036

Zou, W., Wang, X., Hong, W., He, F., Hu, J., Sheng, Q., Zhu, T., Ran, P., 2020. PM2.5 Induces the Expression of Inflammatory Cytokines via the Wnt5a/Ror2 Pathway in Human Bronchial Epithelial Cells. COPD Volume 15, 2653–2662. https://doi.org/10.2147/COPD.S270762

Zwaal, R.F.A., Comfurius, P., Bevers, E.M., 2005. Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells. CMLS Cellular and Molecular Life Sciences 62, 971–988. https://doi.org/10.1007/s00018-005-4527-3

Annexe



Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

Critical Reviews in Toxicology

ISSN: 1040-8444 (Print) 1547-6898 (Online) Journal homepage: https://www.tandfonline.com/loi/itxc20

Extracellular vesicles as actors in the air pollution related cardiopulmonary diseases

Stéphanie Alkoussa, Sébastien Hulo, Dominique Courcot, Sylvain Billet & Perrine J. Martin

To cite this article: Stéphanie Alkoussa, Sébastien Hulo, Dominique Courcot, Sylvain Billet & Perrine J. Martin (2020): Extracellular vesicles as actors in the air pollution related cardiopulmonary diseases, Critical Reviews in Toxicology, DOI: 10.1080/10408444.2020.1763252

To link to this article: https://doi.org/10.1080/10408444.2020.1763252

Published online: 05 Jun 2020.

Submit your article to this journal

View related articles

View Crossmark data

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=itxc20

CRITICAL REVIEWS IN TOXICOLOGY
https://doi.org/10.1080/10408444.2020.1763252

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

REVIEW ARTICLE

Check for updates

Extracellular vesicles as actors in the air pollution related cardiopulmonary diseases

Stéphanie Alkoussa[a], Sébastien Hulo[b,c], Dominique Courcot[a], Sylvain Billet[a] and Perrine J. Martin[a]

[a]Unit of Environmental Chemistry and Interactions with Life, UCEIV EA4492, SFR Condorcet FR CNRS, University of Littoral Côte d'Opale, Dunkerque, France; [b]IMPact of Environmental ChemicalS on Human Health, ULR 4483 - IMPECS, Univ. Lille, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, Lille, France; [c]Department of Occupational Health, Lille University Hospital, Lille, France

ABSTRACT

Many associations were reported between air pollution and daily mortality rates for cardiopulmonary diseases. Humans are exposed to a mixture of oxidizing gases and particles, both anthropogenic and natural. Exposure to air toxics causes or exacerbates cardiovascular damages and respiratory diseases. Numerous studies have identified the induction of oxidative stress and sustained inflammatory response as among the main known underlying pathophysiological mechanisms of air pollutants. More recently, the relationship between these mechanisms of action and the secretion of extracellular vesicles (EVs) by lung cells has been revealed. EVs have been shown to be important mediators of cellular communication in the body. The purpose of this review is to first recall the main air pollutants. Then, the cardiopulmonary diseases caused by exposure to air pollution and the pathophysiological mechanisms are presented before showing, through an exhaustive review of the literature, the involvement of EVs in the toxicity of air pollutants and the initiation of cardiopulmonary diseases.

ARTICLE HISTORY
Received 20 December 2019
Revised 27 March 2020
Accepted 28 April 2020

KEYWORDS
Extracellular vesicles; air pollutants; particulate matter; cigarette smoke; cardiopulmonary diseases; lung cancer; COPD

Table of contents

1. Introduction ... 1
2. General features ... 2
2.1. General features of air pollutants ... 2
2.2. Cardiorespiratory diseases related to air pollution ... 3
2.2.1. Asthma ... 3
2.2.2. Chronic obstructive pulmonary disease ... 3
2.2.3. Lung cancer ... 3
2.2.4. Cardiovascular diseases ... 3
2.3. General features of lung EVs ... 4
2.3.1. Classification of EVs ... 4
2.3.2. EV cargo ... 4
2.3.3. Interaction of EVs with target cells ... 4
2.3.4. Lung cells producing EVs ... 5
3. Common underlying mechanisms of air pollutant toxicity and EV release ... 5
3.1. Oxidative stress ... 5
3.2. Inflammation ... 6
4. EVs and PM ... 7
4.1. Epidemiology of PM ... 7
4.2. Main toxicity mechanisms of PM ... 7
4.3. Effects of PM on EVs ... 8
4.3.1. Effects of PM on EV release ... 8
4.3.2. Effects of PM on EV miRNA cargo ... 9
4.3.3. Effects of EV produced after exposure to PM 10
5. EVs and CS ... 10
5.1. Epidemiology of CS ... 10
5.2. Main toxicity mechanisms of CS ... 10
5.3. Effects of CS on EVs ... 11
5.3.1. Effects of CS on EV release ... 11
5.3.2. Effects of CS on EV cargo and its impact on other cells ... 12
6. EVs and asbestos ... 14
6.1. Epidemiology of asbestos ... 14
6.2. Main toxicity mechanisms of asbestos ... 14
6.3. Asbestos and EVs ... 14
7. Concluding remarks and future perspectives ... 15
Acknowledgments ... 15
Declaration of interest ... 15
ORCID ... 15
References ... 15

1. Introduction

While we can choose the food we eat, we cannot select the air we breathe. Every day, about 15 cubic meters of air enter our airways and lungs as it forms a mixture of toxic chemicals emitted from a variety of sources, both anthropogenic and natural. In 2016, the World Health Organization (WHO) reported that approximately 3 million premature deaths per year worldwide are linked to exposure to air pollution,

CONTACT Perrine J. Martin Perrine.Martin@univ-littoral.fr Université du Littoral Côte d'Opale, EA4492 - Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (UCEIV), Maison de la Recherche en Environnement Industriel 2, ULCO, 189A, Avenue Maurice Schumann, Dunkerque 59140, France

© 2020 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

particularly in the poorest regions of the world (World Health Organization [WHO] 2016). When the WHO also integrated the impact of indoor air pollution, it resulted in a significant global burden of more than 6 million deaths. That is, one in nine deaths worldwide is due to exposure to air pollution. Air pollution can thereby be considered a global public health issue. According to the European Environment Agency (Union 2019), exposure to air pollution reduces average life expectancy in Europe by nearly a year, especially due to cardiopulmonary diseases. Globally, the WHO estimated that each year about 500 000 deaths from lung cancer deaths and 1.6 million deaths from chronic obstructive pulmonary disease (COPD) can be attributed to air pollution (Schraufnagel et al. 2019).

In recent years, the literature on extracellular vesicles (EVs) showing their predominant place as a factor in various pathophysiological mechanisms has grown exponentially, notably in the field of cardiopulmonary pathologies, as demonstrated by the large number of reviews on the subject (Fujita, Kosaka, et al. 2015; Kubo 2018; Lanyu and Feilong 2019; Lee et al. 2018; Letsiou and Bauer 2018; O'Farrell and Yang 2019; Wahlund et al. 2017). It therefore becomes obvious that EVs produced by different types of lung cells are a link between exposure to air pollutants and cardiopulmonary diseases, particularly by being involved in the underlying toxicity mechanisms such as oxidative stress and inflammation.

This review will focus on the latest available evidence showing the role of EVs in the response to exposure to the following air pollutants: particulate matter (PM), cigarette smoke (CS), and asbestos, which may be involved, through their implication in oxidative stress and inflammatory mechanisms, in corresponding cardiorespiratory diseases such as asthma, COPD, lung cancer and cardiovascular diseases (CVD).

2. General features

2.1. General features of air pollutants

Ambient air pollution is a complex mixture of gases and particulate compounds. Of the harmful gases, carbon dioxide (CO_2), nitrogen (NO_X), and sulfur oxides (SO_X) are the most abundant pollutants, but we also breathe ozone (O_3), hydrogen sulfide (H_2S), ammonia (NH_3) and some volatile organic compounds (VOCs) such as benzene (C_6H_6) and formaldehyde (CH_2O). Most of these gases are individually monitored in outdoor or indoor air since they can irritate the airways and cause inflammation (Li et al. 2019; Nielsen et al. 2017). Concerning particles, the most frequently used classification there is that of particle size. Thus, ambient PM can be divided into PM_{10}, for the particles passing an inlet with a cutoff efficiency of 50% at an equivalent aerodynamic diameter (EAD) of 10 μm, into fine particles or $PM_{2.5}$, when their EAD is less than 2.5 μm, and into ultrafine particles or $PM_{0.1}$, for particles smaller than 0.1 μm (Li et al. 2017). The subgroup of coarse particles includes particles with EAD between 2.5 and 10 μm ($PM_{2.5–10}$). Major sources of $PM_{2.5–10}$ are anthropogenic activities including industrial activities, emissions from tire wear, incinerators and wood combustion, and natural sources such as windblown dust and sea salts (Simkhovich et al. 2008; Zhu, Hsu, et al. 2019). Power plant, road transport, diesel vehicles, industry, and residential fuel combustion as well as volcanic eruptions and wildfires are the main contributors to $PM_{2.5}$ formation (Oh et al. 2011; Simkhovich et al. 2008). Ultrafine particles come from industrial processes, agriculture, and emissions by mobile sources including motor vehicles, aircrafts and marine vessels (Manigrasso et al. 2019).

Despite this simple classification by size, PM is much more complex than most other air pollutants. Its chemical composition depends on numerous meteorological, geographical and source-specific variables (Kelly and Fussell 2012; Lepers, André, et al. 2014). Indeed, the chemical components of PM are highly diverse. They range from highly water-soluble substances such as ammonium nitrate (NH_4NO_3), ammonium sulfate ($(NH_4)_2SO_4$), and sodium chloride (NaCl) to water-insoluble minerals such as metal oxides and crustal particles, to soot particles, such as diesel exhaust particles, made up of black carbon coating organic compounds, such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs; Harrison and Yin 2000). Particles do not only contain chemical compounds, but they can also be bioaerosols containing pollen, intact and fragmented airborne microorganisms (viruses, bacteria, fungi, algae, spores, etc.), their metabolites, debris, and excreta (Buiarelli et al. 2019; Gandolfi et al. 2013). While bacterial cells and spores are mainly in PM_1, fungi are mainly detected in $PM_{>1}$ (Buiarelli et al. 2019).

Another important source of air pollution is related to smoking. Daily, humans can be exposed to different types of smoke. First of all, mainstream smoke, also known as first-hand smoke, is the direct inhalation of toxic aerosols by a smoker after smoking a cigarette. Second, secondhand smoke or environmental tobacco smoke occurs when tobacco smoke enters an environment, primarily indoor and is inhaled by all smokers or nonsmokers. It is a combination of the smoke exhaled by a smoker and the smoke from the burning end of a cigarette. CS consists of a tar phase, composed mainly of PM_1, and a vapor phase. It contains more than 6000 chemicals, most of which are VOCs, including aromatic and oxygenated compounds, highly reactive free radicals, and toxic heavy metals (Kleinstreuer and Feng 2013). The two main ones are CO_2 and carbon monoxide (CO) with concentrations around 26.8 and 7.3 mg/cigarette, respectively (Marcilla et al. 2012). Many other compounds are generally detected at concentrations between 5 and 500 μg/cigarette. VOCs, such as methane, benzene, 1,3-butadiene, toluene, and small aldehydes such as acrolein, methyl vinyl ketone, butyraldehyde, acetone, and limonene are primarily constituents of the vapor phase. Nicotine, PAHs, and nitrosamines are associated primarily with the particulate phase, while others as hydrogen cyanide, ammonia, and formaldehyde are found in both phases (Counts et al. 2005).

In addition to air pollutants found throughout the world, local contexts can lead to air contamination by specific harmful pollutants. One of the most documented examples is the presence of asbestos fibers in the environment of asbestos mines and mineral processing factories. Although asbestos is often considered to be an occupational toxic and the majority of studies have focused on the effects of asbestos

exposure in cohorts of workers, several studies have examined the impact of environmental exposure to asbestos on people living near cement factories and on workers' families (Barbieri et al. 2012; Ferrante et al. 2007; Magnani et al. 2013; Mensi et al. 2015; Musti et al. 2009). Asbestos refers to six natural silicate minerals classified into two main groups: serpentines (chrysotile) and amphiboles (actinolite, amosite, anthophyllite, crocidolite, and tremolite). In the past, asbestos was used in all sorts of construction materials. Because it has flame-retardant qualities, it was often found around the heating systems of buildings, such as casings for hot water pipes, roofing shingles, insulation, vinyl floors, and ceiling tiles. It was also used in brake pads and clutch disks for road vehicles. The use of asbestos has been banned since 2005 in the European Union, since 2017 in Brazil the world's third-largest producer of chrysotile asbestos, and is relatively low in some developed countries where it is still allowed. Asbestos consumption has indeed globally decreased in the world from approximately 2 million tons in 2010 to roughly 1 million tons in 2019 (US Geological Survey 2020).

2.2. Cardiorespiratory diseases related to air pollution

For a long time, the overwhelming responsibility of tobacco on the occurrence of cardiopulmonary diseases had made it difficult to highlight the role of air pollution on these pathologies. However, statistical analyses such as time-series epidemiological studies have highlighted the impact of air pollution on health among many other risk factors. Therefore, many studies have reported associations between air pollution and daily mortality rates for cardiorespiratory diseases (Dockery et al. 1993; Requia et al. 2018; Thurston et al. 2017). Cardiorespiratory diseases due to air pollution are generally classified as short-term effects related to exposure to a pollution peak or long-term effects following prolonged exposure to an average concentration of pollutants.

2.2.1. Asthma

Asthma is a respiratory disease characterized by symptoms such as wheezing and associated with airflow limitation due to inflammation and remodeling of the airways (Papi et al. 2018). Many inhaled allergens are responsible for allergic asthma and the most common are house dust mites, animal hair, pollens, and molds. Certain occupations are more at risk for the development of occupational asthma as a baker, hairdresser, or health care worker (Tarlo and Lemiere 2014). Studies of the short-term effects of pollution on the respiratory system describe an increase in hospitalizations or emergency room visits related to respiratory pathologies such as asthma (Zheng et al. 2015), as well as an increase in asthma attacks due to pollution peaks (Orellano et al. 2017). It has been also shown that there is a 5% excess risk of developing asthma in children for a 4 $\mu g/m^3$ increase in NO_2 (Khreis et al. 2017) and a positive association between NO_2 concentration and the onset of asthma in adults (Jacquemin et al. 2015). Oxidative stress induced by chronic exposure to PM_{10} and O_3 also emerged as a risk factor for persistent asthma in a recent study in France (Havet et al. 2019). Exposure to environmental tobacco smoke is an additional risk factor for asthma onset and sensitization (Burbank et al. 2017). Short-term pathophysiological processes of air pollution include increased airway inflammation, bronchial hyperreactivity, and oxidative stress. The long-term mechanisms responsible for the development and exacerbation of asthma involve oxidative stress, airway remodeling, immunological responses due to inflammatory pathways, and increased respiratory sensitization (Guarnieri and Balmes 2014).

2.2.2. Chronic obstructive pulmonary disease

COPD is characterized by a persistent and progressive airflow limitation due to increased mucus production and thickness of the bronchial mucosa associated with chronic inflammation of the airways, which is an important cause of disability (Vestbo 2014). COPD is the world's most fatal lung disease with tobacco being the main risk factor (Rabe and Watz 2017). About 10% to 15% of COPDs are due to exposures from different occupations such as coal miners, tunnel workers, foundries, or steelworkers (Omland et al. 2014). As with asthma, studies on the short-term effects of pollution show an increase in COPD-related hospital admissions or emergency room visits (DeVries et al. 2017) and COPD exacerbations due to pollution peaks (Li et al. 2016). Long-term exposure to ambient air pollution seems to play a role in the development of the COPD but studies are contradictory (Garshick 2014). Indeed, the European multicenter cohort showed that an increase of 10 $\mu g/m^3$ of NO_2 or PM_{10} was associated with lower levels of forced expiratory volume in 1 s (FEV1) and forced vital capacity (FVC; Adam et al. 2015). Other authors also demonstrated that the level of NO_2 was associated with a lower FEV1/FVC ratio, or a forced expiratory rate of 25–75% of FVC (FEF25–75%), or a forced expiratory rate of 75% of FVC (FEF75%; Dauchet et al. 2018).

2.2.3. Lung cancer

Lung cancer is the most frequent cause of cancer death worldwide. Its 5-year survival rate is less than 20% (Hirsch et al. 2017). Numerous toxics are responsible for lung cancer but without histologic type specificity. Tobacco is responsible for about 85% of lung cancers; an active smoker has 20–50 times the risk of developing lung cancer than a nonsmoker (Malhotra et al. 2016). Some occupational exposures to pollutants are responsible for a small but significant proportion of lung cancers related to asbestos (Lazarus et al. 2012), silica, chromium, PAHs, or diesel exhaust (Malhotra et al. 2016). Reviews have shown the link between exposure to PM and increased lung cancer incidence (Raaschou-Nielsen et al. 2013) including a 15–21% excess risk of lung cancer mortality for a 10 $\mu g/m^3$ increase in $PM_{2.5}$ (Chen et al. 2008). Therefore, the International Agency for Research on cancer (IARC) considers PM to be a known lung carcinogen (Hamra et al. 2014).

2.2.4. Cardiovascular diseases

Some CVD, such as atherosclerosis, coronary artery disease, hypertension, peripheral artery disease, and abdominal aortic

aneurysms are caused by air pollution and in part by exposure to tobacco smoke (Mainali et al. 2015). A recent meta-analysis showed that stroke mortality or hospital admission for stroke was associated with the daily increase of gaseous pollutants (CM, sulfur dioxide, nitrogen dioxide, ozone) and $PM_{2.5}$ or PM_{10}. The strongest associations found in this meta-analysis were with exposure to $PM_{2.5}$ (Shah et al. 2015). High blood pressure is one of the known risk factors for CVD. It was also recently showed associations between concomitant exposure to $PM_{2.5}$ and SO_2 and increased systolic blood pressure (Yang et al. 2018).

Studies examining cardiovascular long-term effects show a 13% excess risk of coronary events for an average annual increase of 5 $\mu g/m^3$ of $PM_{2.5}$ and 12% for an average annual increase of 10 $\mu g/m^3$ of PM_{10} (Cesaroni et al. 2014). An excess risk of cardiovascular mortality of 11% was also evaluated for an increase of 10 $\mu g/m^3$ of $PM_{2.5}$ (Hoek et al. 2013). Exposure to Environmental Tobacco Smoke is also a risk factor for ischemic heart disease and for developing carotid plaque in nonsmoker subjects (DiGiacomo et al. 2018). Pathophysiological phenomena underlying cardiovascular effects are represented by a chain reaction starting with oxidative stress inducing endothelial dysfunctions that promote atherogenic processes (Bourdrel et al. 2017).

