

UNIVERSITE DU LITTORAL-COTE D'OPALE
Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant
EA 4492

N° attribué par la bibliothèque

|_|_|_|_|_|_|_|_|_|

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DES UNIVERSITES

DISCIPLINE : TOXICOLOGIE

**CARACTERISATION PHYSICOCHIMIQUE ET ETUDE DES
EFFETS TOXIQUES SUR DES CELLULES PULMONAIRES
BEAS-2B DES POLLUANTS PARTICULAIRES DE LA VILLE
DE DAKAR (SENEGAL).**

Présentée et soutenue publiquement par

Denis DIEME

Le 09 Novembre 2011

COMPOSITION DU JURY :

THOMAS Olivier, Ecole de Hautes Etudes en Santé Publique

MORIN Jean-Paul, Université de Rouen

CAZIER Fabrice, Université du Littoral Côte d'Opale

COURCOT Dominique, Université du Littoral Côte d'Opale

DIOUF Amadou, Université Cheikh Anta Diop de Dakar

SHIRALI Pirouz, Université du Littoral Côte d'Opale

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Président de Jury

Co-directeur de thèse

Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Tout d'abord je rends grâce à Dieu, pour la santé qu'il m'a accordée lors de ces 3 années de travail et à mes parents pour les sacrifices auxquels ils ont consenti pour la poursuite de mes études.

A mon défunt père, Mina

A mes mamans, Amy Collé et Gnadjoute

A ma famille d'accueille en France (MEIGNANT et FRAISSE)

Je souhaite remercier en premier lieu mes deux directeurs de recherche, Messieurs les Professeurs les Professeur Pirouz SHIRALI et Amadou DIOUF pour avoir accepté de diriger cette thèse, ainsi que pour leur accueil au sein de leurs laboratoires respectifs.

Au Professeur Dominique COURCOT qui a bien voulu accepter de m'éclairer dans cet univers à part..., et n'a jamais cessé de m'encourager.

Au Professeur Guillaume Garçon

Au Professeur Mamadou Fall

Au Docteur Anthony Verdin pour toute ta disponibilité dans le travail. Tes qualités professionnelles et humaines m'ont permis d'arriver à bout de cette thèse. Toute mon amitié

Au Dr Cazier et à toute l'équipe du Centre Commun de Mesures

Au Docteur Sylvain Billet

A tous les doctorants du laboratoire de toxicologie, en particulier Mathilde et Mona pour le bonheur de vivre que vous m'avez procuré tout le long de ces années. Bon courage pour vos recherches

A tout le personnel du laboratoire LTH (UCAD)

A tous mes frères, sœurs, oncles et cousin ainsi qu'à leurs conjoints respectifs.

A ma moitié Eveline, pour sa patience et son soutien affectueux.

A tous mes amis bien trop nombreux pour être cités nommément

A toutes les nombreuses personnes, qui à divers titres, ont participé à la réalisation de ce travail.

Que tous trouvent ici, l'expression de ma profonde et sincère gratitude.

FINANCEMENTS

Ce projet de recherche a été financé par:

- L'Agence Universitaire de la Francophonie (AUF).
- L'Université du Littoral Côte d'Opale (ULCO) ;
- L'Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (EA4492) ;

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Articles scientifiques

1. **DIEME D.**, CABRAL-NDIOR M., GARÇON G., BILLET S., VERDIN A., CAZIER F., COURCOT D., DIOUF A., SHIRALI P., (2011) Relationship between physicochemical characterization and toxicity of fine Particulate Matter (PM_{2.5}) collected in Dakar city (Senegal) in Environmental Research. (sous presse, Accepté le 04 novembre 2011)
2. **DIEME D.**, BILLET S., CABRAL-NDIOR M., GARÇON G., CAZIER F., COURCOT D., DIOUF A., SHIRALI P., (2011) Fine particulate matter collected in Dakar city (Senegal): Relationship between physicochemical characterization and toxicity in BEAS-2B cells, Toxicol. Lett., 205: S60–S179.
3. **DIEME D.**; CABRAL-NDIOR M.; VERDIN A., FALL M., BILLET S.; CAZIER F., GARÇON G., DIOUF A., SHIRALI P. Caractéristique physico-chimique et effets cytotoxique de particules atmosphériques PM_{2.5} de la ville de Dakar (SENEGAL), dans Annales de Toxicologie Analytique (sous presse, accepté le 07 novembre 2011)
4. CABRAL-NDIOR M., BOUHSINA S., **DIEME D.**, VERDIN A., FALL M., DEWAELE D., DIOUF A., GARÇON G., (2011) Case–control study among residents of Malika (Diamalaye II) bordering the Mbeubeuss waste dump in Dakar (Senegal): Pb and Cd impregnation and renal function alteration, Toxicol. Lett., 205: S60–S179.
5. CABRAL-NDIOR M.; **DIEME D.**; VERDIN A., FALL M., DEWAELE D.; CAZIER F., BOUHSINA S., TALL-DIA A., DIOUF A., SHIRALI P., GARÇON G., low-level environmental lead and cadmium exposure and renal adverse effects: a cross-sectional study in the population of children bordering the mbeubeuss landfill near dakar, Senegal. (soumis dans Human and Experimental Toxicology le 24 octobre 2011).

Communications dans des congrès internationaux ou nationaux

1. **DIEME D.**, BILLET S., CABRAL-NDIOR M., GARÇON G., CAZIER F., COURCOT D., DIOUF A., SHIRALI P. Relationship between physicochemical characterization and toxicity of fine particulate matter (PM_{2.5}) collected in Dakar city (Senegal). 47th Congress of the European Societies of Toxicology, Paris, 28-31 Août 2011.

2. CABRAL-NDIOR M., BOUHSINA S., **DIEME D.**, VERDIN A., FALL M., DEWAELE D., DIOUF A., GARÇON G. Case-control study among residents of Malika (Diamalaye II), bordering the Mbeubeuss rubbish dump in Dakar (Senegal): Pb and Cd impregnation and renal function alteration. 47th Congress of the European Societies of Toxicology, Paris, 28-31 Août 2011.
3. **DIEME D.**, CABRAL-NDIOR M., BILLET S., GARÇON G., VERDIN A., CAZIER F., COURCOT D., FALL M., DIOUF A., SHIRALI P., Aérosols atmosphériques particulaires (PM_{2.5}) collectés à Dakar (Sénégal) : relation entre leurs caractéristiques physico-chimiques et leur toxicité pulmonaire. Journée de Restitution 2011 IRENI, Douai, France, 8 juillet 2011.
4. **DIEME D.**, CABRAL-NDIOR M., BILLET S., GARÇON G., VERDIN A., CAZIER F., COURCOT D., FALL M., DIOUF A., SHIRALI P. Aérosols atmosphériques particulaires (PM_{2.5}) collectés à Dakar (Sénégal) : relation entre leurs caractéristiques physico-chimiques et leur toxicité pulmonaire. Colloque de la Société de Pharmacotoxicologie Cellulaire, Toulouse, France, 19 & 20 mai 2011.
5. DERGHAM M., BILLET S., **DIEME D.**, VERDIN A., COURCOT, D., DEWAELE D., SHIRALI P., GARÇON G., Aérosols atmosphériques particulaires (PM_{2.5}) industriels, urbains, et ruraux : induction d'un stress oxydant et d'une réponse inflammatoire dans des cellules épithéliales bronchiques humaines (BEAS-2B) Journée de Restitution 2011 IRENI, Douai, France, 8 juillet 2011.
6. DERGHAM M., BILLET S., **DIEME D.**, VERDIN A., COURCOT, D., DEWAELE D., SHIRALI P., GARÇON G., Aérosols atmosphériques particulaires (PM_{2.5}) industriels, urbains, et ruraux : induction d'un stress oxydant et d'une réponse inflammatoire dans des cellules épithéliales bronchiques humaines (BEAS-2B) Colloque de la Société de Pharmacotoxicologie Cellulaire, Toulouse, France, 19 & 20 mai 2011.
7. **DIEME D.**, BILLET S., GARÇON G., VERDIN A., CAZIER F., COURCOT D., FALL M., DIOUF A., SHIRALI P. caractérisation physico-chimique et cytotoxicité pulmonaire d'un prélèvement atmosphérique particulaire de la ville de Dakar (Sénégal). Journée de Restitution 2010 IRENI, Dunkerque, France, 5 Novembre 2010.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
Chapitre I : Rappels bibliographiques sur la pollution atmosphérique	
I. <u>Généralités sur la pollution atmosphérique</u>	4
I.1. Définition :	4
I.2. Composition de l'atmosphère	4
I.3. Sources de pollution	5
I.3.1. Sources non anthropiques ou naturelles	5
I.3.2. Sources anthropiques	6
I.4. Principaux polluants de l'atmosphère	6
I.4.1. L'ozone (O ₃)	7
I.4.2. Les oxydes d'azote (NO _x)	7
I.4.3. Les composés organiques volatils (COV)	8
I.4.4. Le monoxyde de carbone (CO)	9
I.4.5. Le dioxyde de soufre (SO ₂)	9
I.4.6. Les particules en suspension (« Particulate Matter, PM »)	9
I.5. Paramètres influençant la dispersion des polluants atmosphériques	9
I.5.1. Le vent	10
I.5.2. La pression atmosphérique	10
I.5.3. La stabilité et l'instabilité atmosphérique et la température	10
I.5.4. Les précipitations	11
I.5.5. L'ensoleillement et la photochimie	11
I.6. Effets de la pollution de l'air	11
I.6.1. L'impact sur la couche d'ozone	12
I.6.2. L'impact sur l'écosystème	12
I.6.3. L'impact sur le climat : effet de serre	13

I.6.4.	L'impact sur les bâtiments	14
I.6.5.	L'impact sur la santé	15
I.7.	Mesures internationales de lutte contre la pollution atmosphérique	15
I.8.	Réglementation Sénégalaise sur la pollution de l'air	17
I.9.	Pollution atmosphériques en zone urbaine au Sénégal : Cas de Dakar	18
II.	<u>Pollution particulaire</u>	19
II.1.	Définition	19
II.2.	Origine des Particules	20
II.3.	Processus de formation des aérosols	20
II.4.	Devenir des particules dans l'atmosphère	21
II.5.	Caractéristiques physico-chimiques des particules atmosphériques	21
II.5.1.	Propriétés physiques des aérosols atmosphériques	22
II.5.2.	Propriétés chimiques des aérosols atmosphériques	26
II.6.	Valeurs guides Sénégalaises et internationales des PM atmosphériques et PM _{2,5}	33
III.	<u>Effets de la pollution particulaire sur la santé humaine</u>	34
III-1.	Cible principale des particules en suspension : l'appareil respiratoire	34
III-1-1.	Notion de cytophysiologie de l'appareil respiratoire	34
III-1-2.	Interaction des particules avec l'appareil respiratoire	38
III-2.	Epidémiologie des particules	42
IV.	<u>Mécanismes physiopathologiques impliqués dans la toxicité des particules</u>	45
IV.1.	Activation métabolique des composés organiques adsorbés par les particules	45
IV.1.1.	Principe de la biotransformation	45
IV.1.2.	Activation métabolique des Composés Organiques Volatils (COV)	48
IV.1.3.	Activation métabolique des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP)	50
IV.2.	Le stress oxydant	53
IV.2.1.	Définition	53
IV.2.2.	Domages des membranes cellulaires	54

IV.2.3. Effets cellulaires du stress oxydant	55
IV.2.4. Les mécanismes de défense antioxydants	55
IV.2.5. Induction du stress oxydant par les particules	57
IV.3. L'inflammation	59
IV.3.1. La réaction inflammatoire	59
IV.3.2. Médiateurs de l'inflammation	60
IV.3.2.1. Les cytokines	61
IV.3.2.2. Cytokines d'intérêts	63
IV.3.3. Effets inflammatoires des particules	65
IV.3.3.1. Effets <i>In vivo</i>	65
IV.3.3.2. Effets <i>In vitro</i>	66
IV.3.3.3. Influence de la taille et de la réactivité de surface	67
IV.3.3.4. Influence des composés adsorbés sur les particules	68
OBJECTIFS DU TRAVAIL	70
Chapitre II : Partie expérimentale	
METHODOLOGIE GENERALE DE L'ETUDE	72
I. <u>Caractérisation physico-chimique</u>	73
I.1. Site et méthodes de prélèvements	73
I.2. Méthodologie d'analyse des caractéristiques physiques	75
I.2.1. Granulométrie	75
I.2.1.1. Méthode par Microscopie Electronique à Balayage couplée à une sonde d'analyse X (MEB-EDX)	75
I.2.1.2. Granulométrie par diffraction laser	77
I.2.2. Surface spécifique	78
I.3. Méthodologie d'analyse des caractéristiques chimiques	79
I.3.1. Composés inorganiques ou métaux	79
I.3.2. Ions solubles	81
I.3.3. La fraction organique de l'aérosol	82

II. <u>Etude toxicologique</u>	85
II.1. Matériel biologique	85
II.2. Culture des cellules BEAS-2B	85
II.3. Etude de la cytotoxicité globale	86
II.3.1. Observation des cultures de cellules exposées	86
II.3.2. Tests de cytotoxicité	86
II.3.2.1. Incorporation de la 5-Bromo-2'-désoxyUridine (BrdU)	87
II.3.2.2. Activité de la DésHydrogénase mitochondriale (DHm)	88
II.3.2.3. Activité de la LacticoDésHydrogénase (LDH) extracellulaire	88
II.4. Exposition des cellules et prélèvements	89
II.4.1. Activation métabolique de la fraction organique de l'aérosol atmosphérique	90
II.4.2. Evaluation du stress oxydant	94
II.4.2.1. Peroxydation lipidique : Dosage du Malondialdéhyde (MDA)	94
II.4.2.2. Dosage du glutathion.	95
II.4.3. Réponse inflammatoire	96
II.4.3.1. Expression génique des cytokines	96
II.4.3.2. Dosage ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) des cytokines	97
II.4.4. Dosage des protéines totales	97
II.4.5. Analyses Statistiques	98
Chapitre III : Résultats et discussion	
I. <u>Campagne de prélèvement et caractérisation physico-chimique des aérosols</u>	99
I.1. Granulométrie des particules	101
I.2. Surface spécifique	102
I.3. Composition chimique des aérosols	103
I.3.1. Analyse individuelle des particules par MEB-EDX	103
I.3.2. Analyse de la fraction inorganique des particules	109

I.3.3. Analyse de la fraction organique des aérosols	114
I.4. Conclusion sur les caractéristiques physico-chimiques des aérosols de Dakar	118
II. <u>Etude toxicologique</u>	119
II.1. Etude de la cytotoxicité globale	119
II.2. Activation métabolique de la fraction organique des aérosols	121
II.3. Stress oxydant	124
II.4. Réponse inflammatoire	126
II.5. Discussion générale	131
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	137
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	139

LISTE DES ILLUSTRATIONS

LISTE DES FIGURES

Figure I-1 : Schématisation des sources, des modes de formation et des modes de dépôt des aérosols atmosphériques selon leur taille (Whitby et Cantrell, 1976)	24
Figure I-2 : Structure chimique des composés organiques polychlorés	32
Figure I-3 : Appareil respiratoire humain et organisation cellulaire	37
Figure I-4 : Modèle de déposition fractionnée des particules inhalées de diamètre compris entre 0,6 nm et 20 µm dans l'appareil respiratoire humaine pendant la respiration nasale, chez les individus en bonne santé, selon le modèle de l'ICRP (1994)	41
Figure I-5 : Métabolisme Benzo[a]Pyrène (B[a]P) (adapté de Castell et al., 2005)	47
Figure I-6 : Métabolisme du benzène (ATSDR, 1997)	49
Figure I-7 : Schéma simplifié de l'induction des gènes CYP1A1 par le B[a]P	52
Figure I-8 : Origines des différents radicaux libres oxygénés, nitrogénés et des espèces réactives de l'oxygène, produits au niveau cellulaire (Favier, 2003)	54
Figure I-9 : Hiérarchisation des phénomènes biologiques en fonction du ratio GSH/GSSG (Baeza et Marano, 2007)	57
Figure II-1 : Schéma de la méthodologie générale de l'étude	72
Figure II-2 : Sites de prélèvements	73
Figure II-3 : Schéma du principe de la microscopie électronique à balayage	75
Figure II-4 : Schéma du principe de la granulométrie laser	77
Figure II-5 : Schéma du principe de fonctionnement de l'ICP/MS	80
Figure II-6 : Schéma illustrant les différentes parties de la CPG/MS	83
Figure II-7 : Représentation schématique d'un extracteur de soxhlet	84
Figure II-8 : Cellule BEAS-2B en culture (x100)	85
Figure II-9 : Schéma de microplaque pour l'étude de la cytotoxicité	87
Figure II-10 : Principe du test de la déshydrogénase mitochondriale (WST-1)	88
Figure II-11 : Principe du test Lacticodéshydrogénase (LDH) (Roche Applied Science)	89
Figure II-12 : Schéma du principe de fonctionnement de la PCR quantitative en temps réel	93
Figure II-13 : protocole de dosage du glutathion (GSH et GSSG)	96

Figure II-14 : Principe de dosage ELISA	97
Figure III-1 : Exemple de rétro-trajectoires des masses d'airs prises à Dakar (Fann et Faidherbe) et sur le site rural (A) et les sites urbain (B et C)	100
Figure III-2 : Distribution granulométrique par MEB-EDX de l'échantillon sous forme de fréquences relative et cumulée	102
Figure III-3 : Distribution granulométrique par granulométrie laser de l'échantillon sous forme de fréquence relative et cumulée	102
Figure III-4 : Proportion et composition chimique majoritaire au sein des types de particules prélevées à Dakar : zone rurale (R) et zone urbaine (P ₁ et P ₂)	107
Figure III-5 : Images MEB-EDX de particules collectées sur sites urbains (Dakar)	108
Figure III-6 : Répartition des métaux et des ions majeurs dans les PM _{2,5}	113
Figure III-7 : Facteur d'enrichissement calculé pour chaque élément en utilisant l'élément titane (Ti) comme référence	114
Figure III-8 : Profils des composés organiques adsorbés à la surface des particules collectés à Dakar	117
Figure III-9 : Incorporation de la 5-bromo-2-désoxyUridine (BrdU), normalisée par rapport au témoin, dans les cellules BEAS-2B exposées aérosols	120
Figure III-10 : Activité de la DésHydrogénase mitochondriale (DHm), normalisée par rapport au témoin, dans les cellules BEAS-2B exposées aérosols	120
Figure III-11 : Activité de la Lactate Déshydrogénase (LDH) extracellulaire, normalisée par rapport au témoin, dans les cellules BEAS-2B exposées aérosols	120
Figure III-12 : Expression génique du CYtochrome P450 1A1 (CYP1A1 ; vs témoins) dans les cellules BEAS-2B exposées aux aérosols	122
Figure III-13 : Expression génique du CYtochrome P450 1B1 (CYP1B1 ; vs témoins) dans les cellules BEAS-2B exposées aux aérosols	123
Figure III-14 : Expression génique du NADPH Quinone Oxydo-reductase-1 (NQO1 ; vs témoins) dans les cellules BEAS-2B exposées aux aérosols	123
Figure III-15 : Taux de Malondialdéhyde (MDA) dans les cellules BEAS-2B exposées aux aérosols	125
Figure III-16 : Ratio GSSG/GSH (vs témoins) dans les cellules BEAS-2B exposées aux aérosols	125
Figure III-17 : Sécrétion protéique du TNF- α (vs témoins) dans les cellules BEAS-2B exposées aux aérosols	129

Figure III-18: Sécrétion protéique de IL-1 β (vs témoins) dans les cellules BEAS-2B exposées aux aérosols	129
Figure III-19 : Sécrétion protéique de IL-6 (vs témoins) dans les cellules BEAS-2B exposées aux aérosols	130
Figure III-20 : Sécrétion protéique de IL-8 (vs témoins) dans les cellules BEAS-2B exposées aux aérosols	130