2.3. General features of lung EVs

2.3.1. Classification of EVs

EVs are small membrane vesicles that are thought to be released by all cell types and are detected in various body fluids, such as nasal secretions (Lässer et al. 2011), bronchoalveolar lavages (BALs; Admyre et al. 2003; Héliot et al. 2017; Torregrosa Paredes et al. 2012), and blood (Yuana et al. 2013). The nature and abundance of EVs are specific to each type of cell and are often influenced by the physiological or pathological state of the donor cell, the stimuli that modulate their production and release, and the molecular mechanisms leading to their biogenesis. As a consequence, EVs are not a homogenous population (Kowal et al. 2016). Their nomenclature remains controversial (Gould and Raposo 2013), and still today, in agreement with the last International Society for Extracellular Vesicles (ISEV) guidelines, it is accepted to consider two main subtypes according to their biogenesis (Russell et al. 2019). The first subtype, exosomes (30–150 nm), is formed by the internal budding of the endosomal membrane to form intraluminal vesicles (ILVs), and then released into the extracellular space by the fusion of multivesicular endosomes (MVEs) with the plasma membrane. Nowadays, it is well known that a rise in intracellular Ca^{2+} concentration is essential to trigger membrane blebbing and multivesicular bodies (MVBs) fusion with the plasma membrane leading to the release of ILVs content into the extracellular space (Savina et al. 2003; Shyong et al. 2018). The second subtype, commonly called microvesicles (MVs; or microparticles [MPs] or ectosomes; 100–1000 nm), results from the external budding of the plasma membrane (Abels and Breakefield 2016). Until recently, apoptotic bodies (500–5000 nm), corresponding to large membrane vesicles formed by fragmentation of an apoptotic cell and containing DNA fragments and cellular organelles, were considered as a third type of EVs (Hauser et al. 2017). In this review, we will focus only on EVs including exosomes and MVs. In the absence of obvious markers to identify EVs according to their biogenesis, an alternative nomenclature is now used when characterization does not allow them to be classified in one of the three categories mentioned above and is accepted by the ISEV (Théry et al. 2018). This classification is based on how EVs are isolated, and therefore on their physical characteristics, such as size or density. For example, small EVs (sEVs) have been defined as EVs with a size $<$200 nm and large EVs (lEVs) with a size $>$200 nm (Doyle and Wang 2019).

2.3.2. EV cargo

EVs carry a complex cargo of proteins, RNA and lipids (Choi et al. 2013) that make them powerful intercellular communication entities (van Niel et al. 2018). In addition, it has recently been shown that EVs are also capable of transporting whole organelles, such as mitochondria (Morrison et al. 2017). To date, numerous high throughput characterization studies, such as proteomics, lipidomics, and transcriptomics, have been carried out to identify the cargo of EVs derived from various cell types and isolated in various biological fluids. The identified components (proteins, RNAs, and lipids) are listed in three databases: ExoCarta, Vesiclepedia, and EVpedia (Kalra et al. 2012; Keerthikumar et al. 2016; Kim et al. 2013). Since EVs can be isolated from different biological fluids such as plasma, pleural effusion, BALs, and urine, and because of their specific content of the original cell and its pathophysiological state, they are considered promising biomarkers, particularly for lung cancer and COPD (Kadota et al. 2017; O'Farrell and Yang 2019). Nevertheless, the specific characterization of their content, depending on the type of cell and the type of stimulus, can only be performed from *in vitro* studies using primary cells or cell lines.

2.3.3. Interaction of EVs with target cells

Once released, EVs target neighboring or distant cells to mediate their effects. To date, several mechanisms have been proposed to describe the interaction of EVs with the recipient cell, including: ligand/receptor signaling; vesicle fusion with the plasma membrane of the recipient cell; phagocytosis, macropinocytosis, clathrin-mediated endocytosis, and caveolin-mediated endocytosis (Maas et al. 2017; Mulcahy et al. 2014), but the precise mechanisms by which EVs interact with and transmit their contents to their target cell are still largely unknown (Russell et al. 2019).

Recent research findings suggest that one of the toxic effects of respiratory exposure could be the modulation of EV-associated miRNA, since its stimulate their production by the respiratory system, reach the bloodstream through the pulmonary capillary bed, remotely modify gene expression in cardiovascular tissues and contribute to cardiovascular dysfunction (Orozco and Lewis 2010; Pavanello et al. 2016). Requiring matching of the mRNA-target site (7 nucleotides) with the seed region of miRNA (2-8 nucleotides), a single

mRNA can be targeted by several different miRNA, and a single miRNA is involved in the regulation of post-translation expression of hundreds mRNA (Lewis et al. 2005).

2.3.4. Lung cells producing EVs

In the lung, EVs have been shown to have functions both in normal lung physiology, or lung homeostasis, and under conditions of stress and pathogenesis (Fujita, Kosaka, et al. 2015; Lee et al. 2018). A broad range of respiratory cell types can release EVs, that have already been well-described (Fujita, Kosaka, et al. 2015; Haggadone and Peters-Golden 2018). The first line of defense against lung injury is mainly represented by alveolar macrophages (AM), epithelial cells and polymorphonuclear neutrophils (PMNs), as well as endothelial cells, as a component, with alveolar epithelium, of the air-blood barrier.

AMs reside in the alveolar lumen, where they are continually exposed to inhaled toxicants, facilitate the removal of particulate material (PM and microorganisms) and help maintain homeostasis of the pulmonary microenvironment. These macrophages are embedded in the luminal fluid containing locally secreted endogenous mediators that can influence their differentiation and inflammatory phenotype (Joshi et al. 2018). To maintain homeostasis on the alveolar surface, AMs therefore establish a complex dialog with other pulmonary cells (immune, epithelial, and/or endothelial). In addition to the secreted soluble factors, AMs are able to produce EVs involved in this dialog, whether under normal conditions, during exposure to inhaled toxicants, or under pathological conditions (Haggadone and Peters-Golden 2018).

Epithelial cells are the main constituents of the respiratory epithelium whose main function is to maintain air conduction to the alveoli (Guillot et al. 2013). In addition, they constitute an effective barrier against aggressive molecules and an interface between the internal and external environment, being the main target of inhaled respiratory agents (Puchelle et al. 2006). Pulmonary epithelial cells appear to be the main source of EVs in the lungs (Fujita, Kosaka, et al. 2015). These EVs contain membrane mucins that are known to be part of the mucociliary clearance systems and innate immunity that protects the respiratory tract from environmental pathogens and xenobiotics (Gupta et al. 2019; Rose and Voynow 2006).

Lung tissue damage caused by exposure to toxic chemicals may result in the release of pro-inflammatory signals from resident cells such as AMs, epithelial and endothelial cells, triggering recruitment of PMNs by extravasation of the blood circulation to the site of the injury under the direction of cytokines and other chemoattractants. During lung disease, PMNs are dysregulated and airway neutrophilia have been shown to be a feature of multiple lung pathologies (Jasper et al. 2019). These cells act primarily as phagocytes and by exploding of reactive oxygen species (ROS) and hydrolases to eliminate the pathogen. To trap bacteria, PMNs also act by forming neutrophil extracellular traps (NETs), composed of an extracellular DNA fiber skeleton and its associated histones, granular proteins, and enzymes (Twaddell et al. 2019). PMNs are also capable of producing different kinds of EVs: first of all, during their extravasation, they generate uropods after adhering to endothelial cells from which small parts are released, forming neutrophil-derived trails, which exert pro-inflammatory functions by recruiting subsequent immune cells through the inflammatory foci; second, when the neutrophils arrive at the inflammatory site, they generate neutrophil-derived microvesicles which exert anti-inflammatory functions by limiting excessive immune responses of neighboring cells (Eken et al. 2010; Hong 2018). Very recently, PMNs have also been shown to release CD63+/CD66b+ exosomes, which play a role in destroying the pathogenic matrix in the lung (Genschmer et al. 2019).

In terms of pulmonary homeostasis, endothelial cells must also be considered, as they constitute the vascular endothelium that lines the inner surface of blood vessels and act as a semi-permeable barrier that separates blood from surrounding tissues. As a consequence, the pulmonary endothelium may also be involved in the pathogenesis of acute and chronic respiratory diseases. EVs produced by endothelial cells serve as messengers that mediate inflammatory and cytoprotective effects (Letsiou and Bauer 2018).

Finally, there is considerable recent evidence that EVs from bronchoalveolar lavage fluid (BALF) play an essential role in the pathogenesis of various lung diseases, as referenced by Carnino et al. (2019), including intercellular communication and inflammatory responses to infectious and sterile stimuli (Lee et al. 2018). In addition, elucidation of their composition now allows them to be used as biomarkers for many lung diseases (Kim et al. 2018; McVey et al. 2016). The first results published in this respect concern asthma, and highlight that the BALF EV profile shows substantial differences between healthy and asthmatic subjects (human or mouse), which might be crucial in the inflammatory response leading to asthma (Francisco-Garcia et al. 2019; Hough et al. 2018; Levänen et al. 2013; Nagano et al. 2019; Pua et al. 2019; Torregrosa Paredes et al. 2012). Other results of this type concern lung cancer where, again, the content of BAL EVs varies according to the disease, suggesting their contribution to lung cancer growth and the possibility of using them as a biomarker of disease progression (Domagala-Kulawik 2019; Kim et al. 2018; Rodríguez et al. 2014; Yang et al. 2019; Zhang et al. 2019).

3. Common underlying mechanisms of air pollutant toxicity and EV release

3.1. Oxidative stress

The overproduction of ROS resulting from exposure to air pollutants is an important mechanism by which environmental pollutants can affect human health (Poljšak and Fink 2014). The production of ROS is a highly regulated phenomenon, thanks to many enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), lactoperoxidase, or glutathione peroxidase (GPx). There are also non-enzymatic defense systems of the body against these ROS, for example glutathione (GSH) which can oxidize to GSSG or small fat-soluble molecules such as vitamins E, A, or D. This regulatory process is called the antioxidant system. ROS cause a lot of cellular damages through their ability to interact with and degrade proteins,

lipids, and DNA. However, at low doses, they play a beneficial role for the body by interacting in physiological processes such as apoptosis (Sies 2018). ROS are continuously generated and degraded by the body. When the physiological balance between ROS production and antioxidant response is no longer maintained, such as after exposure to $PM_{2.5}$ or to CS, ROS accumulate and lead to a state known as oxidative stress (Deng et al. 2013; Dergham et al. 2012; Jin et al. 2018; Zhang et al. 2017). The latter may contribute to the appearance of various pathologies, such as COPD and cancer (Boukhenouna et al. 2018; Valavanidis et al. 2013), most often related to inflammation (Rahman et al. 2006).

EVs have been repeatedly identified as mediators of the cellular response to various environmental physico-chemical stressors, such as heat, oxygen or nutrient deficiencies as well as oxidative stress (Abramowicz et al. 2019). EVs released in significant quantities during oxidative stress are directly involved in degenerative and nondegenerative diseases associated with respiratory exposure to toxic substances, including pulmonary and CVD and cancers (Benedikter, Wouters, et al. 2018; Pergoli et al. 2017). Although the mechanisms involved in EV release are not yet fully identified, we can propose a major role for plasma membrane oxidation. Indeed, membrane lipids are a major target of oxidative stress, particularly following exposure to PM (Kouassi et al. 2010). Several studies have shown that lowering the cholesterol pool can thus contribute to the release of EVs (Chen et al. 2010; Llorente et al. 2007; van Meteren et al. 2019). Cholesterol regulates membrane fluidity, and it is interesting to note that its depletion and subsequent changes in membrane fluidity promote the release of EVs (Nandi et al. 2009; Parolini et al. 2009). In addition, membrane stress may also affect specific microdomains of the plasma membrane, such as lipid rafts. These are described as being involved in the sorting of proteins to exosomes (de Gassart et al. 2003) and the fusion of MVBs with the plasma membrane (Salaün et al. 2004). Finally, ROS and lipid oxidation products such as aldehydes also contribute to the release of EVs (Benedikter, Weseler, et al. 2018).

3.2. Inflammation

Over the past two decades, the understanding of innate immunity has greatly improved. Although much of what has been learned comes from observing how pathogens induce inflammation, it has become clear that non-microbial activators are also able of triggering inflammation. This is called sterile inflammation (Shen et al. 2013). The inducers produced during sterile inflammation can be intracellular or be found in the extracellular matrix. They include nuclear proteins (e.g. High Mobility Group Box 1[HMGB1]), DNA and mitochondrial peptides, uric acid, and cell chaperones (e.g. heat shock proteins). They lead to the release of inflammatory mediators that are detected by innate immune cells (dendritic cells or macrophages) or non-hematopoietic cells (endothelial or epithelial cells). The induction of sterile inflammation also leads to tissue damage repair mechanisms that are mediated by macrophages that remove necrotic or apoptotic neutrophils and produce factors that enhance resolution (e.g. resolvins, TGF-β) or blood vessel growth in that region (e.g. VEGF; Shen et al. 2013). Sterile inflammation occurs in acute conditions such as ischemia reperfusion injury, trauma, crystal-induced inflammation, and also exposure to toxic substances. In most cases, the acute inflammation is not excessive; it resolves on its own after the destruction or removal of the deleterious agent or pathogen. Chronic inflammation is abnormally long due to its persistence over time, does not resolve properly and can cause damage to adjacent tissues. Acute and chronic lung inflammation is known to contribute to the serious effects of inhaled toxicants and is one of the pathways involved in the pathogenesis of many lung diseases (Wong et al. 2016). Excessive acute inflammation can lead to lung damages which can then lead to pulmonary fibrosis and interfere with gas exchange. Unresolved lung damages and chronic inflammation are frequently observed in acute respiratory distress syndrome, cystic fibrosis, COPD, and asthma. Chronic diseases that trigger sterile inflammation include particle-induced lung diseases such as asbestosis and silicosis, CVD, and some cases of tumors (Shen et al. 2013). Lung inflammation is characterized by the infiltration of activated macrophages, neutrophils, and T lymphocytes into the airways and the production of chemokines, oxygen radicals, proteases, and cytokines, such as TNF-α, IL-6, and IL-8 (Gualtieri et al. 2017; Wong et al. 2016).

As discussed in paragraph 2.3, all types of lung cells, i.e. alveolar epithelial cells, macrophages, vascular endothelial cells, and neutrophils, in addition to playing a crucial role in lung damage and inflammation, are able to secrete EVs. The EVs present in the lungs can act as both friend or foe depending on the signals received by the different lung cells: they can either maintain homeostasis by facilitating dialog between the AMs and the lung epithelial cells, or they can transmit pro-inflammatory signals that contribute to the development of lesions responsible for the initiation of lung pathologies. Recent studies show that the exposure both *in vivo* and *in vitro* of the lungs influences cargo loading and EV stability, as well as the absorption of EVs by the pulmonary epithelium (Haggadone and Peters-Golden 2018). These changes generated by the presence of toxic substances can lead to pro-inflammatory effects, promoting presentation of antigens, thereby regulating pulmonary inflammation and immune responses (Fujita et al. 2018). This balance between homeostasis and inflammation is conditioned by the origin of pulmonary EVs, which can come from healthy or inflammatory cells. Indeed, EVs from stressed cells can be a crucial signal in triggering the immune response, leading to the development of inflammatory lung diseases such as COPD or asthma (Lee et al. 2018). It is important to note that during inflammation vascular permeability is significantly increased, with serious consequences for the integrity of the alveolar-capillary barrier. This will influence the exchange of EVs between the blood and the epithelial wall, with pro-inflammatory pulmonary EVs reaching the systemic circulation and potentially distant organs (Wahlund et al. 2017). Moreover, as the number and profile (miRNA, proteins in particular) of EVs released into the respiratory tract but also into the

bloodstream, vary according to the pathophysiological and inflammatory status, EVs can be considered as novel biomarkers of various inflammatory lung diseases (Kadota et al. 2017; Kubo 2018).

4. EVs and PM

4.1. Epidemiology of PM

The limit established in the WHO guidelines for $PM_{2.5}$ level is an annual average of 10 μg/m^3, whereas the European Commission has set its air quality standard for $PM_{2.5}$ level in annual average at 20 μg/m^3. However, in 2016, the WHO modeled the levels of exposure to $PM_{2.5}$ and concluded that 92% of the world's population lives in areas where air pollution levels are higher than the guideline. Evidence from epidemiological studies has accumulated to support association between current levels of PM_{10} or $PM_{2.5}$, and increased risk of deaths for respiratory causes and CVD worldwide (Beelen et al. 2014; Langrish and Mills 2014; Pope et al. 2009). Therefore, exposure to PM was recently estimated to induce more than 48 000 premature deaths per year in France, 391 000 premature deaths per year in the European Union (EU-28), and about 3.15–3.3 millions premature deaths per year worldwide (Giannadaki et al. 2016; Lelieveld et al. 2015; Pascal et al. 2016).

As described above (paragraph 2.2), several epidemiological studies have shown that exposure to air pollution is likely to lead to the occurrence or exacerbation of inflammatory diseases, particularly lung diseases, such as asthma and COPD (DeVries et al. 2017; Garshick 2014; Havet et al. 2019; Jacquemin et al. 2015; Khreis et al. 2017; Li et al. 2016). In October 2013, the IARC concluded that there is strong evidence that real-world exposures to outdoor air pollution are associated with increases in genetic damage, including cytogenetic abnormalities, mutations in both somatic and germ cells, and altered gene expression, which have been linked to increased cancer risk in humans. Therefore, air pollution and PM were classified as carcinogenic for humans (Loomis et al. 2013). For example, a Japanese prospective cohort study showed an increase of the $PM_{2.5}$ atmospheric concentration of 10 μg/m^3 multiplies the risk of lung cancer by 1.24 fold (1.12–1.37; Katanoda et al. 2011). Finally, according to WHO data for 2015, Giannadaki et al. estimated that of the 3.15 million premature deaths (1.52–4.60 million) due to $PM_{2.5}$ worldwide, 1.31 million deaths were due to cerebrovascular disease, 1.08 million to ischemic heart disease, 374 000 to COPD, 161 000 to lung cancer and 230 000 to acute lower respiratory infections in children under 5 years of age (Giannadaki et al. 2016).

4.2. Main toxicity mechanisms of PM

The toxic effects of airborne PM to human health are strongly connected to the particle size and their composition (Samek et al. 2017). Theoretically, the upper respiratory tract is affected preferentially by $PM_{2.5\text{-}10}$, meanwhile fine and ultrafine particles reach the smallest airways and lung alveoli and spread into the systemic circulation (Brook et al. 2010; El Morabet 2018). Because of their small size, $PM_{2.5}$ can penetrate deeply into the lower tissues of the respiratory tract, irritate the alveolar wall, as well as increase permeability in lung tissues and consequently impair lung function (Pramitha and Haryanto 2019; Wu et al. 2018). One of the mechanisms by which ambient PM induced adverse health effects involved the generation of oxidative stress (André et al. 2011; Dergham et al. 2015). Due of its complex composition, $PM_{2.5}$ is able to generate ROS either directly via the Fenton reaction catalyzed by transition metals, such as iron, or indirectly via the biotransformation of organic xenobiotics, such as PAHs (Aztatzi-Aguilar et al. 2018; Dergham et al. 2011; Rao et al. 2018). Airway epithelial cells (AEC) and resident lung macrophages also play a pivotal role in the recognition of PM and in the onset of the inflammatory response (Gualtieri et al. 2017; Santus et al. 2014). Indeed, exposure to fine particles causes a pro-inflammatory reaction, resulting in an increased secretion of inflammatory cytokines such as TNF-α, IFN-γ, IL-6, IL-8, IL-12 released in lung as well as in peripheral blood, potentially leading to a systemic inflammation and immune disorder (Dergham et al. 2015; Gu et al. 2017; Manzano-León et al. 2016; Wang et al. 2019). Exposure to $PM_{2.5}$ also increased the number of immune cells (neutrophils, lymphocytes, and macrophages) infiltrated in the lungs (Wang, Song, et al. 2017). Chronic exposure to $PM_{2.5}$ can alter inflammatory markers such as C-reactive protein, directly involved in the development of CVD (Ostro et al. 2014). It can also lead to the development of chronic inflammatory diseases. For example, chronic inflammation as well as the immune response involved in asthma have been shown to be related to the chemical composition of $PM_{2.5}$ (Wagner et al. 2012). It has indeed been shown a positive correlation between ambient $PM_{2.5}$ and neutrophils number in the peripheral blood of 32 704 healthy volunteers measured one day after inhalational ambient $PM_{2.5}$ exposures (Cui et al. 2019). These neutrophils are then recruited in the lung through extravasation from blood and are supposed to be involved in $PM_{2.5}$ harmful effect by exaggerating the inflammatory response and injury. During this phase of inflammation induced by exposure to PM, the number of macrophages also increases significantly by recruiting infiltrating monocytes becoming M1 macrophages (Goto, Hogg, et al. 2004; Goto, Ishii, et al. 2004). There is also a relationship between $PM_{2.5}$ exposure and COPD, particularly during long-term exposure (Lakhdar et al. 2011; Rice et al. 2015).

Likewise, several studies documented that exposure to PM can potentially cause genetic and epigenetic alteration (Billet et al. 2018; Borgie et al. 2015; Fossati et al. 2014; Lepers, Dergham, et al. 2014). Recently, miRNAs have emerged as important actors in the impact of PM on cardiovascular and respiratory system (Bollati et al. 2014). Based on the findings of the study of Chen et al., long-term exposure to PM was negatively associated with miRNAs (miR-199a-5p, miR-21-5p, miR-1-3p, miR-146a-5p, and miR-187-3p) predicted to target mRNAs of interleukin-1 (IL-1), TNF, toll-like receptor 2, and endothelin 1. It suggests that exposure to ambient PM causes downregulation of candidate miRNAs involved in inflammation, endothelial dysfunction, coagulation, and CVD (Chen et al. 2018).

4.3. Effects of PM on EVs

Although the number of publications examining the relationship between PM and EVs is still limited (less than 20), there is growing evidence that exposure to PM is closely associated with increased release of EVs (Table 1). Nevertheless, it is difficult to make a comparison between the studies, as some have been conducted *in vitro*, others in humans with exposure assessment by air monitoring (Bollati et al. 2014; Rodosthenous et al. 2015). In addition, based on the *in vitro* studies, it is still tricky to identify a minimum dose of exposure that induces the release of EVs. Indeed, a thorough comparison between *in vitro* studies based on to the exposure doses is difficult, as some important parameters vary. First of all, the collection method, by cascade impaction or filtration, changes the recovery of particles, and their nature. It also has an impact on the size of the sampled PM, with or without the presence of the ultrafine fraction. It can therefore change the composition of the sampled PM, since some chemicals such as PAHs are much more present in the smallest particles. Different methods of PM recovery involve different ways of exposing the cells. Indeed, some researchers use native PM recovered from impaction plates, while others use PM collected on filters either recovered directly by brushing the filters or indirectly by extraction using an organic or aqueous solvent. The latter method results in increased bioavailability of the chemicals in the organic or water-soluble extracts, and changes the real dose of exposure compared to native PM (Xu, Wang, et al. 2019). Moreover, some studies report data in different concentration units (μg/cm^2; μg/mL). This complicates comparison between studies. Finally, the duration of exposure obviously also plays a role in the impact of PM on the release of EVs. The main findings on the effects of PM on EVs are summarized in Figure 1.

4.3.1. Effects of PM on EV release

Studies on differences in EV release as a function of exposure to PM are listed in Table 1. The term used in the cited studies to describe the measured EVs (MV, MP, exosomes, EV) or their content (miRNA) was indicated in the table, as well as the model from which the EVs were produced. The different ways in which EVs have been isolated and characterized in this context have been mentioned previously (Benedikter, Wouters, et al. 2018).

In vitro studies – Recently, Martin et al. have shown that dose and exposure time have an impact on the production of EVs by mononuclear cells exposed to $PM_{2.5}$. After 6 h of exposure, no increase is observed while it becomes significant after 24 h and is further exacerbated after 48 h. The dose increase induced also significant increases of EVs release (Martin et al. 2019). At the same time, Stassen et al. have shown that EV production is induced regardless of the type of PM, $PM_{2.5}$, or PM_{10}, but the mechanism involved seems different, and could imply discrepancies in the ability of these PM to form ROS. Nevertheless, these results should be taken with caution since they are not native PM but recovered using an organic solvent from a filter (Stassen et al. 2019). Neri et al. have reported that a large amount of EVs are secreted by mononuclear and endothelial cells treated with

Table 1. Overview of the literature relating the effects of exposure to air pollutants on EV release.

Air pollutants	Effects on EV release	Models of exposure	References
$PM_{2.5}$	↗ EV	Human macrophages, THP-1, BEAS-2B	Martin et al. 2019; Stassen et al. 2019
	↗ EV miRNA	Healthy subjects (blood)	Bollati et al. 2015; Rodosthenous et al. 2015
	↗ MV	Healthy subjects (blood)	Bonzini et al. 2017
	↗ and ↘ exosome miRNA	BEAS-2B	Xu, Wang, et al. 2019
	↗ MP	Healthy and asthma patients (blood)	Gao et al. 2017; Pope et al. 2016
PM_{10}	↗ EV	BEAS-2B, overweight and obese subjects (blood)	Pergoli et al. 2017; Stassen et al. 2019
	↗ and ↘ EV miRNA	A549, Healthy subjects, overweight and obese subjects (blood)	Bollati et al. 2015; Pavanello et al. 2016; Pergoli et al. 2017
	↗ MV	Healthy subjects, Diabetic subjects (blood)	Bonzini et al. 2017; Emmerechts et al. 2012
	↗ MP	HUVEC, PBMC	Neri et al. 2016
Cigarette smoke	↗ EV	BEAS-2B, Healthy, and cancer subjects (BALF)	Benedikter et al. 2019, 2017; He et al. 2019; Stassen et al. 2019; Wu et al. 2019
		Healthy and COPD subjects (blood)	Feller et al. 2018
		Rat (blood) and PAEC	Zhu, Xiao, et al. 2019
	↗ and ↘ EV miRNA	Healthy subjects (BALF), HBEC, BEAS-2B, Healthy and COPD subjects (blood)	Fujita, Araya, et al. 2015; Héliot et al. 2017; Liu et al. 2016; Sundar et al. 2019
	↗ MV	THP-1, HMDM, neutrophils	Folkesson et al. 2015; Li et al. 2013, 2010
	↗ exosome miRNA	HBEC	Xu et al. 2018
	↗ exosome	AmEC, BEAS-2B	Hadley et al. 2018; Moon et al. 2014; Sheller et al. 2016
	↗ MP	PBMC, Healthy and COPD subjects (blood), HLMVEC, HPAEC	Cordazzo et al. 2014; Gordon et al. 2011; Mobarrez et al. 2014; Serban et al. 2016; Takahashi et al. 2013
Asbestos	↗ EV miRNA	MPM patients and cancer-free subjects (blood)	Cavalleri et al. 2017
	↗ exosome proteins	C57BL/6 mice (blood), MM cells	Greening et al. 2016; Munson, Lam, MacPherson, et al. 2018

A549: Adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells; AmEC: human Amnion Epithelial Cells; BALF: bronchial alveolar lavage fluid; BEAS-2B: human normal bronchial epithelium cells; COPD: chronic obstructive pulmonary disease; HBEC: human bronchial epithelial cells; HLMVEC and HPAEC: human lung microvascular and human pulmonary artery endothelial cells; HMDM: human monocytes-derived macrophages; HUVEC: human umbilical vein endothelial cells; MM: malignant mesothelioma; MPM: malignant pleural mesothelioma; PAEC: rat pulmonary artery endothelial cells; PBMC: peripheral blood mononuclear cells; THP-1: human monocytic leukemia cells.

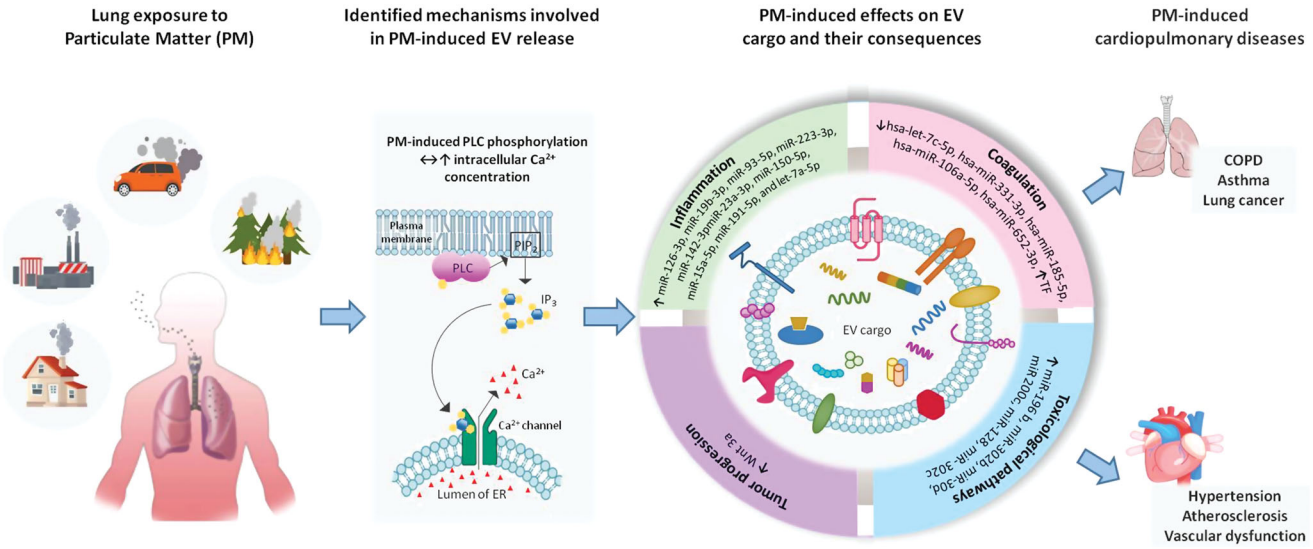


Figure 1. Schematic representation of the identified mechanisms involved in EV release and of EV composition upon PM exposure, and of EV potential roles in PM-associated cardiopulmonary diseases. Upon exposure to particulate matter (PM), the phospholipase C (PLC) becomes activated and leads to Phosphatidylinositol-4′-5′-biphosphate (PIP2) cleavage in Inositol-1,3,5-triphosphate (IP3). Activated IP3 Receptor, a calcium ion (Ca2+) channel, triggers cytoplasmic Ca2+ influx from the lumen of endoplasmic reticulum (ER), resulting in an increase of EV release. PM-induced EVs are enriched with several molecular cargos, especially miRNAs (miR) and proteins, affecting diverse biological processes related to cardiopulmonary diseases. α-SMA: alpha-smooth muscle actin; COPD: chronic obstructive pulmonary disease; TF: tissue factor.

SRM1648a urban PM, compared to nontreated cells, predominantly at early time point (after 1 h of incubation with SRM1648a; Neri et al. 2016). These PM induced a rapid calcium mobilization and leads to an increase of intracellular calcium concentration. Inhibition of phospholipase C using its specific inhibitor (U73122) in PM-stimulated cells, reduced the release of Ca^{2+} stored in endoplasmic reticulum and completely abolished PM-induced EV generation. Thereby, PM induce rapid EV shedding in a calcium dependent manner (Neri et al. 2016).

Human studies – The data from the human studies come only from people exposed in the environment, whose level of exposure has been characterized either individually (sensors) or collectively (assessment of exposure to PM based on data from monitoring stations). These studies confirm *in vitro* findings that exposure to PM could induce an increase in EV release, in particular from endothelial cells in the blood. For example, Pope et al. showed that episodic exposure to $PM_{2.5}$ was associated with an increase in circulating endothelial microparticles (EMPs) indicating endothelial apoptosis associated with a pro-inflammatory and anti-angiogenic blood profile, potentially involved in increasing the risk and severity of CVD (Pope et al. 2016). These results were confirmed and extended by showing that being overweight in PM exposed subjects contributes to the increase in endothelial EVs (Bonzini et al. 2017; Pergoli et al. 2017). Emmerechts et al. further suggested that increasing the number and procoagulant potential of MVs, rather than increasing coagulation factors per se, might contribute to the prothrombotic risk induced by exposure to air pollution (Emmerechts et al. 2012). Interestingly, a study examined the subsequent effect of improved air quality on biomarkers and systemic inflammatory MPs in asthmatic patients and healthy controls two months after the Beijing 2008 Olympic Games. The authors concluded that this improvement in air quality, in particular the decrease in $PM_{2.5}$ concentration 2 months earlier, induces a significant reduction in circulating levels of pro-inflammatory cytokines and endothelial MPs (Gao et al. 2017).

4.3.2. Effects of PM on EV miRNA cargo

In vitro studies – Few papers focused on changes in the miRNA content of EVs from cells exposed to PM. The first one of its kind demonstrated the increase in miR-128 in A549 alveolar cells depending on the dose and time of exposure to PM_{10} (Bollati et al. 2015). The latest one was designed to highlight the expression profiles of Exo-MiRs of pulmonary epithelial cells in response to exposure to low doses of long-term $PM_{2.5}$, in order to identify in a preliminary manner the Exo-MiRs-mRNA interactions and their role in $PM_{2.5}$-induced pulmonary toxicity. Once again, these results must be taken with caution, especially given the way in which PM were obtained. The authors conclude that long-term exposure to $PM_{2.5}$ promotes the proliferation, invasion, and migration of pulmonary epithelial cells, and this toxicity could be mediated by regulation of mRNAs by exosomal miRNAs (Xu, Wang, et al. 2019).

Human studies - Several studies have shown that exposure to ambient dose of PM remarkably alters miRNA expression in circulating EVs detected in plasma (Bollati et al. 2015; Pavanello et al. 2016; Pergoli et al. 2017; Rodosthenous et al. 2015). Bollati et al. compared the expression levels of miRNA following exposure of 55 study participants to PM_{10}. Six miRNA were found to be differentially expressed. Notably, miR-128 and miR-302c were upregulated 6 and 14 folds, respectively. After application of different miRNA target prediction, 919 and 894 mRNAs downstream targets were predicted for miR-302c and miR-128, respectively. Ingenuity Pathway Analysis highlighted that miR-128 is directly involved in coronary artery disease pathways, and miR-302c

is part of coronary artery disease, cardiac hypertrophy and heart failure pathways (Bollati et al. 2015).

More recently, Pergoli et al. highlighted that window exposure of 883 subjects to PM_{10} induces several fold increase in EVs secretion from different cell types including $CD61^+$ EVs released from platelets, $CD14^+$ EVs released from monocytes, $CD66^+$ EVs secreted by neutrophils, $EpCAM^+$ EVs originated from epithelial cells and $CD105^+$ EVs released from endothelium. Following screening of EV miRNA, unique miRNA signatures characterized each subset in response to short-term exposure to PM_{10}. Despite miRNA cargo selection in each EV subset, 40 EV miRNA were found to be remarkably differentially expressed in at least 50% of subjects in the screening subset. Among the 40 miRNA, 9 functional EV miRNA were downregulated in response to short-term exposure to PM_{10}. It should be noted that exposure to PM_{10} was positively associated with a significant increase of fibrinogen levels (Pergoli et al. 2017). Five from these nine downregulated EVmiR (hsa-let-7c-5p, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-185-5p, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-652-3p) influence directly or indirectly fibrinogen levels, suggesting that PM_{10}-induced EVs promote blood coagulation and increase risk of CVD via their RNA cargoes (Pergoli et al. 2017).

On the other hand, subchronic exposure to $PM_{2.5}$ (6 months) was associated with significant upregulation in the circulating EV miRNAs miR-126-3p, miR-19b-3p, miR-93-5p, miR-223-3p, and miR-142-3p levels in serum. In contrast, after 1 year exposure window, the 5 miRNA miR-23a-3p, miR-150-5p, miR-15a-5p, miR-191-5p, and let-7a-5p showed an increase of their expression levels. Using *in-silico* pathway analysis, 16 mRNA targets have been shown to be most significantly associated with $PM_{2.5}$-related EV miRNA, and to be directly involved in cardiovascular-related pathways such as atherosclerosis, cardiac hypertrophy, and inflammatory responses (Rodosthenous et al. 2015).

Finally, based on the study of Pavanello et al., PM composition, in particular metal fraction, influence EV miRNA cargo (Pavanello et al. 2016). Seventeen miRNA were upregulated after continuous exposure of 63 subjects to PM and PM-related metals. Among all 17 miRNAs, miR-196b was found to be the most associated to PM-related metal exposure. EV secretion with a high content of miR-302b, miR-30d, and miR-200c was positively associated with PM-related metals including cadmium, zinc, lead, and aluminum. Importantly, these EVmiR regulate 4067 mRNA which are directly involved in toxicological pathways, belonging to cardiac hypertrophy, cardiac necrosis/cell death, p53 signaling, and hypoxia-inducible factor signaling (Pavanello et al. 2016; Puddu et al. 2010).

4.3.3. Effects of EV produced after exposure to PM

Few studies have evaluated the direct effects of EVs produced during exposure to PM on their potential target cells. Some of the previously cited studies have shown that in humans, exposure to PM induces in majority the release of endothelial MP and their effects have been estimated by analysis of the pathways potentially modified by their miRNA cargo (Pavanello et al. 2016; Pergoli et al. 2017). PM-induced MPs have been shown to carry more tissue factor (TF), resulting in procoagulant activity (Neri et al. 2016). This is consistent with previous studies showing that endothelial EVs released as a result of endothelial activation during inflammation have been described as affecting various aspects of the inflammatory response, angiogenesis, apoptosis and cell survival, target cell differentiation, and function (Vítková et al. 2018). Moreover, EVs derived from macrophages exposed to $PM_{2.5}$ have recently been shown to induce the production of the pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNFα by lung epithelial cells, suggesting their role in the maintenance of PM-induced inflammation over time (Martin et al. 2019). Finally, their role in lung carcinogenesis potentially induced by exposure to PM has recently been discussed. Exposure of lung cancer cells (A549) to $PM_{2.5}$ induced high expression of Wnt3a both in the exposed A549 cells and in the exosomes produced in response. These exosomes with a high level of Wnt3a promote the proliferation of A549 cells *in vitro* as well as tumor progression *in vivo* (Xu, Jiao, et al. 2019).