LISTE DES TABLEAUX

Tableau III-1 : Paramètres météorologiques de Dakar (moyennes mensuelles)	101
Tableau III-2 : Critères de composition chimique utilisés pour la définition des types de particules par analyse EDX	104
Tableau III-3: Types de particules identifiés dans les particules collectées sur les différents sites de Dakar : données d'analyse individuelle par MEB-EDX.	106
Tableau III-4: Composition en métaux (ICP-MS) et en ions hydrosolubles (chromatographie ionique) dans les aérosols collectés à Dakar	112
Tableau III-5 : Composés organiques Volatils (COV), Paraffines et Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) adsorbés à la surface des aérosols, détectés GC-MS	116
Tableau III-6 : Expression génique des cytokines inflammatoires IL-1 β , IL-6 et IL-8 dans les cellules BEAS-2B exposées aux aérosols	128

LISTE DES ABREVIATIONS

A

- ACS :** American Cancer Society
AD : Aldéhyde Déhydrogénase
ADN : Acide Désoxyribonucléique
AFSSET: Agence Française de Sécurité Sanitaire, de l'Environnement et du Travail
AhR: Aryl hydrocarbon Receptor
AKR : Aldo-céto Réductase
ARN: Acide Ribonucléique
Arnt: Ah receptor nuclear translocator
ASS : Afrique Sub-Saharienne

B

- BEGM:** Bronchial Epithelial cell Growth Medium
BET : Brunauer, Emmett et Teller
BPCO : Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive
BPDE : B[a]P-7,8-diol-9,10-époxyde
BrdU : 5-Bromo-2'-désoxyUridine
BTEX : Benzène, Toluène, Ethyl-benzène et Xylènes

C

- CAH :** Classification Ascendante Hiérarchique
CCSP: Clara cell specific protein
CETUD : Conseil Exécutif des Transports Urbains de Dakar
CFC : Chlorofluorocarbures
CI: Chromatographie Ionique
CNUED : Conférence des Nations Unis sur l'Environnement et le Développement
CO : Monoxyde de Carbone
COV : Composés Organiques Volatils
COX: Cyclo-Oxygénase
Ct: Cycle threshold
CYP: Cytochrome-P450

D

- D_{ae} :** Diamètre aérodynamique

DHD : Dihydrodiol Déshydrogénase
DHm : DésHydrogénase mitochondriale
dNTP : désoxyNucléotides Triphosphates
dTTP : 2'-désoxy-thymidine-5'-triphosphates

E

EHm : Epoxyde Hydrolase microsomale
ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EMX : Métabolisme des Xénobiotiques
ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène

F

FE : Facteur d'Enrichissement
FND : Fonds Nordique de Développement

G

GC-MS: Gas Chromatography-Mass Spectrometry
GPX : Glutathion Peroxydase
GR: Glutathion réductase
GSH : Glutathion sous sa forme réduite
GSSG: Glutathion sous sa forme oxydée
GST : Glutathion S-Transférase

H

HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HC: Hydrocarbures
HNE: 4-hydroxy-2-nonenal
HPLC: High Performance Liquid Chromatography

I

ICAM-1: Inter-Cellular Adhesion Molecule 1
ICP-MS: Inductively Coupled plasma Mass Spectrometry
IFN: Interférons
IL: Interleukines

L

LAURE : Loi sur l'Air et l'Utilisation Rationnelle de l'Energie

LDH : LacticoDésHydrogénase

LTO: Landing Take Off

M

MDA: Malondialdehyde

MEB-EDX: Microscopie Electronique à Balayage couplée à une sonde d'analyse X

MPO : Myéloperoxydase

N

NAAQS : National Ambient air Quality Standards

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate sous sa forme réduite

NEM: *N*-Ethylmaleimide

NK: Natural Killer

NQO1 : NADPH-quinone Oxyréductase I

NS : Norme Sénégalaise

O

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

P

PAMU : Programme d'Amélioration de la Mobilité Urbaine

PCB : PolyChloroBiphényles

PCDD : PolyChloroDibenzo-p-Dioxines

PCDD-F : PolyChloroDibenzo-p-Dioxines et Furanes

PCDF : PolyChloroDibenzo Furanes

PDi: Particules Diesel

PM : Particulate Matter

PNUE : Programme des Nations Unies pour l'Environnement

R

RT : Reverse Transcriptase

RT-qPCR : Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

S

SOD : Superoxyde Dismutase

T

TBA: Acide Thiobarbiturique

TMB: Tétraméthyl Benzidine Dihydrochloride

TNF- α : Tumor Necrosis Factor Alpha

X

XRE : Xenobiotic Response Element

INTRODUCTION

INTRODUCTION

L'explosion démographique, le développement des activités humaines de type industriel et agricole, associés à un accroissement des moyens de transport, ont entraîné au cours du siècle dernier, un changement de notre environnement affectant aussi bien l'atmosphère que les océans, la biosphère et les surfaces continentales. Un des épisodes les plus marquants de l'histoire de la pollution atmosphérique est le smog Londonien, survenu au mois de décembre 1952, sur cinq jours et qui aurait causé près de 4000 décès. Cet événement va susciter une prise de conscience et un intérêt croissant pour la lutte contre la pollution atmosphérique.

Avec l'émergence de travaux épidémiologiques fondés sur de nouvelles approches statistiques montrant la relation entre la pollution atmosphérique et les effets sur la santé, de nouvelles politiques de réduction des émissions anthropiques, associées à l'utilisation de technologies modernes, ont été mises en place dans les pays industrialisés. En France par exemple, une « Loi sur l'Air et l'Utilisation Rationnelle de l'Energie » (LAURE), visant à rationaliser l'utilisation de l'énergie et à définir une politique publique intégrant l'air en matière de développement urbain, a été adoptée en 1996. Cette loi reconnaît ainsi le droit à chacun de respirer un air qui ne nuise pas à sa santé. En revanche, dans les pays en développement, notamment en Asie et en Amérique Latine, ces émissions sont en nette augmentation suite à une consommation importante d'énergies fossiles. Des études épidémiologiques menées dans ces deux régions ont mis en évidence l'émergence des pathologies chroniques cardiorespiratoires reconnues sous la dépendance des facteurs de risques environnementaux (Cohen et al., 2005; Guo et al., 2009; Ma et al., 2011). Ces problèmes peuvent être extrapolés en Afrique sub-saharienne où le taux de croissance urbaine est le plus élevé au monde (Nations Unies, 2010), mais où les systèmes de mesure de la qualité de l'air sont quasi inexistantes. L'OMS a rapporté que près d'un quart de la totalité des décès survenus en Afrique en 2002 seraient attribuables à des facteurs de risque liés à l'environnement, dont 40000 décès directement liés à la pollution de l'air (WHO, 2006). Si le transport en Afrique joue un rôle vital dans le développement des zones urbaines et de la croissance économique en général, en permettant l'accès aux infrastructures commerciales et publiques, il constitue cependant l'un des facteurs principaux de la pollution atmosphérique urbaine (Banque Mondiale, 2003). L'importation des véhicules d'occasion souvent vétustes, dont l'âge moyen est de 10 ans, augmente sans cesse le parc automobile (Banque Mondiale, 2003). Le PNUE a estimé que plus de 90% de la pollution atmosphérique des villes de ces

Introduction

pays sont attribués aux émissions automobiles, aggravée par le nombre élevé de vieux véhicules ainsi que par leur mauvaise maintenance, des infrastructures inadéquates et des carburants de piètre qualité (PNUE, 2011). En effet l'Afrique Sub-Saharienne est également l'un des derniers continents où l'essence au plomb est encore utilisée malgré l'interdiction de son usage en 2006. Le plomb servant d'additif dans l'essence est le polluant le plus néfaste des émissions de véhicules. Ses graves conséquences sur la santé sont largement connues et ont fait l'objet de recherches approfondies dans le monde et dans cette région. Des études épidémiologiques réalisées dans de nombreux pays de l'Afrique Sub-Saharienne sur des populations, l'une exposée (milieu urbain) et l'autre non (milieu rural), ont montré une plombémie beaucoup plus élevée chez les populations vivant en milieu urbain que chez celles vivant en milieu rural (Diouf et al., 2003, 2006; Fourn and Fayomi, 2006; Hussein Were et al., 2008). D'autres sources de pollutions non négligeables existent aussi en Afrique Sub-Saharienne notamment les industries, l'utilisation du charbon de bois dans la cuisine, mais également l'épineux problème de la gestion des déchets ménagers dont les décharges à ciel ouvert constituent un véritable problème de santé publique.

Au Sénégal, l'agglomération de Dakar, capitale du pays, qui sur 550 km² (0,3% du territoire national), accueille 80% des activités économiques et industrielles nationales, présente l'image de bon nombre des villes des pays de l'Afrique Sub-Saharienne. Près de 30% de la population vit à Dakar. Cette forte densité est due aux flux migratoires des populations rurales attirées par les opportunités économiques. Le trafic automobile est particulièrement dense, les véhicules, dans leur grande majorité sont vétustes et utilisent du carburant diesel notamment dans le secteur des transports en commun. Les conséquences d'une telle urbanisation mal maîtrisée sont, entre autre, une dégradation manifeste de la qualité de l'air dont les transports restent les principaux responsables (Banque Mondiale 2003).

Les particules atmosphériques demeurent parmi les principaux polluants émis par les véhicules. En effet, les particules atmosphériques constituent l'indicateur de pollution pour lequel les données toxicologiques et épidémiologiques sont les plus développées. Ces études ont permis de mettre en évidence une association entre la variation des niveaux ambiants de particules atmosphériques urbaines et l'augmentation de la mortalité et de la morbidité liés à des problèmes respiratoires et cardiovasculaires. Les particules fines, en raison de leur faible diamètre, inférieur à 2,5µm (Particulate Matter 2.5, PM_{2.5}), sont capables de pénétrer profondément dans l'appareil respiratoire et d'y exercer des effets néfastes. Cette pénétration initie un ensemble de réactions physiopathologiques qui peuvent aboutir aux pathologies respiratoires et cardiovasculaires. Certes, des études ont été menées à Dakar portant sur les

Introduction

émissions d'oxydes d'azote (NO_x), de dioxyde de soufre (SO₂) et de PM₁₀ (particules de diamètre inférieur à 10 µm) et sur l'impact du trafic automobile sur les enfants (Banque Mondiale, 2003 ; Diouf et al., 2006), mais aucune étude à ce jour n'a encore porté sur les particules fines (PM_{2,5}) et leur toxicité *in vitro*.