5. EVs and CS

5.1. Epidemiology of CS

According to the WHO, cigarette, the modern form of tobacco use, is the only legal drug used by approximately 1 billion men and 250 million women worldwide (Hecht 2003). Tobacco smoking is the greatest leading cause of premature deaths, killing more than 100 million people during the twentieth century (Husain et al. 2016). Each year, about 6 million deaths are attributable to the direct use of tobacco. In the early 2030s, the death toll is expected to reach the 8 million people per year, 600 000 of which are due to the secondhand smoke exposure. Cigarette is considered as the main death cause of 50% of their current users suffering from cancer, cardiovascular or pulmonary diseases (Hoffman and Tan 2015).

5.2. Main toxicity mechanisms of CS

CS is an extremely harmful component of air pollution. CS contains a lot of compounds classified as powerful lung carcinogens including different chemical classes (Levitz et al. 2004). Nicotine which is one of the most abundant constituent of CS is not directly carcinogenic. However, its nitrosation generates *N*-nitrosamines which are among the most important and most potent carcinogens in CS (Sanner and Grimsrud 2015). Addiction to nicotine results in maintenance of tobacco smoking behavior, leading to a chronic exposure to tobacco ROS, reactive carbonyl species (RCS), and other carcinogens (Gibbs et al. 2016).

CS is responsible for the production of ROS, such as superoxide radical $O_2^{\bullet -}$, hydrogen peroxide H_2O_2, and hydroxyl radical ($HO^{\bullet}$), and peroxyl ($ROO^{\bullet}$), that are considered as a potent disruptive of the balance between oxidants and antioxidants, leading to an increase in lipid peroxidation, and oxidation of proteins and DNA (Isik et al. 2007; Kamceva et al. 2016; Valavanidis et al. 2009). Hydroquinone complexes diffuse through the cell membranes and generate

semiquinones, superoxide radicals, and hydrogen peroxide. Smoking may cause increased phagocytic activity, which in turn leads to increased oxidative stress (Puri et al. 2008). In contrast to ROS and free radicals, acrolein and methyl vinyl ketone are relatively stable carbonyl compounds. They are highly toxic, chemically reactive, and extremely hydrophilic. They can cross the airway epithelial barrier and reach the bloodstream, causing oxidative damages. These aldehydes can deplete GSH and modify protein -SH and -NH_2 groups (Puri et al. 2008). These RCS strongly affect protein conformation and functionality as a result of protein carbonylation, known as an irreversible oxidative modification (Horinouchi et al. 2016; Pang and Lewis 2011; Semchyshyn 2014). It should be noted that, following protein kinase C (PKC) carbonylation, RCS trigger PKC-dependent activation of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NOX) stimulating *de novo* generation of O_2^-. SOD can then convert O_2^- in H_2O_2 and then to $HO^\bullet$. The production of ROS by enzymatic and non-enzymatic systems may cause tissue and cell damages that can spiral into a cycle of increased inflammation and oxidative stress. Therefore, increasing ROS levels alter redox signaling and are a well-established risk factor for CVDs, including hypertension, atherosclerosis, ischemic heart disease and vascular endothelial dysfunction, and respiratory diseases such as asthma and COPD (Sack et al. 2017; Taleb et al. 2018; Zeglinski et al. 2019).

5.3. Effects of CS on EVs

The role of EVs in pathogenesis induced by exposure to CS has been increasingly studied in recent years and has already led to several reviews (Benedikter, Wouters, et al. 2018; Parris et al. 2019; Ryu et al. 2018). These studies (reported in Table 1) clearly show that EVs are involved and associated with the deleterious mechanisms induced in the development of lung cancer, CVD and COPD caused by CS, such as inflammation, coagulation, and angiogenesis. In this section, we will focus on the latest findings on this topic. Nevertheless, based on the knowledge available in the literature to date, it is not clear whether or not smokers experience an increase in EV levels after exposure to cigarette (Enjeti et al. 2017). This is even truer when studying their profile. Individuals show a high degree of heterogeneity in the expression profiles of markers present in plasma EVs (Jørgensen et al. 2013) and no clear clustering has been observed for demographic variables such as sex, age or smoking status (Baek et al. 2016). The main findings on the effects of CS on EVs are summarized in Figure 2.

5.3.1. Effects of CS on EV release

As described above, CS exerts cellular stress that contributes to a modification in the release of EVs numerous studies demonstrated that cigarette smoke extract (CSE) induces rapid shedding of EVs as a result of increase in intracellular calcium concentration $[Ca^{2+}]i$. Using a fluorescent probe Fluo-4 NW to measure intracellular calcium concentration and flow cytometry for EVs quantification, Cordazzo et al. have demonstrated that treatment of mononuclear cells with CS at different concentrations is sufficient to induce rapid mobilization and increase of $[Ca^{2+}]i$ resulting in augmentation of EV generation. This Ca^{2+}-triggered reaction was strongly inhibited after incubation of cells with L-type

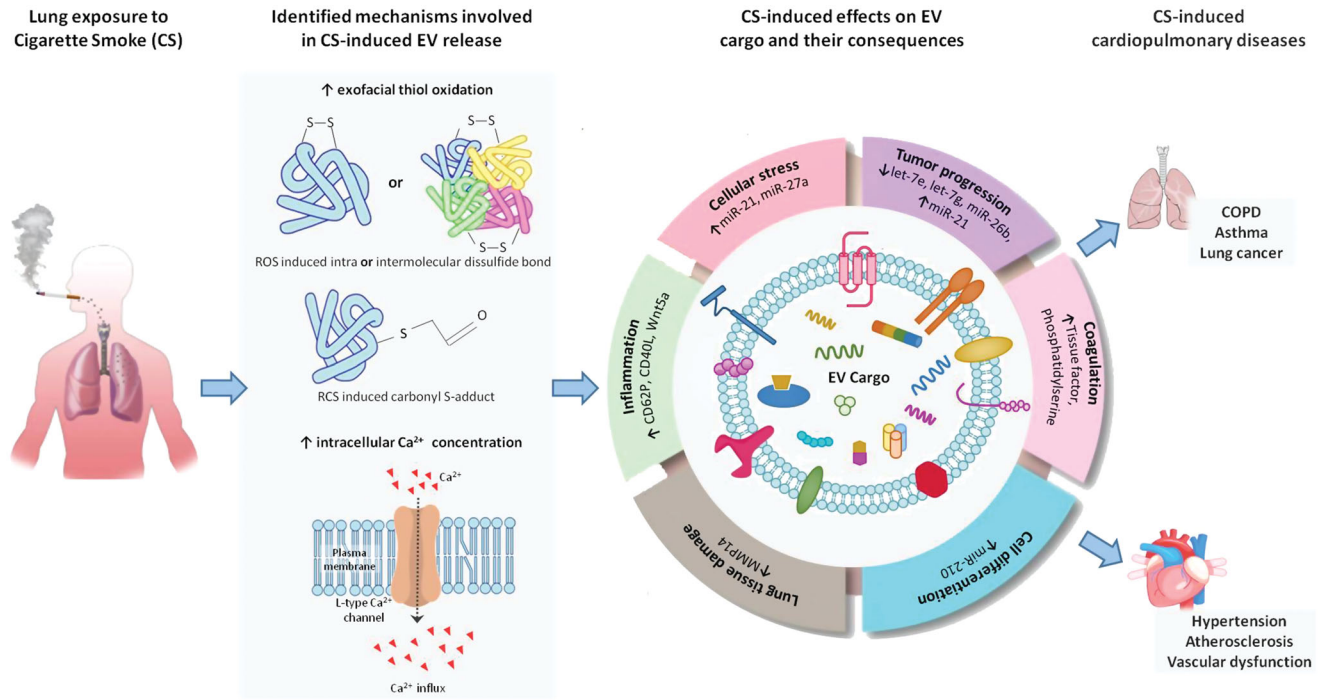


Figure 2. Schematic representation of the identified mechanisms involved in EV release and of EV composition upon CS exposure, and of EV potential roles in CS-associated cardiopulmonary diseases. Cigarette smoke (CS) contains highly reactive compounds that are directly involved in the increase of exofacial thiol oxidation and/or intracellular calcium (Ca2+) concentration. These 2 mechanisms are known to induce EV release. CS-induced EVs encapsulate a selective repertory of RNA and proteins that modulate many cellular processes associated to cardiopulmonary diseases. CD: cluster of differentiation; COPD: chronic obstructive pulmonary disease; miR: microRNA; MMP14: matrix metalloproteinase; RCS: reactive carbonyl species; ROS: reactive oxygen species.

calcium channel blocker or free calcium chelator such as EDTA (Cordazzo et al. 2014).

Apart increasing of intracellular calcium concentration, oxidative stress is another identified factor mediating EV secretion induced by CSE. Incubation of AEC with CSE in presence *N*-acetylcysteine (NAC), known as antioxidant, resulted in a complete prevention of CSE-induced $CD63^{+}CD81^{+}$ exosomes release (Benedikter et al. 2017). The underlying mechanism implies thiol groups of cysteine residues in proteins particularly prone to oxidation because of its high nucleophilic property (Poole 2015). In an oxidized environment, where cells are incubated with electrophilic compounds such as ROS and RCS, the high nucleophilicity of thiol make it a powerful subject to electrophilic attacks, resulting in its conversion from reduced form (-SH), to its oxidized form, known as disulfide bond (-S-S-; Benedikter, Weseler, et al. 2018; Shimizu and Masuda 2017). ROS leads to the formation of an unstable cysteine sulfenic acid intermediate that can react with other thiol group resulting in formation of intramolecular or intermolecular disulfide bonds, whereas thiol modification by RCS leads to the formation of carbonyl S-adduct on cell surface (Benedikter, Weseler, et al. 2018). The highly reactive CSE compounds acrolein appears to be involved in this mechanism increasing EV secretion (Benedikter et al. 2017). It is important to note that there is a link between oxidative thiol modification and calcium mobilization. For example, transient receptor potential ankyrin subtype 1, a redox sensitive calcium channel, become activated upon covalent thiol oxidation by ROS or RCS, resulting in a cytoplasmic calcium influx that is a major inducer of EVs release (Benedikter, Weseler, et al. 2018).

Moreover, depending on the type of lung cells, CS causes different responses. It increases the release of CD63 + CD8 + EV and TF + EV by bronchial epithelial cells and pulmonary fibroblasts, which has been associated with a decrease in thiols exposed to the cell surface. In these cells, bacitracin, a membrane-impermeable thiol-blocking agent, was shown to increase the release of EVs. In addition, the release of the same type of EVs induced by CSE could be prevented with NAC. However, despite a significant depletion of cell surface thiols during CS treatment, HPMEC, and THP-1 cells did not show an increased release of EVs. In agreement, the release of EVs could not be triggered by bacitracin or decreased by NAC (Stassen et al. 2019). The endothelial origin of the cells (microvascular or aortic) also influences the type of MP released following exposure to CS, more particularly their antigenic composition (PECAM-1 and MCAM; Takahashi et al. 2013).

Since smoking is the main cause of COPD, cell destruction is a common component of COPD. As little as one cigarette for a short period of time can cause early release of endothelial progenitor cells (EPCs), as well as EMPs in plasma (Mobarrez et al. 2014; Serban et al. 2016), Gordon et al. have hypothesized that smokers with symptoms of lung destruction can have high plasma concentrations of EMP. To measure lung destruction, the authors used the Diffusing capacity factor of the lung for Carbon monOxide (DlCO), a lung function measurement that reveals the functional integrity of the alveolar-capillary barrier. Healthy smokers and symptomatic smokers with normal DlCO spirometry had slightly elevated levels of EMP in circulation compared to healthy nonsmokers. It is striking, however, that healthy smokers with normal spirometry but an isolated reduction in DlCO had elevated levels of circulating EMP compared to all other groups, with EMP probably from endothelial cells in the lungs undergoing apoptosis. This suggests that it may be possible to identify a point in time when intervention with smoking cessation therapy could prevent irreversible lung destruction associated with the development of COPD. High levels of EMP could be a useful biomarker to identify smokers with early emphysema at a stage where the intervention can prevent further permanent lung destruction (Gordon et al. 2011).

5.3.2. Effects of CS on EV cargo and its impact on other cells

In addition to EV release mechanisms, several studies have examined the epigenetic effects of EVs produced after CS exposure, including the production of encapsulated extracellular miRNAs and their impact on target cells. A recent study was carried out on plasma-derived EVs/exosomes isolated from nonsmokers, smokers, and patients with COPD and characterized by small RNA-sequencing analysis to identify the enrichment of ncRNA classes, with a focus on miRNAs, tRNAs, and piRNAs. MiRNAs that showed significant changes between different pairwise comparisons (nonsmokers vs. COPD and nonsmokers vs. smokers) were selected and validated in EVs and in total RNA from BEAS-2B control cells versus CSE-exposed. The analysis of gene enrichment revealed several targets that play a crucial role in the biological pathways that regulate inflammation, extracellular matrix and tissue remodeling in smokers and COPD patients (Sundar et al. 2019). Fujita et al. showed that 8 miRNAs (let-7a, let-7b, let-7c, let-7f, let-7g, let-7i, miR-100, and miR-210) exhibited significant expression changes in the EVs released by human bronchial epithelial cells after *in vitro* exposure to CSE. Among them, miR-210 was significantly upregulated and shown to be implicated in the promotion of myofibroblast differentiation in lung fibroblasts by targeting *ATG7*, a gene implied in autophagy modulation (Fujita, Araya, et al. 2015). Héliot et al. recently confirmed the appearance of specific miRNA profile after exposure to CS. They investigated the differences in lung EVs isolated from BAL between smokers and nonsmokers. The following miRNA let-7e, let-7 g, and miR-26b were significantly less present in smokers EVs than in nonsmokers (Héliot et al. 2017). The let-7 miRNAs are frequently found in EVs (Arroyo et al. 2011). The decrease in the expression of these tumor suppressor miRNAs has been recognized as contributing to the development of lung tumors. They are indeed decreased in patients with cancer that is often associated with poor outcomes (Chirshev et al. 2019). On target cells, smoker EVs were shown to significantly induce the expression of miR-21 and miR-27a, and to repress their target genes NF-E2-related factor 2 (NRF2), a key regulator of antioxidants and cellular stress responses implicated in lung carcinogenesis and phosphatase and tensin homolog, a tumor suppressor gene targeted by miR-21 (Nair et al. 2012). Very recently, an analysis of a cross-sectional cohort revealed

a significantly higher concentration of EVs coming from BALF of smokers and NSCLC patients compared to healthy subjects. Interestingly, the authors showed that EVs coming from smokers have distinct miRNA, mRNA, and lncRNA profiles compared with NSCLC patients. However, nine potential BAL biomarkers in lung cancers were found to be present and significantly over expressed simultaneously in smokers and NSCLC lung EVs. The authors proposed that CS-induced EVs carry miRNAs, mRNAs, lncRNAs, and tumor-associated antigens, which may contribute to the development of lung cancer (Wu et al. 2019). Among the miRNA identified as being up-regulated in EV produced after CS exposure, miR-21, well-known for its oncogenic activity, is the most studied (Gao et al. 2012; Kumarswamy et al. 2011). miR-21 content in exosomes produced after CSE exposure has been shown to be increased by STAT3 activation and to be transferred from CSE-transformed cells into normal Human Bronchial Epithelial cells and HUVEC, where it induced angiogenesis through VEGF expression and secretion (Liu et al. 2016). Moreover, exosomal miR-21 derived from bronchial epithelial cells exposed to CS has been identified as a mediator of myofibroblast differentiation through the pVHL/HIF-1α signaling pathway, suggesting its role in aberrant airway remodeling observed in COPD induced by cigarette smoking (Xu et al. 2018). Finally, EVs from BEAS-2B cells exposed to CS were found to be carriers of miR-21 to macrophages and promote their M2 polarization, which then leads to the epithelial-mesenchymal transition of BEAS-2B, a process involved in the pathogenesis of COPD. This study consolidated the pathogenic role of miR-21 in COPD by promoting the TEM in bronchial epithelial cells through macrophage polarization (He et al. 2019). Furthermore, an increased level of serum miR-21 has been associated with the early pathogenic process of COPD, suggesting miR-21 to be considered for evaluating the development of COPD in heavy smokers (Xie et al. 2014, p. 21).

Several studies have also investigated the protein profile of EVs produced in response to exposure to CS. Some of them have highlighted the increase of functional proteins involved in the deleterious effects of EVs from exposed cells. A proteomic analysis revealed that 585 proteins were identified for modification in EV composition due to exposure to CS and divided into three subsets: unchanged proteins (384; 65.6%), regulated upward (154; 26.3%), or downward (47; 8.0%) of CSE-EVs. Among the different biological pathways, most strongly enriched in CSE-EVs was "hemostasis." An important element of this pathway is the TF, which is sufficient in itself to trigger the extrinsic pathway of coagulation. CSE-EVs were shown to induce more thrombin generation than control-EVs, at least partly thanks to TF presence but also to PhosphatidylSerine (PS) content (Benedikter et al. 2019; Lawson et al. 2016; Ryu et al. 2018; Serban et al. 2016). This is in accordance with the study of Li et al., showing that exposure of THP-1 to CSE induced in a time and dose-dependent manner and the generation of MV possessing procoagulant activity due to the presence of TF mRNA and protein (Li et al. 2010). Based on another study by Li et al., incubation of human THP-1 macrophages with tobacco smoke surprisingly quadrupled the release of MMP14 positive EVs in a time dependent manner. Due to the up-regulation of MMP14, CS-induced proteolytic EVs were characterized by gelatinolytic and collagenolytic activity, resulting in the degradation of various components of the extracellular matrix and promoting lung tissue damage in smokers (Li et al. 2013).