Cette étude, qui est la première du genre au Sénégal, consiste d'une part au prélèvement et à la détermination des caractéristiques physiques et chimiques de particules atmosphériques PM_{2,5} collectées sur 2 sites urbains (Dakar) sous influence automobile (Fann ou P₁ et Faidherbe ou P₂) et sur un site Rural (Ngaparou ou R), et d'autre part à évaluer les mécanismes physiopathologiques sous-jacents impliqués dans la toxicité induite par ces particules lors de l'exposition de cellules pulmonaires humaines.

Avant d'aborder la partie expérimentale de notre étude, nous exposerons dans un premier chapitre les généralités sur la pollution atmosphérique (origine, composition, mécanisme de formation, impact global et local, réglementation), puis une revue non exhaustive des données de la littérature sera effectuée quant à l'implication potentielle des particules fines PM_{2,5} dans le développement de pathologies respiratoires, ainsi que leurs mécanismes d'action.

La partie expérimentale présentera dans le deuxième chapitre, les techniques utilisées pour réaliser ce travail et dans le troisième chapitre seront exposés et discutés les principaux résultats obtenus. Enfin une conclusion générale sera réalisée et des études complémentaires suggérées en vue de renforcer cette étude.

Chapitre I :
Rappels bibliographiques sur la pollution
atmosphérique

Chapitre I : Rappels bibliographiques sur la pollution atmosphérique

I. Généralités sur la pollution atmosphérique

I.1. Définition :

Définir la pollution n'est pas un simple exercice. Depuis 1968, le Conseil de l'Europe proposait la définition suivante : « Il y a pollution atmosphérique lorsque la présence d'une substance étrangère ou d'une variation importante dans la proportion de ses composants est susceptible de provoquer un effet nocif, compte tenu des connaissances scientifiques du moment, ou de créer une nuisance ou une gêne ».

Il a fallu attendre 1996 pour que cette notion soit précisée dans la législation française. Selon l'article 2 de la loi n° 96-1236 du 30 décembre 1996 sur l'air et l'utilisation rationnelle de l'énergie, « Constitue une pollution atmosphérique l'introduction par l'homme, directement ou indirectement, dans l'atmosphère et les espaces clos, de substances ayant des conséquences préjudiciables de nature à mettre en danger la santé humaine, à nuire aux ressources biologiques et aux écosystèmes, à influencer les changements climatiques, à détériorer les biens matériels, à provoquer des nuisances olfactives excessives ».

Le caractère très général de cette définition renseigne peu sur la complexité du phénomène, compte tenu de la diversité des polluants, de leurs combinaisons et modifications dans l'atmosphère et de leurs interactions, notamment sous l'effet de réactions photochimiques mais aussi en raison du rôle de facteurs physiques tels que le climat et le relief. Aussi, son évolution est-elle parfois difficile à appréhender avec rigueur. Cette complexité contribue à renforcer les inquiétudes de l'opinion puisque elle rend difficile l'appréciation de la qualité de l'air. Cette loi ne prend pas en considération les sources naturelles de pollution qui peuvent considérablement altérer la qualité de l'air.

I.2. Composition de l'atmosphère

L'atmosphère terrestre est une enveloppe externe gazeuse de notre planète, animée de mouvements qui dépendent essentiellement de phénomènes physiques : l'inégale répartition de l'énergie solaire à la surface terrestre et les forces de CORIOLIS. Ces deux paramètres déterminent la structure horizontale de la planète avec la formation des cellules de Hadley, des zones anticycloniques etc.... La stratification verticale de l'atmosphère n'est pas homogène sur toute son épaisseur, on peut la découper en strates qui sont déterminées par plusieurs propriétés physiques telles que la pression, la température, la densité... Quatre strates composent l'atmosphère qui sont, en fonction de l'altitude: la troposphère, la stratosphère, la

mésosphère et la thermosphère. Ces strates sont respectivement séparées par trois zones d'inversions thermiques : la mésopause, la stratopause et la tropopause. Celle qui nous intéresse le plus est la troposphère, qui a une limite supérieure de 15km, sa température décroît avec l'altitude et peut atteindre -50°C . La pression et la densité y sont maximales car elle concentre neuf dixièmes des gaz atmosphériques. C'est aussi le lieu où se produit la plupart des phénomènes météorologiques. La composition principale de l'air comprend pour l'essentiel de l'azote (78%), de l'oxygène (21%) et des gaz rares (1%). C'est dans cette zone que sont émis les polluants qui ont tendance à s'y accumuler à cause d'une différence de pression et d'un manque de convection avec la stratosphère. Au niveau de la stratosphère se trouve à une altitude d'environ 25 km la couche d'ozone de plusieurs kilomètres dont l'épaisseur est variable sur toute sa surface. Cette couche joue un rôle essentiel dans la protection de la surface terrestre des rayonnements ultraviolets.

I.3. Sources de pollution

Les bilans d'émissions posent le problème de l'exhaustivité des sources de pollutions. Bien souvent, les inventaires recensent les émetteurs qui contribuent le plus significativement aux émissions d'une substance donnée. L'importance des contributions est bien souvent jugée a priori, sur la base de connaissances scientifiques parfois parcellaires. En fonction des besoins, des moyens sont investis pour combler les lacunes de cette connaissance. L'identification des émetteurs est une étape importante dans l'élaboration de l'inventaire. Mais l'identification des émetteurs correspond également à d'autres préoccupations plus politiques : connaître la contribution des différents secteurs permet de mettre en place des politiques de réductions des émissions plus efficaces car mieux ciblées. Les différents polluants peuvent être regroupés suivant leurs sources : les polluants d'origine non anthropique ou naturelle et les polluants d'origine anthropique.

I.3.1. Sources non anthropiques ou naturelles

Il s'agit des sources induisant des rejets de substances polluantes mais qui ne sont pas liées à l'activité humaine. Parmi ces sources, on peut distinguer les sources biogéniques (liées à la présence d'organismes vivants) des autres sources. L'éruption volcanique qui s'accompagne de dégagements très importants de produits soufrés, est une source naturelle majeure, de même que les feux de forêt d'origine naturelle et la production d'embruns marins composés de cristaux de NaCl. Remarquons qu'au niveau des sources biogéniques, il n'est pas toujours évident de les classer comme le cas d'élevage d'animaux.

I.3.2. Sources anthropiques

L'utilisation des combustibles fossiles (pétrole, gaz naturel et charbon) constitue la principale source des polluants d'origine anthropique. En effet ces combustibles à eux seuls, comblent environ 80% des besoins énergétiques mondiaux et se concentrent, en majorité, en milieu urbain. Parmi les sources anthropiques, on oppose souvent les sources fixes aux sources mobiles liées aux transports. Une autre notion également importante pour la caractérisation des sources et leur distribution géographique est la notion de source ponctuelle ou diffuse. Les sources ponctuelles caractérisent les grands sites industriels et sont étudiées en conjonction avec des données concernant leur localisation, leur capacité, leur activité... Les sources ponctuelles, définies par la nomenclature Corinair, sont : les usines de production ayant une capacité thermique supérieure à 300 MW, les raffineries, les fabriques d'acide sulfurique, d'acide nitrique, les unités de production de fer ou d'acier supérieures à 3 Mt/an, les usines de pâtes à papier de capacité supérieure à 1000 kt/an, les usines de peinture de voitures ayant une production supérieure à 100000 véhicules/an, les aéroports de plus de 100000 LTO (Landing Take Off) : cycle normalisé de tests des moteurs d'avions cycles /an, toutes les usines émettant plus de 1000 t/an de SO₂, NO_x ou COV et celles émettant au moins 300.000 t/an de CO₂. Les sources diffuses correspondent à de petits émetteurs fortement dispersés dans l'espace. Ces sources ne peuvent être décrites que sur la base de surfaces importantes et sont très difficiles à caractériser au niveau local. Par exemple, une grande installation de chauffage urbain desservant un quartier sera plutôt répertorié en tant que source ponctuelle, alors que l'ensemble des chaudières individuelles servant au chauffage des logements constitue plutôt une source diffuse. Enfin, on parle parfois de sources linéaires qui concernent essentiellement les transports (routier, fluvial...) où les émissions sont déterminées le long d'un axe.

I.4. Principaux polluants de l'atmosphère

Les polluants de l'atmosphère peuvent être gazeux ou solides. Leur présence modifie les caractéristiques physico-chimiques de l'atmosphère. La nocivité des différentes substances est liée soit à leurs caractéristiques intrinsèques soit à celles des substances adsorbées à la surface des particules. Elle est liée à la concentration en polluant et à la durée d'exposition de la cible à la substance. Les effets sanitaires aigus sont les plus documentés. Toutefois il ne faut pas négliger les effets à long terme liés à une accumulation par exposition chronique ou les effets de synergie liés à l'exposition à plusieurs substances simultanément. Les activités humaines de production industrielle et énergétique sont, avec les transports, les principales

sources de polluants primaires parmi lesquels le monoxyde de carbone (CO), le dioxyde de carbone (CO₂), le dioxyde de soufre (SO₂), les oxydes d'azote (NO_x), les hydrocarbures, les métaux lourds, le Plomb, le chlore et les poussières sont émis dans les plus grandes quantités et, surtout sont les mieux connus. C'est en réalité un cocktail de centaines de substances diverses qui se retrouvent dans l'atmosphère dont certaines en très faible quantité. D'autres polluants nommés « polluants secondaires » résultent de la transformation par photochimie de plusieurs polluants dont principalement les oxydes d'azote et les hydrocarbures (COV en particulier).

I.4.1 L'ozone (O₃)

L'ozone est un gaz naturellement présent dans la haute atmosphère (stratosphère). Il s'y forme par dissociation de l'oxygène sous l'effet des ultraviolets. Cette formation est en équilibre avec la décomposition par des radiations lumineuses de plus grande longueur d'onde. Au niveau de la basse couche de l'atmosphère l'ozone est un polluant dit « secondaire » car il n'est pas émis directement. Il est l'un des principaux composés formés par photochimie notamment lors de la réaction des NO_x et des COV. Sa concentration varie durant la journée et les pics maximaux sont obtenus à partir de midi avec les maxima de températures. L'ozone constitue donc un bon traceur de pollution dans la mesure où il est facile à mesurer.

L'ozone est un puissant oxydant qui résulte de la réaction de recombinaison d'un atome d'oxygène (O) avec une molécule de dioxygène (O₂). Dans la troposphère, l'atome d'oxygène nécessaire est introduit par photodissociation du dioxyde d'azote (NO₂), sous l'action du rayonnement solaire. En milieu non pollué, le NO formé réagit avec l'ozone pour former le NO₂. Il existe ainsi un ensemble de réactions conduisant à un équilibre entre le NO₂, NO et O₃. En milieu pollué, notamment dans les grandes agglomérations, le cycle équilibré NO_x/O₃ est perturbé par la présence de COV qui déplacent l'équilibre vers une plus grande formation de l'ozone. La teneur de ce polluant est en constante augmentation dans l'hémisphère nord et sa concentration a été multipliée par cinq en un siècle, passant de 10ppm en 1874 à 50ppm actuellement (Marenco et al., 1994)

I.4.2. Les oxydes d'azote (NO_x)

Malgré la présence de quantités importantes de N₂O dans l'atmosphère, on parle surtout du monoxyde d'azote (NO) et du dioxyde d'azote (NO₂) en ce qui concerne la pollution de l'air. En effet NO et NO₂ sont des gaz toxiques contrairement au N₂O. Ils

participent également à des réactions photochimiques importantes dans la troposphère. Le NO et NO₂ proviennent de sources anthropiques notamment les combustions, à haute température, de combustibles fossiles. A l'échelle planétaire, les orages, les éruptions volcaniques et l'activité bactérienne produisent de très grandes quantités de NO_x. Toutefois, en raison de la répartition de ces émissions sur la surface terrestre, les concentrations atmosphériques d'oxyde d'azote demeurent très faibles. En revanche en milieu urbain ses concentrations peuvent atteindre des valeurs très élevées. Ces oxydes d'azote sont impliqués dans la formation de l'ozone troposphérique. Le secteur des transports est responsable de plus de 60% des émissions et notamment les moteurs diesel qui en rejettent deux fois plus que les moteurs à essence catalysés.

I.4.3. Les composés organiques volatils (COV)

Les composés organiques volatils (COV) ne correspondent pas à une définition très rigoureuse. Ils regroupent une multitude de substances appartenant à différentes familles chimiques (hydrocarbures aromatiques, cétones, alcools, alcanes, aldéhydes, etc). Il est fréquent de distinguer séparément le méthane (CH₄) qui est un COV particulier, naturellement présent dans l'air. On parle alors de COV méthaniques et de COV non méthaniques. De manière simplifiée, les COV sont des gaz émis par la combustion de carburants ou l'évaporation de solvants contenus dans certains matériaux et produits. Leur point commun est de s'évaporer plus ou moins rapidement à température ambiante et de se retrouver dans l'air. Les COV peuvent être biogéniques (origine naturelle) ou anthropogéniques (activités humaines). Les émissions liées au transport automobile peuvent constituer jusqu'à 25 % des émissions totales de COV. On les retrouve aussi en atmosphère intérieure, dans l'habitat, où ils sont présents dans de nombreux produits et matériaux (mousses isolantes, peintures, moquettes, linoléum, vernis etc.) ou issus de l'utilisation de produits domestiques (bombes aérosols, produits insecticides, cosmétiques, parfums; colles; produits de nettoyage, détergents, décapants, détachants, diluants, alcool à brûler, essence de térébenthine). Les processus de combustion lors de la cuisson des aliments au gaz ou dans la fumée de tabac produisent aussi des COV de manière non négligeable. Les COV sont impliqués dans la pollution photochimique de l'air c'est à dire qu'en se dégradant dans l'atmosphère, ils perturbent les équilibres chimiques avec pour conséquence la formation ou l'accumulation dans l'environnement de composés nocifs dont l'ozone dans la basse atmosphère.

I.4.4. Le monoxyde de carbone (CO)

Le monoxyde de carbone (CO) est un gaz incolore, inodore et insipide produit par la combustion incomplète de toute matière organique, incluant les carburants fossiles (dérivés du pétrole), les déchets et le bois. Les principales sources anthropiques de monoxyde de carbone sont de loin le transport (véhicules diesels), mais aussi le secteur industriel et le chauffage au bois. Une fois dans l'atmosphère, il se transforme éventuellement en dioxyde de carbone (CO₂), un des plus importants gaz à effet de serre. En milieu urbain, on observe les concentrations maximales de CO aux heures de pointe de circulation automobile, à proximité des autoroutes et des grandes artères urbaines.

I.4.5. Le dioxyde de soufre (SO₂)

Le dioxyde de soufre (SO₂) est un gaz incolore dont l'odeur est âcre et piquante. Il provient principalement de procédés industriels et de la combustion de carburants fossiles contenant du soufre. Des concentrations élevées de ce polluant peuvent être observées à proximité de sources industrielles. À la suite de réactions chimiques dans l'atmosphère, le SO₂ se transforme en sulfates (sous forme liquide ou solide). Dans la nature, les volcans sont responsables de la majeure partie des émissions de produits soufrés.

I.4.6. Les particules en suspension (« Particulate Matter, PM »)

Les particules en suspension (PM) ou aérosols sont des systèmes colloïdaux, liquides ou solides en suspension dans l'air. Les particules en suspension proviennent des sources naturelles, comme les sels marins, les particules volcaniques, les poussières désertiques, les petites gouttes d'eau (brouillard), les microorganismes et des sources anthropiques (combustion industrielle, chauffage domestique, incinération de déchets, transport). Les particules en suspension sont un ensemble hétérogène de substances et leur composition varie en fonction de leur source d'émission. Une caractérisation plus détaillée des particules atmosphériques sera développée dans le chapitre suivant.

I.5. Paramètres influençant la dispersion des polluants atmosphériques

Le phénomène de dispersion, c'est-à-dire le déplacement des polluants depuis la source, est primordial puisqu'il détermine l'accumulation d'un polluant ou sa dilution dans l'atmosphère. La dispersion dépend de plusieurs paramètres dont les conditions météorologiques.

I.5.1. Le vent

Le vent est l'un des paramètres météorologiques les plus importants pour le transport et la dispersion des polluants. Il intervient à toutes les échelles tant par sa direction que par sa vitesse. L'influence du vent sur la pollution atmosphérique est très variable selon la position de la source. Généralement la vitesse du vent augmente avec l'altitude. Au fur et à mesure que les polluants s'élèvent, la dispersion est facilitée par le vent. Plus le vent est fort, plus les niveaux de pollution seront bas. En revanche, un vent de faible vitesse favorise l'accumulation locale des polluants

I.5.2. La pression atmosphérique

En situation de basses pressions (dépression), la turbulence de l'air est généralement assez forte et engendre de bonnes conditions de dispersion. En revanche, des situations anticycloniques (hautes pressions) ou la stabilité de l'air ne permet pas la dispersion des polluants favorisent leur accumulation.

I.5.3. La stabilité et l'instabilité atmosphérique et la température

Une atmosphère est stable si une masse d'air, écartée de sa position d'équilibre, a tendance à y retourner. Elle est instable dans le cas contraire. Ces déplacements d'air sont guidés par des lois thermodynamiques. Si la masse d'air soulevée est plus froide que le milieu environnant, elle sera plus dense et donc redescendra à son niveau de départ (atmosphère stable). Si la masse d'air soulevée est plus chaude que le milieu environnant, elle sera plus légère et subira donc une élévation (atmosphère instable). Ainsi la stabilité d'une masse d'air dépend de sa température, de l'élévation, relative à la température de l'air environnant stationnaire qu'elle traverse. La structure thermique verticale de la troposphère tient alors une part importante dans le mélange verticale des masses d'air, et par conséquent la dilution des polluants. En situation normale de diffusion dans la troposphère, la température diminue avec l'altitude. Cette situation ne freine pas la diffusion verticale des masses d'air, et donc des polluants, jusqu'à ce qu'elles atteignent un certain équilibre, c'est-à-dire que la densité de l'air ambiant soit la même que l'air montant. Mais il peut exister des situations d'inversion de température à partir d'une certaine hauteur. Dans cette situation, une couche d'air chaud se trouve au-dessus d'une couche d'air plus froid et joue le rôle de couvercle thermique. L'air pollué, qui se disperse vers le haut en situation normale de diffusion, est alors bloqué par cette couche d'air chaud. Ce phénomène contribue à la pollution locale et peut conduire aux pics de pollution. Il se rencontre dans des situations météorologiques particulières par exemple en

début de matinée, suite à une nuit dégagée et sans vent, les couches d'air à proximité du sol se sont refroidies tandis que les couches immédiatement supérieures restent plus chaudes ou en hiver, lors de conditions anticycloniques (belle journée d'hivers ensoleillée, zone de hautes pressions) avec de faibles vents. Ces épisodes de pollution sont appelés « smog ».