Other studies have shown the implication of CSE-EV proteins in exacerbation of inflammation. Upon activation, the leukocyte CD62P receptor is up-regulated on platelets-released EVs. By binding to P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1), CD62P is directly involved in the recruitment of leukocytes at the site of injury during inflammation. In addition, CS-induced platelet-EVs showed an increase expression of CD40L, a co-stimulatory protein expressed on the T cell surface, which has been found to be essential in mediating endothelial cells activation to produce chemokines and promote inflammation (Mobarrez et al. 2014). Feller et al. also showed that the pro-inflammatory protein Wnt5a is upregulated by exposure to CS, such as pro-inflammatory cytokines, in mice and human models. Wnt5a, in addition to being a pro-inflammatory Wnt ligand, can inhibit the transcription of anti-inflammatory PPARγ and affect the polarization of M1/M2 macrophages. Wnt5a and pro-inflammatory cytokines can be transported in EVs that reach and deliver their contents to each organ evaluated in the blood of COPD patients, and in the liver, lungs, spleen, and thymus of mice that received EVs enriched with Wnt5a. These results suggest a potential mechanism of CS effects, inducing local inflammation becoming systemic with the contribution of Wnt5a and inflammatory cytokines present in CSE-EVs (Feller et al. 2018).

Interestingly, the team of Sheller et al. published interesting results on the role of exosomes in the signals from the fetus to the mother that affect the contractile state of the uterus and induce its transition from a relaxed state to a labor state to facilitate birth. First, they have shown that human amnion epithelial cells (AECs) release exosomes containing H3, HSP70, and p38 MAPK, markers involved in stress associated cellular signaling and significantly higher in CSE treated AEC exosomes compared to control AEC exosomes (Sheller et al. 2016). Moreover, they observed a translocation of the nuclear protein HMGB1 and cell-free fetal telomere fragments, both identified as products of fetal cell senescence under oxidative stress, from the nucleus to exosomes after CS exposure of AECs (Sheller-Miller et al. 2017). This is in accordance with previous results, showing that CS triggers HMGB1 translocation from the nucleus to the cytoplasm and cell membrane, and release from CS-exposed macrophages, either as a soluble form or as a MV-associated form into the extracellular space (Chen et al. 2016). In addition, exosomes derived from AECs are capable of being internalized by myometrial and decidual cells and inducing the release of pro-inflammatory cytokines IL-6, IL-8, and PGE2, in greater amounts when AECs have previously been exposed to CS, by activating NFκB (Hadley et al. 2018). These results suggest a new paracrine mechanism of fetal-maternal communication in the presence of AEC-derived exosomes.

Finally as a new result, metabonomic screening of endothelial EVs from cigarette-smoking human subjects revealed prominent elevation of spermine, a polyamine metabolite

with potent agonist activity for the extracellular CaSR (calcium-sensing receptor). After injection in rats, these endothelial EVs containing spermine have been shown to accumulate in the pulmonary artery after smoking, to trigger pulmonary artery smooth muscle constriction and proliferation and to induce pulmonary hypertension via the Spermine/CaSR signaling pathway (Zhu, Xiao, et al. 2019; Figure 2).

6. EVs and asbestos

6.1. Epidemiology of asbestos

Asbestos has been largely exploited during the twentieth century mainly in the building and construction sector. Currently, about 125 million people worldwide are exposed to asbestos in their workplaces. According to global estimates, at least 107 000 people die each year from asbestos-induced diseases as a result of occupational exposure (Ospina et al. 2019). Thus, exposure to asbestos is still an important public health concern. Epidemiological studies have shown that exposure to asbestos fibers causes pleural abnormalities (effusions and plaques), pulmonary fibrosis (asbestosis), and cancerous diseases such as mesothelioma and cancer of the lungs, larynx, and ovaries (Churg et al. 2020; Levý et al. 2019; Munson, Lam, MacPherson, et al. 2018; Stayner et al. 2013). All types of asbestos have thus been designated as a human carcinogen, even if some scientists believe that the amphibole type is causing more mesothelioma than the serpentine type (chrysotile; IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 2012). It is essentially the intensity and duration of exposure that will determine the occurrence of asbestos-related diseases. The latency between the time a person begins to be exposed to asbestos and the time they develop a disease is quite long, up to several decades. This also explains why asbestos-related diseases continue to increase. The harmful effects of asbestos and all its symptoms on the human body are generally diagnosed at the terminal stage, only 15 years or more after exposure to this component. For example, for mesothelioma, the latency is between 30 and 40 years (Dodge and Beck 2016; Kwak et al. 2019; Munson, Lam, Dragon, et al. 2018; Wang, Schlagenhauf, et al. 2017).

6.2. Main toxicity mechanisms of asbestos

In the form of tiny fibers, asbestos is released into the air, penetrate deeper into respiratory system, where they exert deleterious effects. The toxicity of an asbestos fiber depends on the inhaled dose, the type and the size of the fiber, in particular its length, and its biopersistance, defined by its resistance to the chemical attacks that the body implements to destroy foreign bodies (Barlow et al. 2017). When inhaled, asbestos fibers tend to deposit in the lungs at the bifurcations of the bronchoalveolar canals; some will accumulate as far as the pulmonary alveoli. In addition, some fibers may migrate into the pleural space. The presence of asbestos fibers in the lungs leads to the release by AMs, lung cells, and pleural cells of factors (such as leukotrienes, prostaglandins) that induce multiple cellular processes such as apoptosis, cell and DNA damage, cell proliferation, inflammation, and macrophage recruitment (Liu et al. 2013).

Indeed, due to their surface load, asbestos fibers can adsorb cellular macromolecules (proteins, DNA, RNA) inducing conformational changes affecting their function. In addition, long asbestos fibers have been shown to physically interfere with the mitotic spindle and cause chromosomal damage, including deletions (Ospina et al. 2019).

It also appears that asbestos fibers in the lungs and other tissues cause the formation and release of ROS by macrophages; particularly when they fail to digest an asbestos fiber, they release their lysosomal content into the alveolar space. This "frustrated phagocytosis" can generate ROS such as hydrogen peroxide (H_2O_2), and the super anionic oxide radical (O_2^-). This important production of ROS induces the production of pro-inflammatory cytokines which play an important role in pulmonary fibrosis (Ospina et al. 2019).

6.3. Asbestos and EVs

The number of publications on the study of EVs produced in response to asbestos exposure remains limited (Table 1), but there is growing interest in the subject. Munson et al. investigated the role of EVs as a biomarker of asbestos exposure. Oropharyngeal aspiration (OA) was used to expose mice to harmful doses of asbestos. Serum was collected and isolation of exosomes followed by proteomic profiling was performed. All asbestos exposed mice-derived exosomes showed increased ceruloplasmin, a protein involved in iron metabolism deregulation following asbestos lung exposure, whereas 60% to 80% animals showed increased exosomal fibulin-1 and ficolin-1 that play an essential role in extracellular matrix remodeling and cell morphogenesis, respectively (Munson, Lam, MacPherson, et al. 2018). Another *in vitro* study highlighted that asbestos-exposed human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) and macrophages (THP-1) secrete 30–140 nm EVs with different proteomic signature. Increased abundance of vimentin, transitional ER ATPases, thrombospondin, and glypican-1 were detected in exosomes of exposed cells. Incubation of human mesothelial cells with exosomes from BEAS-2B and THP-1 cells exposed to asbestos lead to an alteration of gene expression pattern involved in epithelial-to-mesenchymal transition and cancer initiation including E-cadherin, desmoplakin, and IL-1 receptor (Munson, Lam, Dragon, et al. 2018).

Because changes in miRNA expression have been implicated in several diseases including malignant pleural mesothelioma (MPM), Cavalleri et al. explored the specific miRNA cargo signature of EV to differentiate between MPM patients and cancer-free subjects but chronically exposed to asbestos. Among 62 differentially expressed miRNA in MPM cases versus exposed subjects, 16 miRNA were validated by PCR. The data showed that 2 EV-associated miRNA, miR-103a-3p miR-30e-3p, are downregulated in MPM with more than twofold, and could be considered as noninvasive biomarkers for MPM detection (Cavalleri et al. 2017).

Further, another study aimed to investigate selected cargo proteins of exosomes derived from malignant mesothelioma

involved in angiogenesis, metastasis, cell migration, and immunoregulation. Several abundant markers were identified in these oncogenic exosomes, including 5 tubulin isotypes known to be involved in cell stress responses and cancer progression. Additionally galectin-3-binding protein (LG3BP/B4DVE1), mediator of integrin cell adhesion, was significantly up-regulated in MPM. Alpha-enolase (ENO1), annexin A1 (ANXA1), and glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (A8K8D9/G6PD) were also identified as mesothelioma-enriched exosome proteins. ENO1 plays a role in glycolysis, hypoxia and the innate immune response. ANXA1, highly identified in stressed-mesothelioma cells, was directly involved in immune response by triggering T-cell activation, regulation of differentiation and proliferation of activated T-cells, cell migration, and cell polarization. Moreover, high level of G6PG was observed in numerous cancers, and it is involved in apoptosis and angiogenesis (Greening et al. 2016).

7. Concluding remarks and future perspectives

It is now clearly established that EVs are an essential link between exposure to air pollutants and the development of cardiorespiratory diseases. However, the underlying mechanisms still need to be clarified.

Indeed, the particularity of the pollutants mentioned in this review, in particular PM and CS, is that they are made up of multiple compounds that may play a role in the biogenesis of EVs. It would therefore be interesting to study the effects of each of the compounds or families of compounds separately to identify more precisely the impact of pollutants on the genesis of EVs. For example, Benedikter et al. have shown that acrolein, a reactive-carbonyl constituent of CS, is involved in this mechanism through reaction with exofacial thiols (Benedikter et al. 2017). PAHs, present in both CS and PM, can trigger the release of EVs by different mechanisms, depending on their affinity for AhR (van Meteren et al. 2019). The oxidative potential of PM also seems to play a role in this release (Stassen et al. 2019). Similarly, due to the high number of chemical compounds contributing to air pollution, further studies are needed to clarify the "cocktail effect" of pollutants on EV release.

Another issue that should be further investigated is weather exposure to pollutants, especially PM, can lead to the encapsulation of all or part of it into EVs. This phenomenon could be used to deliver PM as a cargo to other cell types or may lead to interference with the functions of EVs or signaling pathways mediating EVs at different levels (Qu et al. 2019).

Finally, many of the studies cited in this review show a change in the profile of EVs produced in response to exposure to air pollutants and reflecting cellular, tissue (lungs, blood vessels), or systemic degradation occurring before the onset of an established disease. The study of their specific components and their effects on target cells will provide a better understanding of their role in the pulmonary, vascular, and even systemic environment, and therefore in certain pathophysiological mechanisms leading to the development of cardiovascular and pulmonary diseases due to the exposure to air pollutants. It therefore seems essential to further study these EVs in order to continue the investigation of biomarkers of exposure or even effects, which could lead to greater prevention of cardiorespiratory diseases related to air pollution.

Acknowledgments

The authors acknowledge the two anonymous reviewers for their time and dedication in reviewing the manuscript. Their comments, questions, and suggestions received from reviewers helped to shape and improve the final paper.

Declaration of interest

The authors report no conflict of interests. The author's affiliation is as shown on the cover page. The institutions with which the authors are affiliated are academic institutions, and the authors take sole responsibility for the writing and content of the manuscript. First author, S. Alkoussa benefited from PhD grant from the Pôle Métropolitain de la Côte d'Opale and the Université du Littoral Côte d'Opale. The research teams UCEIV and IMPECS are supported by the CPER research projects CLIMIBIO and IRENE. The authors thank the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, the Hauts-de-France Region, and the European Funds for Regional Development for their financial support. None of the authors have been involved in legal or regulatory matters related to the contents of the paper.

ORCID

Sébastien Hulo http://orcid.org/0000-0002-7817-9974
Dominique Courcot http://orcid.org/0000-0001-7985-6503
Sylvain Billet http://orcid.org/0000-0003-1363-4515
Perrine J. Martin http://orcid.org/0000-0003-4439-5078

References

Abels ER, Breakefield XO. 2016. Introduction to extracellular vesicles: biogenesis, RNA cargo selection, content, release, and uptake. Cell Mol Neurobiol. 36(3):301–312.

Abramowicz A, Widłak P, Pietrowska M. 2019. Different types of cellular stress affect the proteome composition of small extracellular vesicles: a mini review. Proteomes. 7(2):23.

Adam M, Schikowski T, Carsin AE, Cai Y, Jacquemin B, Sanchez M, Vierkötter A, Marcon A, Keidel D, Sugiri D, et al. 2015. Adult lung function and long-term air pollution exposure. ESCAPE: a multicentre cohort study and meta-analysis. Eur Respir J. 45(1):38–50.

Admyre C, Grunewald J, Thyberg J, Gripenbäck S, Tornling G, Eklund A, Scheynius A, Gabrielsson S. 2003. Exosomes with major histocompatibility complex class II and co-stimulatory molecules are present in human BAL fluid. Eur Respir J. 22(4):578–583.

André V, Billet S, Pottier D, Le Goff J, Pottier I, Garçon G, Shirali P, Sichel F. 2011. Mutagenicity and genotoxicity of PM2.5 issued from an urbano-industrialized area of Dunkerque (France). J Appl Toxicol. 31(2):131–138.

Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, Mitchell PS, Bennett CF, Pogosova-Agadjanyan EL, Stirewalt DL, et al. 2011. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. PNAS. 108(12):5003–5008.

Aztatzi-Aguilar O, Valdés-Arzate A, Debray-García Y, Calderón-Aranda E, Uribe-Ramirez M, Acosta-Saavedra L, Gonsebatt M, Maciel-Ruiz J, Petrosyan P, Mugica-Alvarez V, et al. 2018. Exposure to ambient particulate matter induces oxidative stress in lung and aorta in a size- and time-dependent manner in rats. Toxicol Res Appl. 2: 239784731879485.

Baek R, Varming K, Jørgensen MM. 2016. Does smoking, age or gender affect the protein phenotype of extracellular vesicles in plasma?. Transfus Apher Sci. 55(1):44–52.

Barbieri PG, Mirabelli D, Somigliana A, Cavone D, Merler E. 2012. Asbestos fibre burden in the lungs of patients with mesothelioma who lived near asbestos-cement factories. Ann Occup Hyg. 56: 660–670.

Barlow CA, Grespin M, Best EA. 2017. Asbestos fiber length and its relation to disease risk. Inhal Toxicol. 29(12–14):541–554.

Beelen R, Raaschou-Nielsen O, Stafoggia M, Andersen ZJ, Weinmayr G, Hoffmann B, Wolf K, Samoli E, Fischer P, Nieuwenhuijsen M, et al. 2014. Effects of long-term exposure to air pollution on natural-cause mortality: an analysis of 22 European cohorts within the multicentre ESCAPE project. Lancet. 383(9919):785–795.

Benedikter BJ, Bouwman FG, Heinzmann ACA, Vajen T, Mariman EC, Wouters EFM, Savelkoul PHM, Koenen RR, Rohde GGU, van Oerle R, et al. 2019. Proteomic analysis reveals procoagulant properties of cigarette smoke-induced extracellular vesicles. J Extracell Vesicles. 8(1): 1585163.

Benedikter BJ, Volgers C, van Eijck PH, Wouters EFM, Savelkoul PHM, Reynaert NL, Haenen GRMM, Rohde GGU, Weseler AR, Stassen FRM. 2017. Cigarette smoke extract induced exosome release is mediated by depletion of exofacial thiols and can be inhibited by thiol-antioxidants. Free Radical Biol Med. 108:334–344.

Benedikter BJ, Weseler AR, Wouters EFM, Savelkoul PHM, Rohde GGU, Stassen FRM. 2018. Redox-dependent thiol modifications: implications for the release of extracellular vesicles. Cell Mol Life Sci. 75(13): 2321–2337.

Benedikter BJ, Wouters EFM, Savelkoul PHM, Rohde GGU, Stassen FRM. 2018. Extracellular vesicles released in response to respiratory exposures: implications for chronic disease. J Toxicol Environ Health B Crit Rev. 21(3):142–160.

Billet S, Landkocz Y, Martin PJ, Verdin A, Ledoux F, Lepers C, André V, Cazier F, Sichel F, Shirali P, et al. 2018. Chemical characterization of fine and ultrafine PM, direct and indirect genotoxicity of PM and their organic extracts on pulmonary cells. J Environ Sci. 71:168–178.

Bollati V, Angelici L, Rizzo G, Pergoli L, Rota F, Hoxha M, Nordio F, Bonzini M, Tarantini L, Cantone L, et al. 2015. Microvesicle-associated microRNA expression is altered upon particulate matter exposure in healthy workers and in A549 cells: particulate matter exposure and microvesicles. J Appl Toxicol. 35(1):59–67.

Bollati V, Iodice S, Favero C, Angelici L, Albetti B, Cacace R, Cantone L, Carugno M, Cavalleri T, De Giorgio B, et al. 2014. Susceptibility to particle health effects, miRNA and exosomes: rationale and study protocol of the SPHERE study. BMC Public Health. 14(1):1137.

Bonzini M, Pergoli L, Cantone L, Hoxha M, Spinazzè A, Del Buono L, Favero C, Carugno M, Angelici L, Broggi L, et al. 2017. Short-term particulate matter exposure induces extracellular vesicle release in overweight subjects. Environ Res. 155:228–234.

Borgie M, Ledoux F, Verdin A, Cazier F, Greige H, Shirali P, Courcot D, Dagher Z. 2015. Genotoxic and epigenotoxic effects of fine particulate matter from rural and urban sites in Lebanon on human bronchial epithelial cells. Environ Res. 136:352–362.

Boukhenouna S, Wilson MA, Bahmed K, Kosmider B. 2018. Reactive oxygen species in chronic obstructive pulmonary disease. Oxid Med Cell Longev. 2018:1–9.

Bourdrel T, Bind M-A, Béjot Y, Morel O, Argacha J-F. 2017. Cardiovascular effects of air pollution. Arch Cardiovasc Dis. 110(11):634–642.

Brook RD, Rajagopalan S, Pope CA, Brook JR, Bhatnagar A, Diez-Roux AV, Holguin F, Hong Y, Luepker RV, Mittleman MA, et al. 2010. Particulate matter air pollution and cardiovascular disease: an update to the scientific statement from the American Heart Association. Circulation. 121(21):2331–2378.

Buiarelli F, Sonego E, Uccelletti D, Bruni E, Di Filippo P, Pomata D, Riccardi C, Perrino C, Marcovecchio F, Simonetti G. 2019. Determination of the main bioaerosol components using chemical markers by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Microchem J. 149:103974.

Burbank AJ, Sood AK, Kesic MJ, Peden DB, Hernandez ML. 2017. Environmental determinants of allergy and asthma in early life. J Allergy Clin Immunol. 140(1):1–12.

Carnino JM, Lee H, Jin Y. 2019. Isolation and characterization of extracellular vesicles from Broncho-alveolar lavage fluid: a review and comparison of different methods. Respir Res. 20(1):240.

Cavalleri T, Angelici L, Favero C, Dioni L, Mensi C, Bareggi C, Palleschi A, Rimessi A, Consonni D, Bordini L, et al. 2017. Plasmatic extracellular vesicle microRNAs in malignant pleural mesothelioma and asbestos-exposed subjects suggest a 2-miRNA signature as potential biomarker of disease. PLoS One. 12(5):e0176680.

Cesaroni G, Forastiere F, Stafoggia M, Andersen ZJ, Badaloni C, Beelen R, Caracciolo B, de Faire U, Erbel R, Eriksen KT, et al. 2014. Long term exposure to ambient air pollution and incidence of acute coronary events: prospective cohort study and meta-analysis in 11 European cohorts from the ESCAPE Project. BMJ. 348:f7412.

Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, Li Y, Wang X, Zhao L. 2018. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. Oncotarget. 9(6):7204–7218.

Chen H, Goldberg MS, Villeneuve PJ. 2008. A systematic review of the relation between long-term exposure to ambient air pollution and chronic diseases. Rev Environ Health. 23(4):243–297.

Chen R, Li H, Cai J, Wang C, Lin Z, Liu C, Niu Y, Zhao Z, Li W, Kan H. 2018. Fine particulate air pollution and the expression of microRNAs and circulating cytokines relevant to inflammation, coagulation, and vasoconstriction. Environ Health Perspect. 126(1):017007.

Chen FW, Li C, Ioannou YA. 2010. Cyclodextrin induces calcium-dependent lysosomal exocytosis. PLoS One. 5(11):e15054.

Chen Y, Li G, Liu Y, Werth VP, Williams KJ, Liu M-L. 2016. Translocation of endogenous danger signal HMGB1 from nucleus to membrane microvesicles in macrophages. J Cell Physiol. 231(11):2319–2326.

Chirshev E, Oberg KC, Ioffe YJ, Unternaehrer JJ. 2019. Let-7 as biomarker, prognostic indicator, and therapy for precision medicine in cancer. Clin Transl Med. 8(1):24.

Choi D-S, Kim D-K, Kim Y-K, Gho YS. 2013. Proteomics, transcriptomics and lipidomics of exosomes and ectosomes. Proteomics. 13(10–11): 1554–1571.

Churg A, Galateau-Salle F, Roden AC, Attanoos R, von der Thusen JH, Tsao M-S, Chang N, De Perrot M, Dacic S. 2020. Malignant mesothelioma in situ: morphologic features and clinical outcome. Mod Pathol. 33(2):297–302.

Cordazzo C, Petrini S, Neri T, Lombardi S, Carmazzi Y, Pedrinelli R, Paggiaro P, Celi A. 2014. Rapid shedding of proinflammatory microparticles by human mononuclear cells exposed to cigarette smoke is dependent on Ca2+ mobilization. Inflamm Res. 63(7):539–547.

Counts ME, Morton MJ, Laffoon SW, Cox RH, Lipowicz PJ. 2005. Smoke composition and predicting relationships for international commercial cigarettes smoked with three machine-smoking conditions. Regul Toxicol Pharmacol. 41(3):185–227.

Cui A, Xiang M, Xu M, Lu P, Wang S, Zou Y, Qiao K, Jin C, Li Y, Lu M, et al. 2019. VCAM-1-mediated neutrophil infiltration exacerbates ambient fine particle-induced lung injury. Toxicol Lett. 302:60–74.

Dauchet L, Hulo S, Cherot-Kornobis N, Matran R, Amouyel P, Edmé J-L, Giovannelli J. 2018. Short-term exposure to air pollution: associations with lung function and inflammatory markers in non-smoking, healthy adults. Environ Int. 121:610–619.

de Gassart A, Géminard C, Février B, Raposo Ga, Vidal Michel, 2003. Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. Blood. 102(13):4336–4344.

Deng X, Zhang F, Rui W, Long F, Wang L, Feng Z, Chen D, Ding W. 2013. PM2.5-induced oxidative stress triggers autophagy in human lung epithelial A549 cells. Toxicol In Vitro. 27(6):1762–1770.

Dergham M, Billet S, Verdin A, Courcot D, Cazier F, Shirali P, Garçon G. 2011. Toxicological impact of air pollution particulate matter (PM2.5) collected under urban, industrial or rural influence: occurrence of oxidative stress and inflammatory reaction in BEAS-2B human bronchial epithelial cells (corrected version). AMR. 324:489–492.

Dergham M, Lepers C, Verdin A, Billet S, Cazier F, Courcot D, Shirali P, Garçon G. 2012. Prooxidant and proinflammatory potency of air pollution particulate matter (PM2.5–0.3) produced in rural, urban, or

industrial surroundings in human bronchial epithelial cells (BEAS-2B). Chem Res Toxicol. 25(4):904–919.
Dergham M, Lepers C, Verdin A, Cazier F, Billet S, Courcot D, Shirali P, Garçon G. 2015. Temporal–spatial variations of the physicochemical characteristics of air pollution particulate matter (PM2.5–0.3) and toxicological effects in human bronchial epithelial cells (BEAS-2B). Environ Res. 137:256–267.
DeVries R, Kriebel D, Sama S. 2017. Outdoor air pollution and COPD-related emergency department visits, hospital admissions, and mortality: a meta-analysis. COPD. 14(1):113–121.
DiGiacomo SI, Jazayeri M-A, Barua RS, Ambrose JA. 2018. Environmental tobacco smoke and cardiovascular disease. IJERPH. 16(1):96.
Dockery DW, Pope CA, Xu X, Spengler JD, Ware JH, Fay ME, Ferris BG, Speizer FE. 1993. An association between air pollution and mortality in six U. N Engl J Med. 329(24):1753–1759.
Dodge DG, Beck BD. 2016. Historical state of knowledge of the health risks of asbestos posed to seamen on merchant ships. Inhal Toxicol. 28(14):637–657.
Domagala-Kulawik J. 2020. The relevance of bronchoalveolar lavage fluid analysis for lung cancer patients. Expert Rev Respir Med. 14(3): 329–337. DOI:10.1080/17476348.2020.1708720
Doyle LM, Wang MZ. 2019. Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis. Cells. 8(7):727.
Eken C, Martin PJ, Sadallah S, Treves S, Schaller M, Schifferli JA. 2010. Ectosomes released by polymorphonuclear neutrophils induce a MerTK-dependent anti-inflammatory pathway in macrophages. J Biol Chem. 285(51):39914–39921.
El Morabet R. 2018. Effects of outdoor air pollution on human health. In: Reference module in earth systems and environmental sciences. Elsevier. DOI:10.1016/B978-0-12-409548-9.11012-7
Emmerechts J, Jacobs L, Van Kerckhoven S, Loyen S, Mathieu C, Fierens F, Nemery B, Nawrot TS, Hoylaerts MF. 2012. Air pollution-associated procoagulant changes: the role of circulating microvesicles. J Thromb Haemost. 10(1):96–106.
Enjeti AK, Ariyarajah A, D'Crus A, Seldon M, Lincz LF. 2017. Circulating microvesicle number, function and small RNA content vary with age, gender, smoking status, lipid and hormone profiles. Thromb Res. 156: 65–72.
Feller D, Kun J, Ruzsics I, Rapp J, Sarosi V, Kvell K, Helyes Z, Pongracz JE. 2018. Cigarette smoke-induced pulmonary inflammation becomes systemic by circulating extracellular vesicles containing Wnt5a and inflammatory cytokines. Front Immunol. 9:1724.
Ferrante D, Bertolotti M, Todesco A, Mirabelli D, Terracini B, Magnani C. 2007. Cancer mortality and incidence of mesothelioma in a cohort of wives of asbestos workers in Casale Monferrato. Environ Health Perspect. 115(10):1401–1405.
Folkesson M, Li C, Frebelius S, Swedenborg J, Wågsäter D, Williams KJ, Eriksson P, Roy J, Liu M-L. 2015. Proteolytically active ADAM10 and ADAM17 carried on membrane microvesicles in human abdominal aortic aneurysms. Thromb Haemost. 114(12):1165–1174.
Fossati S, Baccarelli A, Zanobetti A, Hoxha M, Vokonas PS, Wright RO, Schwartz J. 2014. Ambient particulate air pollution and microRNAs in elderly men. Epidemiology. 25(1):68–78.
Francisco-Garcia AS, Garrido-Martín EM, Rupani H, Lau LCK, Martinez-Nunez RT, Howarth PH, Sanchez-Elsner T. 2019. Small RNA Species and microRNA profiles are altered in severe asthma nanovesicles from broncho alveolar lavage and associate with impaired lung function and inflammation. Noncoding RNA. 5(4):51. DOI:10.3390/ncrna5040051
Fujita Y, Araya J, Ito S, Kobayashi K, Kosaka N, Yoshioka Y, Kadota T, Hara H, Kuwano K, Ochiya T. 2015. Suppression of autophagy by extracellular vesicles promotes myofibroblast differentiation in COPD pathogenesis. J Extracell Vesicles. 4(1):28388.
Fujita Y, Kadota T, Araya J, Ochiya T, Kuwano K. 2018. Extracellular vesicles: new players in lung immunity. Am J Respir Cell Mol Biol. 58(5):560–565.
Fujita Y, Kosaka N, Araya J, Kuwano K, Ochiya T. 2015. Extracellular vesicles in lung microenvironment and pathogenesis. Trends Mol Med. 21(9):533–542.
Gandolfi I, Bertolini V, Ambrosini R, Bestetti G, Franzetti A. 2013. Unravelling the bacterial diversity in the atmosphere. Appl Microbiol Biotechnol. 97(11):4727–4736.
Gao W, Xu J, Liu L, Shen H, Zeng H, Shu Y. 2012. A systematic-analysis of predicted miR-21 targets identifies a signature for lung cancer. Biomed Pharmacother. 66(1):21–28.
Gao J, Xu X, Ying Z, Jiang L, Zhong M, Wang A, Chen L-C, Lu B, Sun Q. 2017. Post-effect of air quality improvement on biomarkers for systemic inflammation and microparticles in asthma patients after the 2008 Beijing Olympic Games: a pilot study. Inflammation. 40(4): 1214–1224.
Garshick E. 2014. Effects of short- and long-term exposures to ambient air pollution on COPD. Eur Respir J. 44(3):558–561.
Genschmer KR, Russell DW, Lal C, Szul T, Bratcher PE, Noerager BD, Abdul Roda M, Xu X, Rezonzew G, Viera L, et al. 2019. Activated PMN exosomes: pathogenic entities causing matrix destruction and disease in the lung. Cell. 176(1–2):113–126.e15.
Giannadaki D, Lelieveld J, Pozzer A. 2016. Implementing the US air quality standard for PM2.5 worldwide can prevent millions of premature deaths per year. Environ Health. 15(1):88.
Gibbs K, Collaco JM, McGrath-Morrow SA. 2016. Impact of tobacco smoke and nicotine exposure on lung development. Chest. 149(2):552–561.
Gordon C, Gudi K, Krause A, Sackrowitz R, Harvey B-G, Strulovici-Barel Y, Mezey JG, Crystal RG. 2011. Circulating endothelial microparticles as a measure of early lung destruction in cigarette smokers. Am J Respir Crit Care Med. 184(2):224–232.
Goto Y, Hogg JC, Shih C-H, Ishii H, Vincent R, van Eeden SF. 2004. Exposure to ambient particles accelerates monocyte release from bone marrow in atherosclerotic rabbits. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 287(1):L79–L85.
Goto Y, Ishii H, Hogg JC, Shih C-H, Yatera K, Vincent R, van Eeden SF. 2004. Particulate matter air pollution stimulates monocyte release from the bone marrow. Am J Respir Crit Care Med. 170(8):891–897.
Gould SJ, Raposo G. 2013. As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. J Extracell Vesicles. 2(1):20389.
Greening DW, Ji H, Chen M, Robinson BWS, Dick IM, Creaney J, Simpson RJ. 2016. Secreted primary human malignant mesothelioma exosome signature reflects oncogenic cargo. Sci Rep. 6(1):32643.
Gu X, Chu X, Zeng X-L, Bao H-R, Liu X-J. 2017. Effects of PM2.5 exposure on the Notch signaling pathway and immune imbalance in chronic obstructive pulmonary disease. Environ Pollut. 226:163–173.
Gualtieri M, Ledoux F, Verdin A, Billet S, Martin PJ, Courcot D. 2017. Particulate matter physico-chemical characterization and in vitro toxicological effects. In: Prashant Kumar, editor. Airborne particles: origin, emissions and health impacts. Chapter 12. Guildford: Nova Science Publishers.
Guarnieri M, Balmes JR. 2014. Outdoor air pollution and asthma. Lancet. 383(9928):1581–1592.
Guillot L, Nathan N, Tabary O, Thouvenin G, Le Rouzic P, Corvol H, Amselem S, Clement A. 2013. Alveolar epithelial cells: master regulators of lung homeostasis. Int J Biochem Cell Biol. 45(11):2568–2573.
Gupta R, Radicioni G, Abdelwahab S, Dang H, Carpenter J, Chua M, Mieczkowski PA, Sheridan JT, Randell SH, Kesimer M. 2019. Intercellular communication between airway epithelial cells is mediated by exosome-like vesicles. Am J Respir Cell Mol Biol. 60(2): 209–220.
Hadley EE, Sheller-Miller S, Saade G, Salomon C, Mesiano S, Taylor RN, Taylor BD, Menon R. 2018. Amnion epithelial cell derived exosomes induce inflammatory changes in uterine cells. Am J Obstet Gynecol. 219(5):478.e1–478.e21.
Haggadone MD, Peters-Golden M. 2018. Microenvironmental influences on extracellular vesicle-mediated communication in the lung. Trends Mol Med. 24(11):963–975.
Hamra GB, Guha N, Cohen A, Laden F, Raaschou-Nielsen O, Samet JM, Vineis P, Forastiere F, Saldiva P, Yorifuji T, et al. 2014. Outdoor particulate matter exposure and lung cancer: a systematic review and meta-analysis. Environ Health Perspect. 122(9):906–911.
Harrison RM, Yin J. 2000. Particulate matter in the atmosphere: which particle properties are important for its effects on health? Sci Total Environ. 249(1–3):85–101.

Hauser P, Wang S, Didenko VV. 2017. Apoptotic bodies: selective detection in extracellular vesicles. Methods Mol Biol. 1554:193–200.

Havet A, Li Z, Zerimech F, Sanchez M, Siroux V, Le Moual N, Brunekreef B, Künzli N, Jacquemin B, Varraso R, et al. 2019. Does the oxidative stress play a role in the associations between outdoor air pollution and persistent asthma in adults? Findings from the EGEA study. Environ Health. 18(1):90.

He S, Chen D, Hu M, Zhang L, Liu C, Traini D, Grau GE, Zeng Z, Lu J, Zhou G, et al. 2019. Bronchial epithelial cell extracellular vesicles ameliorate epithelial-mesenchymal transition in COPD pathogenesis by alleviating M2 macrophage polarization. Nanomedicine. 18: 259–271.

Hecht SS. 2003. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. Nat Rev Cancer. 3(10):733–744.

Héliot A, Landkocz Y, Roy Saint-Georges F, Gosset P, Billet S, Shirali P, Courcot D, Martin PJ. 2017. Smoker extracellular vesicles influence status of human bronchial epithelial cells. Int J Hyg Environ Health. 220(2):445–454.

Hirsch FR, Scagliotti GV, Mulshine JL, Kwon R, Curran WJ, Wu Y-L, Paz-Ares L. 2017. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. Lancet. 389(10066):299–311.

Hoek G, Krishnan RM, Beelen R, Peters A, Ostro B, Brunekreef B, Kaufman JD. 2013. Long-term air pollution exposure and cardio- respiratory mortality: a review. Environ Health. 12(1):43.

Hoffman SJ, Tan C. 2015. Overview of systematic reviews on the health-related effects of government tobacco control policies. BMC Public Health. 15(1):744.

Hong C-W. 2018. Extracellular vesicles of neutrophils. Immune Netw. 18(6):e43.

Horinouchi T, Higashi T, Mazaki Y, Miwa S. 2016. Carbonyl compounds in the gas phase of cigarette mainstream smoke and their pharmacological properties. Biol Pharm Bull. 39(6):909–914.

Hough KP, Wilson LS, Trevor JL, Strenkowski JG, Maina N, Kim Y-I, Spell ML, Wang Y, Chanda D, Dager JR, et al. 2018. Unique lipid signatures of extracellular vesicles from the airways of asthmatics. Sci Rep. 8(1): 10340.

Husain MJ, English LM, Ramanandraibe N. 2016. An overview of tobacco control and prevention policy status in Africa. Prev Med. 91:S16–S22.

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 2012. Arsenic, metals, fibres, and dusts. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 100:11–465.

Isik B, Ceylan A, Isik R. 2007. Oxidative stress in smokers and non-smokers. Inhalation Toxicol. 19(9):767–769.

Jacquemin B, Siroux V, Sanchez M, Carsin A-E, Schikowski T, Adam M, Bellisario V, Buschka A, Bono R, Brunekreef B, et al. 2015. Ambient air pollution and adult asthma incidence in six European cohorts (ESCAPE). Environ Health Perspect. 123(6):613–621.

Jasper AE, McIver WJ, Sapey E, Walton GM. 2019. Understanding the role of neutrophils in chronic inflammatory airway disease. F1000Res. 8: 557.

Jin X, Xue B, Zhou Q, Su R, Li Z. 2018. Mitochondrial damage mediated by ROS incurs bronchial epithelial cell apoptosis upon ambient PM2.5 exposure. J Toxicol Sci. 43(2):101–111.

Jørgensen M, Baek R, Pedersen S, Søndergaard EKL, Kristensen SR, Varming K. 2013. Extracellular Vesicle (EV) Array: microarray capturing of exosomes and other extracellular vesicles for multiplexed phenotyping. J Extracell Vesicles. 2(1):20920.

Joshi N, Walter JM, Misharin AV. 2018. Alveolar macrophages. Cell Immunol. 330:86–90.

Kadota T, Yoshioka Y, Fujita Y, Kuwano K, Ochiya T. 2017. Extracellular vesicles in lung cancer—from bench to bedside. Semin Cell Dev Biol. 67:39–47.

Kalra H, Simpson RJ, Ji H, Aikawa E, Altevogt P, Askenase P, Bond VC, Borràs FE, Breakefield X, Budnik V, et al. 2012. Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. PLoS Biol. 10(12):e1001450.

Kamceva G, Arsova-Sarafinovska Z, Ruskovska T, Zdravkovska M, Kamceva-Panova L, Stikova E. 2016. Cigarette smoking and oxidative stress in patients with coronary artery disease. Open Access Maced J Med Sci. 4(4):636.

Katanoda K, Sobue T, Satoh H, Tajima K, Suzuki T, Nakatsuka H, Takezaki T, Nakayama T, Nitta H, Tanabe K, et al. 2011. An association between long-term exposure to ambient air pollution and mortality from lung cancer and respiratory diseases in Japan. J Epidemiol. 21(2):132–143.

Keerthikumar S, Chisanga D, Ariyaratne D, Al Saffar H, Anand S, Zhao K, Samuel M, Pathan M, Jois M, Chilamkurti N, et al. 2016. ExoCarta: a web-based compendium of exosomal cargo. J Mol Biol. 428(4): 688–692.