I.5.4. Les précipitations

Les précipitations sont généralement associées à une atmosphère instable, qui permet également une bonne dispersion de la pollution atmosphérique. Par ailleurs, elles entraînent au sol certains polluants, et peuvent parfois accélérer la dissolution d'autres polluants. Mais, globalement, les concentrations en polluants dans l'atmosphère diminuent nettement par temps de pluie notamment pour les poussières et les éléments solubles tel que le dioxyde de soufre (SO₂). L'humidité influence la transformation des polluants primaires émis, sous l'action de l'humidité : de l'acide sulfurique (H₂SO₄) se forme à partir du SO₂, et de l'acide nitrique (HNO₃) à partir des NO_x

I.5.5. L'ensoleillement et la photochimie

L'ensoleillement provoque un réchauffement des sols et des surfaces. Ceci entraîne des phénomènes de convection qui sont à l'origine de mouvements verticaux et horizontaux de l'atmosphère (l'air chaud étant plus léger que l'air froid). L'ensoleillement agit également sur la chimie des polluants : l'énergie solaire, notamment via l'action des ultra-violets, peut altérer certaines molécules dans l'air et favoriser la formation photochimique de l'ozone troposphérique. La photochimie est la branche de la chimie qui étudie toute réaction s'accompagnant d'une absorption ou d'une émission de lumière ou, plus généralement, d'un rayonnement électromagnétique. Les réactions de ce type sont à l'origine de la production de nombreux polluants secondaires dans la troposphère, la source de lumière étant le soleil. La formation de smog photochimique est due à ce type de réactions résultantes d'une inversion de température (effet de vallée) caractérisée par un temps chaud et sec, dépourvu de nuages et un vent faible.

I.6. Effets de la pollution de l'air

La pollution de l'air a un impact négatif sur la santé, les végétaux, les écosystèmes et les bâtiments : les effets sont nombreux et certains n'ont été que récemment documentés et pris en compte tels que les effets des rejets de gaz carbonique et autres gaz à effet de serre sur

le changement climatique, ou les effets des particules fines sur la santé. Il n'existe pas en général de seuil de nocivité mais plutôt une relation croissante entre les effets et les niveaux de pollution, parfois assortis de phénomènes cumulatifs, comme pour certaines expositions chroniques.

I.6.1 L'impact sur la couche d'ozone

L'ozone (O_3), est un constituant minoritaire de l'atmosphère. Cependant cette faible quantité d'ozone est indispensable au maintien de la vie sur la Terre, car elle absorbe les rayons ultra-violet les plus nocifs de la lumière solaire. L'ozone a fait l'objet de mesures depuis 1957. En 1979, les observations ont noté un « trou » dans la couche d'ozone stratosphérique, c'est-à-dire une diminution de son épaisseur au-dessus de l'Antarctique au moment du printemps austral (octobre). Ce trou saisonnier a été observé depuis, chaque année, avec une tendance à la diminution de l'épaisseur de la couche. Ce phénomène semble lié à la présence d'éléments chlorés apportés, entre autres par les chlorofluorocarbures (C.F.C.). Au pôle Sud, l'atmosphère du continent Antarctique reste isolée du reste du monde pendant 4 mois (de juillet à septembre) à cause de vents tourbillonnants avec des températures qui atteignent entre -80 et $-100^{\circ}C$. Les nuages stratosphériques contiennent alors de fins cristaux de glace qui fixent le chlore sous forme de HCl et de NO_2ClO . Dès la réapparition du soleil à la fin de l'hiver, il se produit alors des réactions de photodissociation par les UV, libérant les radicaux de Cl et de ClO , aboutissant à la destruction de l'ozone par réaction photochimique (Claus Bliefert et al., 2008).

I.6.2. L'impact sur l'écosystème

Les polluants atmosphériques peuvent affecter les plantes et les écosystèmes à différents niveaux dans leur fonctionnement. On distinguera les effets directs, induits par une absorption du polluant par la plante ou un dépôt à sa surface et les effets indirects liés à une modification du milieu dans lequel la plante se développe, sol ou atmosphère. En outre, l'impact de la pollution sur le fonctionnement des écosystèmes est souvent localisé, mais peut concerner de grandes étendues à l'échelle régionale, voire continentale. Les échelles de temps concernées vont de l'épisode de pollution durant quelques jours jusqu'à des échelles pluriannuelles.

Principalement trois catégories de polluants atmosphériques créent des impacts sur les écosystèmes : l'ozone, les dépôts atmosphériques et les aérosols.

L'ozone peut modifier profondément le fonctionnement de la plante, en particulier la photosynthèse et la régulation stomatique. C'est un effet direct lié à l'absorption stomatique de l'ozone par la plante et des dégradations biochimiques au sein des cellules de la feuille dues au pouvoir oxydant de l'ozone. Même si la plante est capable de « détoxifier » une partie de l'ozone absorbé, cet effet peut être très significatif dans les zones exposées à de forts pics d'ozone.

Les dépôts atmosphériques constituent un apport de nutriments très significatif pour de nombreux écosystèmes, en particulier les forêts et les écosystèmes naturels. Si ces apports peuvent avoir des effets positifs, ils risquent souvent de modifier profondément les écosystèmes et leur fonctionnement, d'une part par des modifications induites au niveau du sol (acidification), d'autre part en changeant les conditions de compétition entre espèces végétales et microbiennes et donc la nature même de l'écosystème.

Les impacts des particules atmosphériques (aérosols) sont multiformes. Ils commencent par une modification quantitative et qualitative du rayonnement qui peut, dans certaines régions, modifier sensiblement la photosynthèse, donc la production végétale, et l'évapotranspiration. D'autres effets passent par une modification de la pluviométrie à l'échelle régionale par la multiplication des noyaux de condensation mais aussi, dans des cas extrêmes, par une modification des régimes de circulation.

A l'inverse, les écosystèmes jouent un rôle majeur dans le cycle atmosphérique des polluants, comme sources de composés gazeux et de particules. Ce sont aussi des puits majeurs pour de nombreux polluants. Ces processus de dépôt et d'émission sont pris en compte dans les modèles de prévision de la qualité de l'air. Les processus d'émission et de dépôts dépendent en effet de nombreux déterminants physiques, chimiques et biologiques, mais également anthropiques au niveau des écosystèmes et de la basse atmosphère.

I.6.3. L'impact sur le climat : effet de serre

L'effet de serre est un phénomène naturel. L'énergie solaire qui parvient au sol réchauffe la Terre et se transforme en rayons infrarouges. Les gaz présents dans l'atmosphère piègent une partie de ces rayons qui tendent à la réchauffer. Ainsi, sans effet de serre, la température moyenne sur la Terre serait de -18 °C et peu d'eau serait sous forme liquide. Cet effet de serre a donc une influence bénéfique puisqu'il permet à notre planète d'avoir une température moyenne de 15° C, et donc la vie sur terre.

Depuis le début de l'ère industrielle, l'homme a rejeté dans l'atmosphère des gaz (gaz carbonique, méthane, oxydes d'azote, etc.) qui augmentent artificiellement l'effet de serre. Si cet ajout à l'effet de serre naturel est faible (environ +1 %), il est amplifié par la vapeur d'eau et a ainsi contribué à l'augmentation de la température moyenne de notre planète d'environ 0,5 °C observée dans la seconde moitié du vingtième siècle. A très long terme, des perturbations importantes pourront également intervenir dans les courants marins et les glaces polaires, avec des conséquences sur la répartition du réchauffement climatique selon les régions du globe.

I.6.4. L'impact sur les bâtiments

La pollution soufrée (SO₂) se traduit macroscopiquement par un noircissement superficiel de tous les matériaux des façades, dû au dépôt et à la cimentation des poussières en formant une croûte, et par une sulfatation des pierres calcaires immédiatement sous leur surface. Il convient de souligner l'importance de ce phénomène et le fait qu'il n'est pas contemporain puisqu'on l'observait déjà au Moyen-Age avec l'utilisation du seul bois pour le chauffage, la cuisine et l'artisanat. On s'interroge sur la poursuite de cet effet avec les particules issues des transports. Sauf dans les cas extrêmes de surcharge massive, notamment à proximité immédiate des sources de polluants gazeux et particulaires, le noircissement de l'ensemble des matériaux ne concerne que ceux qui sont situés dans les parties des bâtiments abritées des pluies directes battantes et des ruissellements d'eau, dans lesquelles les particules déposées entre deux épisodes pluvieux ne sont pas lessivées lors de l'épisode suivant. Il en résulte une juxtaposition de deux types de zones sur les façades : claires (à la pluie) et foncées (hors pluie). Les parties claires sont des zones d'érosion dissolution par l'eau, dissolution d'autant plus importante que les précipitations sont plus acides et que le matériau est plus tendre, friable et poreux. Les parties foncées sont des zones d'accumulation-sédimentation des poussières, qui sont secondairement cimentées par du sulfate de calcium hydraté (Gypse: CaSO₄, 2H₂O). Ces parties des bâtiments, bien qu'inaccessibles à la pluie et aux ruissellements, doivent cependant être humides car le gypse formé est un minéral hydraté et l'humidité de la paroi facilite l'accrochage et la rétention des particules. Il est remarquable que, quelle que soit la nature chimico-minéralogique du substrat sur lequel se forme une croûte noire, celle-ci est invariablement en gypse. C'est par exemple le cas des croûtes gypseuses formées sur les statues en bronze, lequel ne contient ni soufre ni calcium, ou sur le verre, qui contient peu de calcium et pas de soufre. L'origine du calcium n'est donc pas à rechercher systématiquement dans le matériau portant la croûte sulfatée. Les vecteurs du

calcium sont au contraire les gouttelettes de brouillard ou les particules solides en calcite (carbonate de calcium) ou en gypse dont la présence est démontrée dans les atmosphères urbaines (Claus Bliefert et al., 2008)

I.6.5. L'impact sur la santé

Les effets de la pollution atmosphérique sur la santé sont complexes car les personnes sont soumises à des expositions multiples et variées qui sont fonction du temps passé à l'intérieur des locaux, à l'extérieur, du tabagisme actif ou passif, des expositions professionnelles. Si l'on connaît l'action à court terme des fortes doses de polluants pris isolément, on connaît mal les effets à long terme et les effets des associations de polluants ; Les personnes réagissent différemment à la pollution atmosphérique en fonction de leur âge et de leur état de santé (notamment respiratoire). Ce qui peut expliquer la variabilité des réponses individuelles. Les principaux effets sur la santé identifiés de nos jours sont :

→ A court terme, lors des épisodes de pollution : Les polluants peuvent provoquer une réaction inflammatoire au niveau des muqueuses respiratoires et favoriser les symptômes des problèmes respiratoires préexistants. Chez l'asthmatique, ils peuvent favoriser sa réaction allergique (aux allergènes auxquels il est déjà sensibilisé) et les manifestations d'hyperréactivité bronchique non spécifiques, provoquées en particulier par l'ozone. Les symptômes ressentis pourront alors se traduire par des rhinites, de la toux, voire une crise d'asthme.