Kelly FJ, Fussell JC. 2012. Size, source and chemical composition as determinants of toxicity attributable to ambient particulate matter. Atmos Environ. 60:504–526.

Khreis H, Kelly C, Tate J, Parslow R, Lucas K, Nieuwenhuijsen M. 2017. Exposure to traffic-related air pollution and risk of development of childhood asthma: a systematic review and meta-analysis. Environ Int. 100:1–31.

Kim JE, Eom JS, Kim W-Y, Jo EJ, Mok J, Lee K, Kim KU, Park H-K, Lee MK, Kim M-H. 2018. Diagnostic value of microRNAs derived from exosomes in bronchoalveolar lavage fluid of early-stage lung adenocarcinoma: a pilot study. Thorac Cancer. 9(8):911–915.

Kim D-K, Kang B, Kim OY, Choi D-S, Lee J, Kim SR, Go G, Yoon YJ, Kim JH, Jang SC, et al. 2013. EVpedia: an integrated database of high-throughput data for systemic analyses of extracellular vesicles. J Extracell Vesicles. 2(1):20384.

Kleinstreuer C, Feng Y. 2013. Lung deposition analyses of inhaled toxic aerosols in conventional and less harmful cigarette smoke: a review. IJERPH. 10(9):4454–4485.

Kouassi KS, Billet S, Garçon G, Verdin A, Diouf A, Cazier F, Djaman J, Courcot D, Shirali P. 2010. Oxidative damage induced in A549 cells by physically and chemically characterized air particulate matter (PM2.5) collected in Abidjan, Côte d'Ivoire. J Appl Toxicol. 30:310–320.

Kowal J, Arras G, Colombo M, Jouve M, Morath JP, Primdal-Bengtson B, Dingli F, Loew D, Tkach M, Théry C. 2016. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. Proc Natl Acad Sci USA. 113(8): E968–E977.

Kubo H. 2018. Extracellular vesicles in lung disease. Chest. 153(1): 210–216.

Kumarswamy R, Volkmann I, Thum T. 2011. Regulation and function of miRNA-21 in health and disease. RNA Biol. 8(5):706–713.

Kwak K, Paek D, Zoh KE. 2019. Exposure to asbestos and the risk of colorectal cancer mortality: a systematic review and meta-analysis. Occup Environ Med. 76(11):861–871.

Lakhdar R, Denden S, Kassab A, Leban N, Knani J, Lefranc G, Miled A, Chibani JB, Khelil AH. 2011. Update in chronic obstructive pulmonary disease: role of antioxidant and metabolizing gene polymorphisms. Exp Lung Res. 37(6):364–375.

Langrish JP, Mills NL. 2014. Air pollution and mortality in Europe. Lancet. 383(9919):758–760.

Lanyu Z, Feilong H. 2019. Emerging role of extracellular vesicles in lung injury and inflammation. Biomed Pharmacother. 113:108748.

Lässer C, O'Neil SE, Ekerljung L, Ekström K, Sjöstrand M, Lötvall J. 2011. RNA-containing exosomes in human nasal secretions. Am J Rhinol Allergy. 25(2):89–93.

Lawson C, Vicencio JM, Yellon DM, Davidson SM. 2016. Microvesicles and exosomes: new players in metabolic and cardiovascular disease. J Endocrinol. 228(2):R57–R71.

Lazarus A, Massoumi A, Hostler J, Hostler DC. 2012. Asbestos-related pleuropulmonary diseases: benign and malignant. Postgrad Med. 124(3):116–130.

Lee H, Abston E, Zhang D, Rai A, Jin Y. 2018. Extracellular vesicle: an emerging mediator of intercellular crosstalk in lung inflammation and injury. Front Immunol 9:924.

Lelieveld J, Evans JS, Fnais M, Giannadaki D, Pozzer A. 2015. The contribution of outdoor air pollution sources to premature mortality on a global scale. Nature. 525(7569):367–371.

Lepers C, André V, Dergham M, Billet S, Verdin A, Garçon G, Dewaele D, Cazier F, Sichel F, Shirali P. 2014. Xenobiotic metabolism induction and bulky DNA adducts generated by particulate matter pollution in BEAS-2B cell line: geographical and seasonal influence. J Appl Toxicol. 34(6):703–713.

Lepers C, Dergham M, Armand L, Billet S, Verdin A, Andre V, Pottier D, Courcot D, Shirali P, Sichel F. 2014. Mutagenicity and clastogenicity of native airborne particulate matter samples collected under industrial, urban or rural influence. Toxicol In Vitro. 28(5):866–874.

Letsiou E, Bauer N. 2018. Endothelial extracellular vesicles in pulmonary function and disease. Curr Top Membr. 82:197–256.

Levänen B, Bhakta NR, Torregrosa Paredes P, Barbeau R, Hiltbrunner S, Pollack JL, Sköld CM, Svartengren M, Grunewald J, Gabrielsson S, et al. 2013. Altered microRNA profiles in bronchoalveolar lavage fluid exosomes in asthmatic patients. J Allergy Clin Immunol. 131(3):894–903.

Levitz JS, Bradley TP, Golden AL. 2004. Overview of smoking and all cancers. Med Clin North Am. 88(6):1655–1675.

Levý M, Boublíková L, Büchler T, Šimša J. 2019. Treatment of malignant peritoneal mesothelioma. Klin Onkol. 32(5):333–337.

Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. Cell. 120(1):15–20.

Li W, Dorans KS, Wilker EH, Rice MB, Ljungman PL, Schwartz JD, Coull BA, Koutrakis P, Gold DR, Keaney JF, et al. 2019. Short-term exposure to ambient air pollution and circulating biomarkers of endothelial cell activation: the Framingham heart study. Environ Res. 171:36–43.

Li C-J, Liu Y, Chen Y, Yu D, Williams KJ, Liu M-L. 2013. Novel proteolytic microvesicles released from human macrophages after exposure to tobacco smoke. Am J Pathol. 182(5):1552–1562.

Li J, Sun S, Tang R, Qiu H, Huang Q, Mason TG, Tian L. 2016. Major air pollutants and risk of COPD exacerbations: a systematic review and meta-analysis. COPD. 11:3079–3091.

Liu G, Cheresh P, Kamp DW. 2013. Molecular basis of asbestos-induced lung disease. Annu Rev Pathol Mech Dis. 8(1):161–187.

Liu Y, Luo F, Wang B, Li H, Xu Y, Liu X, Shi L, Lu X, Xu W, Lu L, et al. 2016. STAT3-regulated exosomal miR-21 promotes angiogenesis and is involved in neoplastic processes of transformed human bronchial epithelial cells. Cancer Lett. 370(1):125–135.

Li Y, Duan J, Yang M, Li Y, Jing L, Yu Y, Wang J, Sun Z. 2017. Transcriptomic analyses of human bronchial epithelial cells BEAS-2B exposed to atmospheric fine particulate matter PM2.5. Toxicol In Vitro. 42:171–181.

Li M, Yu D, Williams KJ, Liu M-L. 2010. Tobacco smoke induces the generation of procoagulant microvesicles from human monocytes/macrophages. ATVB. 30(9):1818–1824.

Llorente A, van Deurs B, Sandvig K. 2007. Cholesterol regulates prostasome release from secretory lysosomes in PC-3 human prostate cancer cells. Eur J Cell Biol. 86(7):405–415.

Loomis D, Grosse Y, Lauby-Secretan B, Ghissassi FE, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Baan R, Mattock H, Straif K. 2013. The carcinogenicity of outdoor air pollution. Lancet Oncol. 14(13):1262–1263.

Maas SLN, Breakefield XO, Weaver AM. 2017. Extracellular vesicles: unique intercellular delivery vehicles. Trends Cell Biol. 27(3):172–188.

Magnani C, Fubini B, Mirabelli D, Bertazzi PA, Bianchi C, Chellini E, Gennaro V, Marinaccio A, Menegozzo M, Merler E, et al. 2013. Pleural mesothelioma: epidemiological and public health issues. Report from the second Italian consensus conference on pleural mesothelioma. Med Lav. 104(3):191–202.

Mainali P, Pant S, Rodriguez AP, Deshmukh A, Mehta JL. 2015. Tobacco and cardiovascular health. Cardiovasc Toxicol. 15(2):107–116.

Malhotra J, Malvezzi M, Negri E, La Vecchia C, Boffetta P. 2016. Risk factors for lung cancer worldwide. Eur Respir J. 48(3):889–902.

Manigrasso M, Protano C, Vitali M, Avino P. 2019. Where do ultrafine particles and nano-sized particles come from?. JAD. 68(4):1371–1390.

Manzano-León N, Serrano-Lomelin J, Sánchez BN, Quintana-Belmares R, Vega E, Vázquez-López I, Rojas-Bracho L, López-Villegas MT, Vadillo-Ortega F, De Vizcaya-Ruiz A, et al. 2016. TNFα and IL-6 responses to particulate matter in vitro: variation according to PM size, season, and polycyclic aromatic hydrocarbon and soil content. Environ Health Perspect. 124(4):406–412.

Marcilla A, Martínez I, Berenguer D, Gómez-Siurana A, Beltrán MI. 2012. Comparative study of the main characteristics and composition of the mainstream smoke of ten cigarette brands sold in Spain. Food Chem Toxicol. 50(5):1317–1333.

Martin PJ, Héliot A, Trémolet G, Landkocz Y, Dewaele D, Cazier F, Ledoux F, Courcot D. 2019. Cellular response and extracellular vesicles characterization of human macrophages exposed to fine atmospheric particulate matter. Environ Pollut. 254:112933.

McVey MJ, Spring CM, Semple JW, Maishan M, Kuebler WM. 2016. Microparticles as biomarkers of lung disease: enumeration in biological fluids using lipid bilayer microspheres. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 310(9):L802–L814.

Mensi C, Riboldi L, De Matteis S, Bertazzi PA, Consonni D. 2015. Impact of an asbestos cement factory on mesothelioma incidence: global assessment of effects of occupational, familial, and environmental exposure. Environ Int. 74:191–199.

Mobarrez F, Antoniewicz L, Bosson JA, Kuhl J, Pisetsky DS, Lundbäck M. 2014. The effects of smoking on levels of endothelial progenitor cells and microparticles in the blood of healthy volunteers. PLoS One. 9(2):e90314.

Moon H-G, Kim S-H, Gao J, Quan T, Qin Z, Osorio JC, Rosas IO, Wu M, Tesfaigzi Y, Jin Y. 2014. CCN1 secretion and cleavage regulate the lung epithelial cell functions after cigarette smoke. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 307(4):L326–L337.

Morrison TJ, Jackson MV, Cunningham EK, Kissenpfennig A, McAuley DF, O'Kane CM, Krasnodembskaya AD. 2017. Mesenchymal stromal cells modulate macrophages in clinically relevant lung injury models by extracellular vesicle mitochondrial transfer. Am J Respir Crit Care Med. 196(10):1275–1286.

Mulcahy LA, Pink RC, Carter DRF. 2014. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. J Extracell Vesicles. 3(1):24641.

Munson P, Lam Y-W, Dragon J, MacPherson M, Shukla A. 2018. Exosomes from asbestos-exposed cells modulate gene expression in mesothelial cells. FASEB J. 32(8):4328–4342.

Munson P, Lam Y-W, MacPherson M, Beuschel S, Shukla A. 2018. Mouse serum exosomal proteomic signature in response to asbestos exposure. J Cell Biochem. 119(7):6266–6273.

Musti M, Pollice A, Cavone D, Dragonieri S, Bilancia M. 2009. The relationship between malignant mesothelioma and an asbestos cement plant environmental risk: a spatial case–control study in the city of Bari (Italy). Int Arch Occup Environ Health. 82(4):489–497.

Nagano T, Katsurada M, Dokuni R, Hazama D, Kiriu T, Umezawa K, Kobayashi K, Nishimura Y. 2019. Crucial role of extracellular vesicles in bronchial asthma. Int J Mol Sci 20. DOI:10.3390/ijms20102589

Nair VS, Maeda LS, Ioannidis JPA. 2012. Clinical outcome prediction by microRNAs in human cancer: a systematic review. J Natl Cancer Inst. 104(7):528–540.

Nandi S, Ma L, Denis M, Karwatsky J, Li Z, Jiang X-C, Zha X. 2009. ABCA1-mediated cholesterol efflux generates microparticles in addition to HDL through processes governed by membrane rigidity. J Lipid Res. 50(3):456–466.

Neri T, Pergoli L, Petrini S, Gravendonk L, Balia C, Scalise V, Amoruso A, Pedrinelli R, Paggiaro P, Bollati V, et al. 2016. Particulate matter induces prothrombotic microparticle shedding by human mononuclear and endothelial cells. Toxicol In Vitro. 32:333–338.

Nielsen GD, Larsen ST, Wolkoff P. 2017. Re-evaluation of the WHO (2010) formaldehyde indoor air quality guideline for cancer risk assessment. Arch Toxicol. 91(1):35–61.

O'Farrell HE, Yang IA. 2019. Extracellular vesicles in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). J Thorac Dis. 11(S17):S2141–S2154.

Oh SM, Kim HR, Park YJ, Lee SY, Chung KH. 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). Mutat Res. 723(2):142–151.

Omland O, Würtz ET, Aasen TB, Blanc P, Brisman JB, Miller MR, Pedersen OF, Schlünssen V, Sigsgaard T, Ulrik CS, et al. 2014. Occupational chronic obstructive pulmonary disease: a systematic literature review. Scand J Work Environ Health. 40(1):19–35.

Orellano P, Quaranta N, Reynoso J, Balbi B, Vasquez J. 2017. Effect of outdoor air pollution on asthma exacerbations in children and adults: systematic review and multilevel meta-analysis. PLoS One. 12(3):e0174050.

Orozco AF, Lewis DE. 2010. Flow cytometric analysis of circulating microparticles in plasma. Cytometry. 77A(6):502–514.

Ospina D, Villegas VE, Rodríguez-Leguizamón G, Rondón-Lagos M. 2019. Analyzing biological and molecular characteristics and genomic damage induced by exposure to asbestos. CMAR. 11:4997–5012.

Ostro B, Malig B, Broadwin R, Basu R, Gold EB, Bromberger JT, Derby C, Feinstein S, Greendale GA, Jackson EA, et al. 2014. Chronic PM2.5 exposure and inflammation: determining sensitive subgroups in midlife women. Environ Res. 132:168–175.

Pang X, Lewis AC. 2011. Carbonyl compounds in gas and particle phases of mainstream cigarette smoke. Sci Total Environ. 409(23):5000–5009.

Papi A, Brightling C, Pedersen SE, Reddel HK. 2018. Asthma. Lancet. 391(10122):783–800.

Parolini I, Federici C, Raggi C, Lugini L, Palleschi S, De Milito A, Coscia C, Iessi E, Logozzi M, Molinari A, et al. 2009. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. J Biol Chem. 284(49): 34211–34222.

Parris BA, O'Farrell HE, Fong KM, Yang IA. 2019. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and lung cancer: common pathways for pathogenesis. J Thorac Dis. 11(S17):S2155–S2172.

Pascal M, de Crouy Chanel P, Wagner V, Corso M, Tillier C, Bentayeb M, Blanchard M, Cochet A, Pascal L, Host S, et al. 2016. The mortality impacts of fine particles in France. Sci Total Environ. 571:416–425.

Pavanello S, Bonzini M, Angelici L, Motta V, Pergoli L, Hoxha M, Cantone L, Pesatori AC, Apostoli P, Tripodi A, et al. 2016. Extracellular vesicle-driven information mediates the long-term effects of particulate matter exposure on coagulation and inflammation pathways. Toxicol Lett. 259:143–150.

Pergoli L, Cantone L, Favero C, Angelici L, Iodice S, Pinatel E, Hoxha M, Dioni L, Letizia M, Albetti B, et al. 2017. Extracellular vesicle-packaged miRNA release after short-term exposure to particulate matter is associated with increased coagulation. Part Fibre Toxicol. 14(1):32.

Poljšak B, Fink R. 2014. The protective role of antioxidants in the defence against ROS/RNS-mediated environmental pollution. Oxid Med Cell Longev. 2014:1–22.

Poole LB. 2015. The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry. Free Radical Biol Med. 80:148–157.

Pope CA, Bhatnagar A, McCracken JP, Abplanalp W, Conklin DJ, O'Tool T. 2016. Exposure to fine particulate air pollution is associated with endothelial injury and systemic inflammation. Circ Res. 119(11): 1204–1214.

Pope CA, Burnett RT, Krewski D, Jerrett M, Shi Y, Calle EE, Thun MJ. 2009. Cardiovascular mortality and exposure to airborne fine particulate matter and cigarette smoke: shape of the exposure-response relationship. Circulation. 120(11):941–948.

Pramitha E, Haryanto B. 2019. Effect of exposure to 2.5 μm indoor particulate matter on adult lung function in Jakarta. Osong Public Health Res Perspect. 10(2):51–55.

Pua HH, Happ HC, Gray CJ, Mar DJ, Chiou N-T, Hesse LE, Ansel KM. 2019. Increased hematopoietic extracellular RNAs and vesicles in the lung during allergic airway responses. Cell Rep. 26(4):933–944.e4.

Puchelle E, Zahm J-M, Tournier J-M, Coraux C. 2006. Airway epithelial repair, regeneration, and remodeling after injury in chronic obstructive pulmonary disease. Proc Am Thorac Soc. 3(8):726–733.

Puddu P, Puddu GM, Cravero E, Muscari S, Muscari A. 2010. The involvement of circulating microparticles in inflammation, coagulation and cardiovascular diseases. Can J Cardiol. 26(4):e140–e145.

Puri BK, Treasaden IH, Cocchi M, Tsaluchidu S, Tonello L, Ross BM. 2008. A comparison of oxidative stress in smokers and non-smokers: an in vivo human quantitative study of n-3 lipid peroxidation. BMC Psychiatry. 8(Suppl 1):S4.

Qu G, Zhao X, Liu Y, Hao F, Gao J, Yang L, Zhou Q, Jiang G. 2019. Possible role of extracellular vesicles in exogenous chemical exposure-associated health concern. J Environ Sci. 80:1–4.

Raaschou-Nielsen O, Andersen ZJ, Beelen R, Samoli E, Stafoggia M, Weinmayr G, Hoffmann B, Fischer P, Nieuwenhuijsen MJ, Brunekreef B, et al. 2013. Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). Lancet Oncol. 14(9):813–822.

Rabe KF, Watz H. 2017. Chronic obstructive pulmonary disease. Lancet. 389(10082):1931–1940.

Rahman I, Biswas SK, Kode A. 2006. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. Eur J Pharmacol. 533(1–3):222–239.

Rao X, Zhong J, Brook RD, Rajagopalan S. 2018. Effect of particulate matter air pollution on cardiovascular oxidative stress pathways. Antioxid Redox Signal. 28(9):797–818.