→ A long terme : La pollution chronique favorise la poursuite et/ou l'accroissement de l'inflammation des bronches. De nombreuses études réalisées, montrent un excès de mortalité cardio-respiratoire et par cancer pulmonaire dans les villes polluées (Mehta et al., 2008; Schwartz, 2011)

I.7. Mesures internationales de lutte contre la pollution atmosphérique

En dépit de l'ancienneté du phénomène de pollution ayant pour origine l'activité humaine, la lutte contre la pollution atmosphérique n'a pu véritablement apparaître qu'à partir des années 1970. Disposant de données scientifiques certaines issues d'organisations internationales telles que l'organisation météorologique mondiale, la communauté internationale a pu mieux appréhender les mécanismes de pollution, leurs sources les plus diverses ainsi que leurs impacts sur la santé. Partant de là et compte tenu de la diffusion des

pollutions au-delà des frontières nationales, une harmonisation internationale s'est avérée indispensable.

La première convention internationale concernant la pollution de l'air a donc été signée le 13 novembre 1979 et a été élaborée dans le cadre de la Commission économique des Nations Unies. Cette convention apporte déjà une avancée appréciable puisque d'une part, elle définit la pollution atmosphérique et d'autre part, elle reconnaît et concrétise l'idée selon laquelle les émissions polluantes se propagent rapidement dans l'atmosphère et ont donc des conséquences transfrontalières comme par exemple les pluies acides. Mais le traité ne reste qu'un traité de coopération entre Etats : ceux-ci doivent s'efforcer par leurs politiques et stratégies nationales de diminuer voire de supprimer ces sources de pollution. Compte tenu de la nécessité d'échanger les informations sur les pollutions un système de surveillance et d'évaluation du transport à longue distance des polluants atmosphériques en Europe a été mis en place. La nuance réside dans le fait que cette surveillance s'applique non plus seulement à l'air mais également à l'eau, le sol ou encore la végétation.

Cette convention de Genève a connu nombre de protocoles additionnels lui permettant ainsi d'assurer plus efficacement la lutte internationale contre la pollution atmosphérique. Ces divers protocoles s'attachent plus particulièrement à envisager la réduction ou la stabilisation des émissions de tels ou tels polluants ou à en contrôler l'émission lorsque de « nouveaux » polluants apparaissent. Parmi ces protocoles on a :

Le protocole de Montréal, ratifié le 16 septembre 1987 par 181 pays visait à réduire la consommation de chlorofluorocarbures (CFC) et à geler la consommation des autres dérivés halogénés, reconnus comme principaux responsables de la destruction de la couche d'ozone en raison de leur très longue durée de vie dans l'atmosphère. Les mesures réglementaires prises dans le cadre de ce protocole et les amendements de Londres (1990), Copenhague (1992) et Vienne (1995) conduisent aujourd'hui à un ralentissement en composés organo-halogénés dans la troposphère.

Le protocole de Kyoto, pour la lutte contre le changement climatique par la réduction des émissions de gaz à effet de serre, a été négocié en 1997 puis entré en vigueur le 16 février 2005 par 175 pays. Ces derniers se sont engagés pour atteindre en 2012 un objectif de réduction de leurs émissions de gaz à effet de serre d'environ 5 % par rapport aux émissions répertoriées en 1990. Les effets positifs de ce protocole ne sont pas encore visible principalement parce que les 3 pays les plus pollueurs du monde (Etats-Unis, Chine et Inde) ne se sont pas engagés à réduire leurs émissions. Les engagements de Kyoto prendront fin début 2013.

La technique de plafonds d'émission nationaux a été introduite par le Protocole de Göteborg (Suède) du 30 novembre 1999. Il est ainsi défini pour chaque Etat et pour chaque polluant réglementé par le protocole, des plafonds d'émission. Ces plafonds établis par rapport à l'année 1990 devraient être respectés en 2010. Cette technique sera également celle utilisée pour les émissions des gaz à effet de serre.

I.8. Réglementation Sénégalaise sur la pollution de l'air

La loi N°2001-01 du 15 janvier 2001 a été votée, intégrant pour la première fois une norme (Norme Sénégalaise NS 05-060) qui fixe les exigences sur les émissions de gaz et les fumées d'échappement des véhicules terrestres à moteur. Cette norme qui ne s'applique qu'au monoxyde de carbone (CO), aux hydrocarbures (HC) et à l'opacité des fumées est relativement souple, car prenant en considération l'âge avancé du parc automobile qui avec l'usure mécanique et les technologies de fabrication obsolètes portent les émissions polluantes à des niveaux plusieurs fois supérieurs à ceux des moteurs de conception récente. Aussi, la situation anarchique dans le secteur des transports induite par la libéralisation totale de l'importation des véhicules usagés au cours de l'année 1996 et ses conséquences catastrophiques sur la santé et la sécurité des populations avaient entraîné la prise d'un décret relatif à l'importation des véhicules, cycles et cyclomoteurs usagés. Mais l'application de ce décret n'a jamais été effective eu égard à l'absence de certains préalables notamment les instruments réglementaires et techniques de normalisation sécuritaire et environnementale des véhicules; et l'existence de technologies de recyclage des déchets.

Après la Conférence des Nations Unies sur l'Environnement et le Développement (CNUED), tenue à Rio de Janeiro en juin 1992, le Sénégal comme de nombreux pays de la communauté internationale a décidé d'adopter par rapport aux problèmes environnementaux qui l'affectent, notamment la pollution de l'air, une démarche plus cohérente, inspirée par une vision s'inscrivant dans la perspective du développement durable. Par ailleurs de façon assez résolue, le pays a souscrit à une série de conventions proposées à la communauté internationale avant, pendant et après le sommet de la Terre de Rio de Janeiro. Parmi les conventions internationales en rapport avec la pollution atmosphérique que le Sénégal a ratifiées, nous pouvons citer : La Convention de Vienne et le Protocole de Montréal sur les substances appauvrissant la couche d'ozone, ratifiés en 1993 ; la Convention Cadre des Nations Unies sur les Changements Climatiques, ratifiée en 1994.

La conformité du droit national aux conventions internationales signées et ratifiées par le Sénégal a été l'un des motifs de l'adoption de la loi N° 2001-01 du 15 Janvier 2001

portant code de l'Environnement et son décret d'application. Le chapitre II du titre III de ce nouveau code de l'Environnement constitue le cadre de référence aux réglementations relatives à la pollution atmosphérique. C'est à ce titre, qu'un projet de normes réglementant la pollution atmosphérique a été élaboré par le comité technique de normalisation environnementale de l'Association Sénégalaise de Normalisation. Ainsi la norme NS 05-062, publié en octobre 2003, s'applique aux usines, ateliers, chantiers, carrières et, d'une manière générale, les installations industrielles, artisanales ou commerciales exploitées ou détenues par toute personne physique ou morale, publique ou privé, et toutes autres activités qui présentent soit des dangers pour la santé, la sécurité, la salubrité publique, l'agriculture, la nature et l'environnement en général, soit des inconvénients pour la commodité du voisinage à cause de leurs rejets de substances gazeuses et de particules atmosphériques. Elle s'appliquera également aux véhicules. Les dispositions de la Norme NS 05-060 relatives aux émissions des véhicules sont applicables dans cette norme. Cependant les nouvelles industries automobiles qui vont s'implanter sur le territoire Sénégalais devront se conformer aux normes internationales (DEEC, 2010).

I.9. Pollution atmosphériques en zone urbaine au Sénégal : Cas de Dakar

La pollution de l'air à Dakar est assez mal caractérisée. Très peu d'études ont à ce jour abordé le problème. C'est en 1998 qu'une étude de la Banque Mondiale par son programme sur l'initiative de la qualité de l'air dans les villes d'Afrique Subsaharienne a permis d'obtenir des données de certains polluants pour la région de Dakar sur la base d'un inventaire à partir de la situation du parc et de l'industrie et en utilisant des facteurs d'émission. Depuis, une étude dans le cadre de la composante « Qualité de l'Air du Programme d'Amélioration de la Mobilité Urbaine (PAMU) » financée par le Fonds Nordique de Développement (FND), a permis d'avoir des données de pollution plus précises sur la base d'un programme d'échantillonnage et d'analyses (Sivertsen et al. 2010). Cette étude menée par l'institut Norvégien de la recherche pour l'air (NILU) en collaboration avec le Conseil Exécutif des Transports Urbains de Dakar (CETUD) devrait permettre au Sénégal de disposer de valeurs standards sur le NO₂, SO₂, O₃, COV, PM₁₀ et PM_{2,5}. Ces polluants qui altèrent la qualité de l'air proviennent principalement des secteurs de l'industrie et des transports qui sont les plus grands émetteurs. Comme dans la plupart des grandes villes, le problème de fond provient de ce que les zones de résidence ne correspondent pas aux lieux de travail, entraînant chaque jour d'importants mouvements de population. Aussi, vu dans sa globalité, le problème est également lié à la question de l'urbanisme, et donc à la vision à long

terme que l'on a du développement de la ville et de ses modes de transport (Banque Mondiale, 2003). Dakar concentre plus de la moitié du parc automobile national avec par conséquent des émissions de polluants liés aux transports les plus importantes. Le parc automobile augmente rapidement et surtout dominé par les moteurs diesels notamment dans les transports en commun où le diesel représente plus de 90% du parc. A cela s'ajoutent les problèmes comme l'accroissement du transport individuel ; l'insuffisance des infrastructures, malgré les efforts de l'Etat, en particulier au niveau des intersections, qui n'arrivent pas à absorber cette augmentation du trafic (Banque Mondiale, 2003).