Requia WJ, Adams MD, Arain A, Papatheodorou S, Koutrakis P, Mahmoud M. 2018. Global association of air pollution and cardiorespiratory diseases: a systematic review, meta-analysis, and investigation of modifier variables. Am J Public Health. 108(S2):S123–S130.

Rice MB, Ljungman PL, Wilker EH, Dorans KS, Gold DR, Schwartz J, Koutrakis P, Washko GR, O'Connor GT, Mittleman MA. 2015. Long-term exposure to traffic emissions and fine particulate matter and lung function decline in the Framingham heart study. Am J Respir Crit Care Med. 191(6):656–664.

Rodosthenous RS, Coull BA, Lu Q, Vokonas PS, Schwartz JD, Baccarelli AA. 2015. Ambient particulate matter and microRNAs in extracellular vesicles: a pilot study of older individuals. Part Fibre Toxicol. 13(1):13.

Rodríguez M, Silva J, López-Alfonso A, López-Muñiz MB, Peña C, Domínguez G, García JM, López-Gónzalez A, Méndez M, Provencio M, et al. 2014. Different exosome cargo from plasma/bronchoalveolar lavage in non-small-cell lung cancer. Genes Chromosomes Cancer. 53(9): 713–724.

Rose MC, Voynow JA. 2006. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. Physiol Rev. 86(1):245–278.

Russell AE, Sneider A, Witwer KW, Bergese P, Bhattacharyya SN, Cocks A, Cocucci E, Erdbrügger U, Falcon-Perez JM, Freeman DW, et al. 2019. Biological membranes in EV biogenesis, stability, uptake, and cargo transfer: an ISEV position paper arising from the ISEV membranes and EVs workshop. J Extracell Vesicles. 8(1):1684862.

Ryu A-R, Kim DH, Kim E, Lee MY. 2018. The potential roles of extracellular vesicles in cigarette smoke-associated diseases. Oxid Med Cell Longev. 2018:1–8.

Sack MN, Fyhrquist FY, Saijonmaa OJ, Fuster V, Kovacic JC. 2017. Basic biology of oxidative stress and the cardiovascular system. J Am Coll Cardiol. 70(2):196–211.

Salaün C, James DJ, Chamberlain LH. 2004. Lipid rafts and the regulation of exocytosis. Traffic. 5(4):255–264.

Samek L, Furman L, Mikrut M, Regiel-Futyra A, Macyk W, Stochel G, van Eldik R. 2017. Chemical composition of submicron and fine particulate matter collected in Krakow, Poland. Consequences for the APARIC project. Chemosphere. 187:430–439.

Sanner T, Grimsrud TK. 2015. Nicotine: carcinogenicity and effects on response to cancer treatment – a review. Front Oncol. 5:196.

Santus P, Corsico A, Solidoro P, Braido F, Di Marco F, Scichilone N. 2014. Oxidative stress and respiratory system: pharmacological and clinical reappraisal of N-acetylcysteine. COPD. 11(6):705–717.

Savina A, Furlán M, Vidal M, Colombo MI. 2003. Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. J Biol Chem. 278(22):20083–20090.

Schraufnagel DE, Balmes JR, Cowl CT, De Matteis S, Jung S-H, Mortimer K, Perez-Padilla R, Rice MB, Riojas-Rodriguez H, Sood A, 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):417–426.

Semchyshyn HM. 2014. Reactive carbonyl species *in vivo*: generation and dual biological effects. ScientificWorldJournal. 2014:1–10.

Serban KA, Rezania S, Petrusca DN, Poirier C, Cao D, Justice MJ, Patel M, Tsvetkova I, Kamocki K, Mikosz A, et al. 2016. Structural and functional characterization of endothelial microparticles released by cigarette smoke. Sci Rep. 6(1):31596.

Shah ASV, Lee KK, McAllister DA, Hunter A, Nair H, Whiteley W, Langrish JP, Newby DE, Mills NL. 2015. Short term exposure to air pollution and stroke: systematic review and meta-analysis. BMJ. 350:h1295.

Sheller S, Papaconstantinou J, Urrabaz-Garza R, Richardson L, Saade G, Salomon C, Menon R. 2016. Amnion-epithelial-cell-derived exosomes demonstrate physiologic state of cell under oxidative stress. PLoS One. 11(6):e0157614.

Sheller-Miller S, Urrabaz-Garza R, Saade G, Menon R. 2017. Damage-Associated molecular pattern markers HMGB1 and cell-Free fetal

telomere fragments in oxidative-Stressed amnion epithelial cell-derived exosomes. J Reprod Immunol. 123:3–11.
Shen H, Kreisel D, Goldstein DR. 2013. Processes of sterile inflammation. J Immunol. 191(6):2857–2863.
Shimizu T, Masuda S. 2017. Characterization of redox-active cysteine residues of persulfide-responsive transcriptional repressor SqrR. Commun Integr Biol. 10(4):e1329786.
Shyong Y-J, Chang K-C, Lin F-H. 2018. Calcium phosphate particles stimulate exosome secretion from phagocytes for the enhancement of drug delivery. Colloids Surf B. 171:391–397.
Sies H. 2018. On the history of oxidative stress: concept and some aspects of current development. Curr Opin Toxicol. 7:122–126.
Simkhovich BZ, Kleinman MT, Kloner RA. 2008. Air pollution and cardiovascular injury. J Am Coll Cardiol. 52(9):719–726.
Stassen FRM, van Eijck PH, Savelkoul PHM, Wouters EFM, Rohde GGU, Briedé JJ, Reynaert NL, de Kok TM, Benedikter BJ. 2019. Cell type- and exposure-specific modulation of CD63/CD81-positive and tissue factor-positive extracellular vesicle release in response to respiratory toxicants. Oxid Med Cell Longev. 2019:1–9.
Stayner L, Welch LS, Lemen R. 2013. The worldwide pandemic of asbestos-related diseases. Annu Rev Public Health. 34(1):205–216.
Sundar IK, Li D, Rahman I. 2019. Small RNA-sequence analysis of plasma-derived extracellular vesicle miRNAs in smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease as circulating biomarkers. J Extracell Vesicles. 8(1):1684816.
Takahashi T, Kobayashi S, Fujino N, Suzuki T, Ota C, Tando Y, He M, Yamada M, Kurosawa S, Yamaya M, et al. 2013. Differences in the released endothelial microparticle subtypes between human pulmonary microvascular endothelial cells and aortic endothelial cells in vitro. Exp Lung Res. 39(4–5):155–161.
Taleb A, Ahmad KA, Ihsan AU, Qu J, Lin N, Hezam K, Koju N, Hui L, Qilong D. 2018. Antioxidant effects and mechanism of silymarin in oxidative stress induced cardiovascular diseases. Biomed Pharmacother. 102:689–698.
Tarlo SM, Lemiere C. 2014. Occupational asthma. N Engl J Med. 370(7): 640–649.
Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, Antoniou A, Arab T, Archer F, Atkin-Smith GK, et al. 2018. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. J Extracell Vesicles. 7(1):1535750.
Thurston GD, Kipen H, Annesi-Maesano I, Balmes J, Brook RD, Cromar K, De Matteis S, Forastiere F, Forsberg B, Frampton MW, et al. 2017. A joint ERS/ATS policy statement: what constitutes an adverse health effect of air pollution? An analytical framework. Eur Respir J. 49(1). DOI:10.1183/13993003.00419-2016
Torregrosa Paredes P, Esser J, Admyre C, Nord M, Rahman QK, Lukic A, Rådmark O, Grönneberg R, Grunewald J, Eklund A, et al. 2012. Bronchoalveolar lavage fluid exosomes contribute to cytokine and leukotriene production in allergic asthma. Allergy. 67(7):911–919.
Twaddell SH, Baines KJ, Grainge C, Gibson PG. 2019. The emerging role of neutrophil extracellular traps in respiratory disease. Chest. 156(4): 774–782.
Union, PO of the EU. 2019. Air quality in Europe: 2019 report. [WWW Document]; [accessed 2020 Dec 5] http://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/7d42ac97-faca-11e9-8c1f-01aa75ed71a1/language-en/format-PDF.
US Geological Survey. 2020. Asbestos, mineral commodity summaries.
Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis K. 2009. Tobacco smoke: involvement of reactive oxygen species and stable free radicals in mechanisms of oxidative damage, carcinogenesis and synergistic effects with other respirable particles. IJERPH. 6(2):445–462.
Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis K, Loridas S. 2013. Pulmonary oxidative stress, inflammation and cancer: respirable particulate matter, fibrous dusts and ozone as major causes of lung carcinogenesis through reactive oxygen species mechanisms. IJERPH. 10(9): 3886–3907.
van Meteren N, Lagadic-Gossmann D, Chevanne M, Gallais I, Gobart D, Burel A, Bucher S, Grova N, Fromenty B, Appenzeller BMR, et al. 2019. Polycyclic aromatic hydrocarbons can trigger hepatocyte release of extracellular vesicles by various mechanisms of action depending on their affinity for the aryl hydrocarbon receptor. Toxicol Sci. 171: 443–462.
van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. 2018. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. Nat Rev Mol Cell Biol. 19(4):213–228.
Vestbo J. 2014. COPD: definition and phenotypes. Clin Chest Med. 35(1): 1–6.
Vítková V, Živný J, Janota J. 2018. Endothelial cell-derived microvesicles: potential mediators and biomarkers of pathologic processes. Biomark Med. 12(2):161–175.
Wagner JG, Morishita M, Keeler GJ, Harkema JR. 2012. Divergent effects of urban particulate air pollution on allergic airway responses in experimental asthma: a comparison of field exposure studies. Environ Health. 11(1):45.
Wahlund CJE, Eklund A, Grunewald J, Gabrielsson S. 2017. Pulmonary extracellular vesicles as mediators of local and systemic inflammation. Front Cell Dev Biol. 5:39.
Wang J, Schlagenhauf L, Setyan A. 2017. Transformation of the released asbestos, carbon fibers and carbon nanotubes from composite materials and the changes of their potential health impacts. J Nanobiotechnol. 15(1):15.
Wang H, Song L, Ju W, Wang X, Dong L, Zhang Y, Ya P, Yang C, Li F. 2017. The acute airway inflammation induced by PM2.5 exposure and the treatment of essential oils in Balb/c mice. Sci Rep. 7(1):44256.
Wang Z, Zhao J, Wang T, Du X, Xie J. 2019. Fine-particulate matter aggravates cigarette smoke extract–induced airway inflammation via Wnt5a–ERK pathway in COPD. COPD. 14:979–994.
Wong J, Magun BE, Wood LJ. 2016. Lung inflammation caused by inhaled toxicants: a review. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis. 11:1391–1401.
World Health Organization [WHO]. 2016. Ambient air pollution: a global assessment of exposure and burden of disease. [WWW Document]. World Health Organization; [accessed 2020 Mar 4] http://www.who.int/airpollution/ambient/en/
Wu J-Z, Ge D-D, Zhou L-F, Hou L-Y, Zhou Y, Li Q-Y. 2018. Effects of particulate matter on allergic respiratory diseases. Chronic Dis Transl Med. 4(2):95–102.
Wu F, Yin Z, Yang L, Fan J, Xu J, Jin Y, Yu J, Zhang D, Yang G. 2019. Smoking induced extracellular vesicles release and their distinct properties in non-small cell lung cancer. J Cancer. 10(15):3435–3443.
Xie L, Wu M, Lin H, Liu C, Yang H, Zhan J, Sun S. 2014. An increased ratio of serum miR-21 to miR-181a levels is associated with the early pathogenic process of chronic obstructive pulmonary disease in asymptomatic heavy smokers. Mol BioSyst. 10(5):1072–1081.
Xu H, Jiao X, Wu Y, Li S, Cao L, Dong L. 2019. Exosomes derived from PM2.5-treated lung cancer cells promote the growth of lung cancer via the Wnt3a/β-catenin pathway. Oncol Rep. 41(2):1180–1188.
Xu H, Ling M, Xue J, Dai X, Sun Q, Chen C, Liu Y, Zhou L, Liu J, Luo F, et al. 2018. Exosomal microRNA-21 derived from bronchial epithelial cells is involved in aberrant epithelium-fibroblast cross-talk in COPD induced by cigarette smoking. Theranostics. 8(19):5419–5433.
Xu Z, Wang N, Xu Y, Hua L, Zhou D, Zheng M, Deng X. 2019. Effects of chronic PM2.5 exposure on pulmonary epithelia: transcriptome analysis of mRNA-exosomal miRNA interactions. Toxicol Lett. 316: 49–59.
Yang Y, Ji P, Wang X, Zhou H, Wu J, Quan W, Shang A, Sun J, Gu C, Firrman J, et al. 2019. Bronchoalveolar lavage fluid-derived exosomes: a novel role contributing to lung cancer growth. Front Oncol. 9:197.
Yang B-Y, Qian Z, Howard SW, Vaughn MG, Fan S-J, Liu K-K, Dong G-H. 2018. Global association between ambient air pollution and blood pressure: a systematic review and meta-analysis. Environ Pollut. 235:576–588.
Yuana Y, Sturk A, Nieuwland R. 2013. Extracellular vesicles in physiological and pathological conditions. Blood Rev. 27(1):31–39.
Zeglinski MR, Turner CT, Zeng R, Schwartz C, Santacruz S, Pawluk MA, Zhao H, Chan AWH, Carlsten C, Granville DJ. 2019. Soluble wood smoke extract promotes barrier dysfunction in alveolar epithelial cells through a MAPK signaling pathway. Sci Rep. 9(1):10027.
Zhang Z, Guo C, Chang L, Bo Y, Lin C, Tam T, Hoek G, Wong MC, Chan T-C, Lau AK, et al. 2019. Long-term exposure to ambient fine

particulate matter and liver enzymes in adults: a cross-sectional study in Taiwan. Occup Environ Med. 76(7):488–494.

Zhang S, Li X, Xie F, Liu K, Liu H, Xie J. 2017. Evaluation of whole cigarette smoke induced oxidative stress in A549 and BEAS-2B cells. Environ Toxicol Pharmacol. 54:40–47.

Zheng X, Ding H, Jiang L, Chen S, Zheng J, Qiu M, Zhou Y, Chen Q, Guan W. 2015. Association between air pollutants and asthma emergency room visits and hospital admissions in time series studies: a systematic review and meta-analysis. PLoS One. 10(9):e0138146.

Zhu J, Hsu C-Y, Chou W-C, Chen M-J, Chen J-L, Yang T-T, Wu Y-S, Chen Y-C. 2019. PM2.5- and PM10-bound polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the residential area near coal-fired power and steelmaking plants of Taichung City, Taiwan: in vitro-based health risk and source identification. Sci Total Environ. 670:439–447.

Zhu L, Xiao R, Zhang X, Lang Y, Liu F, Yu Z, Zhang J, Su Y, Lu Y, Wang T, et al. 2019. Spermine on endothelial extracellular vesicles mediates smoking-induced pulmonary hypertension partially through calcium-sensing receptor. ATVB. 39(3):482–495.

Contribution des fractions chimiques et des voies de signalisation à la toxicité pulmonaire des $PM_{2.5}$ et à la production des vésicules extracellulaires.

Les particules fines, dont le diamètre aérodynamique équivalent est inférieur à 2,5 µm ($PM_{2.5}$), sont spécialement nocives car elles peuvent pénétrer profondément dans les poumons et induire une toxicité locale et systémique via divers mécanismes de toxicité. Ce travail de thèse est axé sur quatre objectifs majeurs : (1) évaluer le rôle des $PM_{2.5}$ ainsi que celui de leurs fractions organique et hydrosoluble dans la toxicité induite par les $PM_{2.5}$, (2) déchiffrer les mécanismes toxicologiques sous-jacents, (3) étudier les interactions entre ces mécanismes et enfin (4) identifier les fractions et les voies de signalisation impliquées dans la stimulation de la libération des VE après exposition aux $PM_{2.5}$. Des cellules BEAS-2B ont été exposées aux $PM_{2.5}$ et à leurs extraits en présence ou non d'inhibiteurs spécifiques du stress oxydant et des voies TLR4 et AhR. Des différences au niveau des mécanismes activés en fonction des fractions soulignent l'impact de la composition chimique sur la toxicité particulaire. Le rôle de la voie AhR et du stress oxydant dans l'induction de la réponse pro-inflammatoire a été identifié. D'autre part, l'interférence entre la voie TLR4 et la voie AhR a été mise en évidence via la quantification du CYP1A1. En plus, les résultats issus de ce travail suggèrent que Nrf2 est activé uniquement après exposition à la fraction organique des $PM_{2.5}$, et que ces trois voies de signalisation étudiées régulent son activation. Concernant les VE, le rôle des différentes fractions de $PM_{2.5}$ ainsi que par les trois mécanismes de toxicité étudiés dans la stimulation de la sécrétion des VE par les cellules BEAS-2B exposées aux $PM_{2.5}$ a été mis en évidence, en particulier l'importance du stress oxydant.

Mots clefs : $PM_{2.5}$, vésicules extracellulaires, inflammation, stress oxydant, activation métabolique.

Contribution of chemical fractions and signaling pathways to $PM_{2.5}$ pulmonary toxicity and extracellular vesicle production.

Fine particles, with an aerodynamic equivalent diameter less than 2.5 µm ($PM_{2.5}$), are known for their harmful health effects. They can penetrate deep into the lungs and induce local and systemic toxicity through various toxicity mechanisms. This thesis project focuses on four major objectives: (1) to evaluate the role of $PM_{2.5}$ as well as its organic and water-soluble fractions in $PM_{2.5}$ -induced toxicity, (2) to decipher the underlying toxicological mechanisms, (3) to study the interactions between these mechanisms, and finally (4) to identify the fractions and signaling pathways involved in stimulating the release of EVs after $PM_{2.5}$ exposure. For this purpose, BEAS-2B cells were exposed to $PM_{2.5}$ and its organic and water-soluble extracts in the presence or absence of specific inhibitors of oxidative stress, TLR4 and AhR pathways. According to our results, the complex chemical composition of $PM_{2.5}$ was the main cause of its toxic effects, although each fraction contributes in a different way depending on the toxicity parameter studied. The role of the AhR pathway and oxidative stress in the induction of the pro-inflammatory response was identified. On the other hand, the interference between the TLR4 and AhR pathways was highlighted via the quantification of CYP1A1. In addition, the results of this work suggested that Nrf2 is activated only after exposure to the organic extract, and that these three signaling pathways studied regulate its activation. Concerning EVs, the role of the different $PM_{2.5}$ fractions as well as the three toxicity mechanisms studied in the stimulation of EVs secretion by BEAS-2B cells exposed to $PM_{2.5}$ has been demonstrated, in particular the importance of oxidative stress.

Keywords: $PM_{2.5}$, extracellular vesicle, inflammation, oxidative stress, metabolic activation