L'amélioration des transports en commun, la mise en place d'un code de l'environnement, le respect des normes d'émission pour les industries et l'institutionnalisation de structures de suivi de la pollution sont autant d'initiatives positives pour améliorer la qualité de l'air à Dakar. La situation actuelle montre qu'on est encore loin du compte avec la majorité des trajets motorisés à Dakar (86%) qui se font en cars rapides et des minibus à faible capacité détenue par le secteur privé. Environ 70% des véhicules de transport en commun ont plus de 10 ans et présentent des niveaux de rejet environ deux fois plus élevés que les véhicules de moins de 10 ans. En outre, 90% des bus et 33% des voitures particulières fonctionnent au diesel. Le diesel rejetant bien plus de NO_x, SO₂ et PM₁₀ que l'essence, les polluants (NO_x et SO₂) atteignent des niveaux néfastes chaque jour qui excèdent les normes de l'OMS et affectent plus d'un million de personnes. La croissance démographique soutenue dans la région de Dakar s'est avérée un élément central dans l'accentuation de la pollution urbaine. L'étroite relation entre la production de polluants et les activités de production permet d'envisager un dégagement de polluants atmosphériques plus important (Banque Mondiale, 2003).

III. Pollution particulaire

II.1. Définition

Différents termes sont utilisés pour définir les particules atmosphériques :

- les aérosols :

« Suspension dans un milieu gazeux de particules solides ou liquides présentant une vitesse de chute négligeable », selon la première définition par Schmauss en 1920 (cité par Renoux et Boulaud, 1998). L'usage a conservé le terme aérosol pour la fraction particulaire solide du mélange. Les aérosols correspondent aux plus fines particules.

- les fumées noires :

Ce sont des particules carbonées de diamètre compris entre 0,1 et 0,5 μm , et qui se composent principalement de suies provenant des processus de combustion.

- les poussières :

Cette définition recouvre une multitude de types de particules dont les dimensions varient entre 0,001 et 100 μm (Renoux et Boulaud, 1998). Les plus grosses d'entre elles sédimentent près de leur source d'émission.

II.2. Origine des Particules

Les particules atmosphériques peuvent être réparties en deux catégories : les particules primaires et les particules secondaires.

Les particules primaires sont des particules émises directement dans l'atmosphère. Les sources peuvent être naturelles avec l'érosion éolienne, les volcans, les débris d'origine végétale, les particules d'origine marine. Les sources anthropiques sont principalement l'industrie, le transport, les combustions, les incinérations d'ordures ménagères.

Les particules secondaires résultent de phénomènes de nucléation et de condensation. C'est le cas de la plupart des hydrométéores (nuages, brouillards, brunes...) qui sont formés à partir de la conversion gaz liquide des molécules d'eau. La nucléation est un processus permettant de générer, à partir d'une phase thermodynamiquement instable, des fragments d'une nouvelle phase plus stable (liquide ou solide). Ainsi, les particules atmosphériques constituent un ensemble très hétérogène dont les caractéristiques physico-chimiques et/ou biologiques sont influencées par leurs sources d'émission (particules primaires) ou par leur processus de formation dans l'atmosphère (particules secondaires) mais aussi par la poussière du sol.

Les particules atmosphériques sont discriminées les unes des autres principalement par leur diamètre aérodynamique de l'anglais « Particulate Matter ou PM ». On distingue donc quatre classes :

- les grosses particules dont le diamètre aérodynamique est supérieur à 2,5 μm
- les particules fines (0,1-2,5 μm)
- les particules ultrafines (0,01-0,1 μm)
- les nanoparticules (<0,01 μm)

Les particules fines et ultrafines ne représentent qu'une faible partie de la masse de particules alors qu'elles sont de loin les plus répandues dans l'atmosphère. Les grosses particules, quant à elles, contribuent fortement à la masse des particules, mais leur nombre, comparé à celui des fines, est très petit.

II.3. Processus de formation des aérosols

Ces aérosols, autrefois formés principalement à partir des rejets d'origine industrielle et des processus de combustion incomplète du charbon sont, de nos jours, majorés par des émissions liées au trafic automobile en milieu urbain et peuvent atteindre entre 20 et 50% pour les PM_{2,5} (Guo et al., 2009).

Les sources naturelles potentielles sont les pollens, les embruns, l'érosion éolienne, les volcans. Les particules formées par abrasion ou qui s'élèvent dans l'air par action du vent sont en général de taille supérieure à 1-2µm.

Les particules de grandeur moyenne (0,1-2,5µm) proviennent en majorité de la conversion gaz-particules à partir des précurseurs SO₂, NO_x, NH₃, COV. Les phénomènes qui influencent la taille des particules comprennent la nucléation, la condensation (augmentation de la taille des particules mais pas de leur nombre), la volatilisation (par opposition à la condensation), la coagulation (diminution du nombre de particules mais pas de changement de masse), les émissions qui injectent de nouvelles particules dans l'atmosphère et les dépôts qui les retirent de l'atmosphère.

II.4. Devenir des particules dans l'atmosphère

Les particules en suspension formées directement ou résultant d'une conversion gaz-particule évoluent dans l'atmosphère. Cette évolution dépend d'une part de leur granulométrie, de leur nature chimique et de leur concentration, mais également des conditions météorologiques. Il apparaît clairement que les particules de grosse taille sédimentent alors que les plus fines peuvent être dispersées sur de longues distances tout en restant suspendues dans l'atmosphère pendant une longue durée. Ainsi, les particules dont le diamètre est supérieur à 10µm, ne sont plus forcément considérées comme des particules en suspension car elle sédimentent rapidement sous l'effet de la pesanteur. Les particules ultrafines (< 0,1µm) ont une forte vitesse de diffusion et coagulent en l'espace de quelques heures avec les particules plus grandes, ou grandissent par condensation. Les particules fines peuvent rester plusieurs jours dans l'air et être ainsi transportées plus ou moins loin. Leur élimination de l'atmosphère se fait par lessivage grâce aux précipitations, mais aussi par impaction.

II.5. Caractéristiques physico-chimiques des particules atmosphériques

Les propriétés physiques les plus importantes des particules incluent : la masse, le nombre, la surface spécifique, la forme, l'hygroscopicité, la volatilité et la charge électrique. Chacune de ces caractéristiques affecte la dynamique des particules et ainsi leur comportement et leur devenir dans l'air et dans l'appareil respiratoire de l'homme (Aymoz, 2005 ; Le Floch, 2004). Par ailleurs, les compositions chimiques ainsi que la spéciation conditionnent étroitement la toxicité des aérosols. Ces derniers constituent un ensemble très hétérogène dont les propriétés physico-chimiques dépendent de leurs sources d'émission pour les particules primaires ou de leur processus de formation dans l'atmosphère pour les particules secondaires. En outre, les caractéristiques de ces aérosols (composition chimique, spéciation, porosité, etc.) évoluent au cours du temps et de leur transport : elles s'avèrent ainsi être étroitement liées à la situation géographique et aux conditions météorologiques (Buschini et al., 2001). L'évaluation de l'impact de ces aérosols sur la santé de l'homme se doit, en premier lieu, d'intégrer certaines de leurs caractéristiques physico-chimiques, telles que la granulométrie, la composition chimique, la spéciation, l'aire spécifique et la porosité.

II.5.1. Propriétés physiques des aérosols atmosphériques

Les propriétés physiques notables des particules incluent : la granulométrie, la surface spécifique, la masse, la forme, l'hygroscopicité, la volatilité et la charge électrique. Parmi ces propriétés, la granulométrie, la surface spécifique et la spéciation chimique apparaissent particulièrement importantes.

a. Granulométrie

La pollution de l'air engendre des particules de taille extrêmement diverses. Les plus petites, avec un diamètre inférieur à 5 nm, ne contiennent qu'une dizaine de molécules. Les particules comprises entre 3 et 50 nm sont très abondantes en milieu urbain du fait des émissions automobiles. La taille des particules atmosphériques peut atteindre 100 µm même si les particules de diamètre aérodynamique inférieur à 10µm (PM₁₀) représentent la classe majoritaire.

Whitby et Cantrell (1976) ont décrit la distribution en taille de l'aérosol selon trois modes granulométriques représentatifs de processus de genèse physico-chimiques particuliers (Figure I-1) :

- Le mode « nucléation » correspond à des particules de diamètre inférieur à 0,04µm. Cette fraction correspond aux noyaux d'Aitken. Dans ce mode, on trouve les

particules primaires de condensation et les noyaux provenant de la nucléation homogène, c'est à dire la conversion gaz-particules sans intervention de corps étrangers (poussières, ions, etc.). En zone polluée, le nombre de ces particules peut être élevé même s'il ne représente qu'une faible masse du spectre global.

- Le mode « accumulation » est constitué par les particules dont le diamètre moyen est compris entre 0,04 et 2 μm . Ce mode comprend les particules provenant de la coagulation de particules du mode « nucléation » ainsi que les noyaux ayant grossi par condensation hétérogène. Le nombre et la masse des particules de cette fraction peuvent représenter une fraction significative de l'aérosol atmosphérique.

- Le mode « grosses particules » comprend les particules ayant un diamètre supérieur à 2 μm . Ces particules sont formées essentiellement par des processus mécaniques (frottements, embruns, érosion des sols, etc.).

Le diamètre aérodynamique (D_{ae}) des particules détermine leur degré de pénétration et de rétention dans les poumons (impaction, sédimentation et diffusion) (Harrison and Yin, 2000). En raison de leur inertie, environ 50 % des particules de D_{ae} supérieur à 10 μm sont précipitées sur la muqueuse de l'oropharynx puis dégluties. En revanche, pour celles dont le D_{ae} est inférieur à 10 μm , l'inhalation constitue la principale voie d'exposition. En particulier, les particules dont le D_{ae} est compris entre 2,5 et 10 μm pénètrent dans l'arbre trachéo-bronchique et atteignent les bronchioles terminales. Les particules fines, dont le D_{ae} est inférieur à 2,5 μm , sont retrouvées en grand nombre dans les alvéoles. Le taux de déposition dans l'étage alvéolo-interstitiel est maximum (de l'ordre de 30 à 50 %) pour les particules ultrafines ($D_{ae} \leq 0,1 \mu\text{m}$) et s'avère être non négligeable (de l'ordre de 20 %) pour les particules fines.

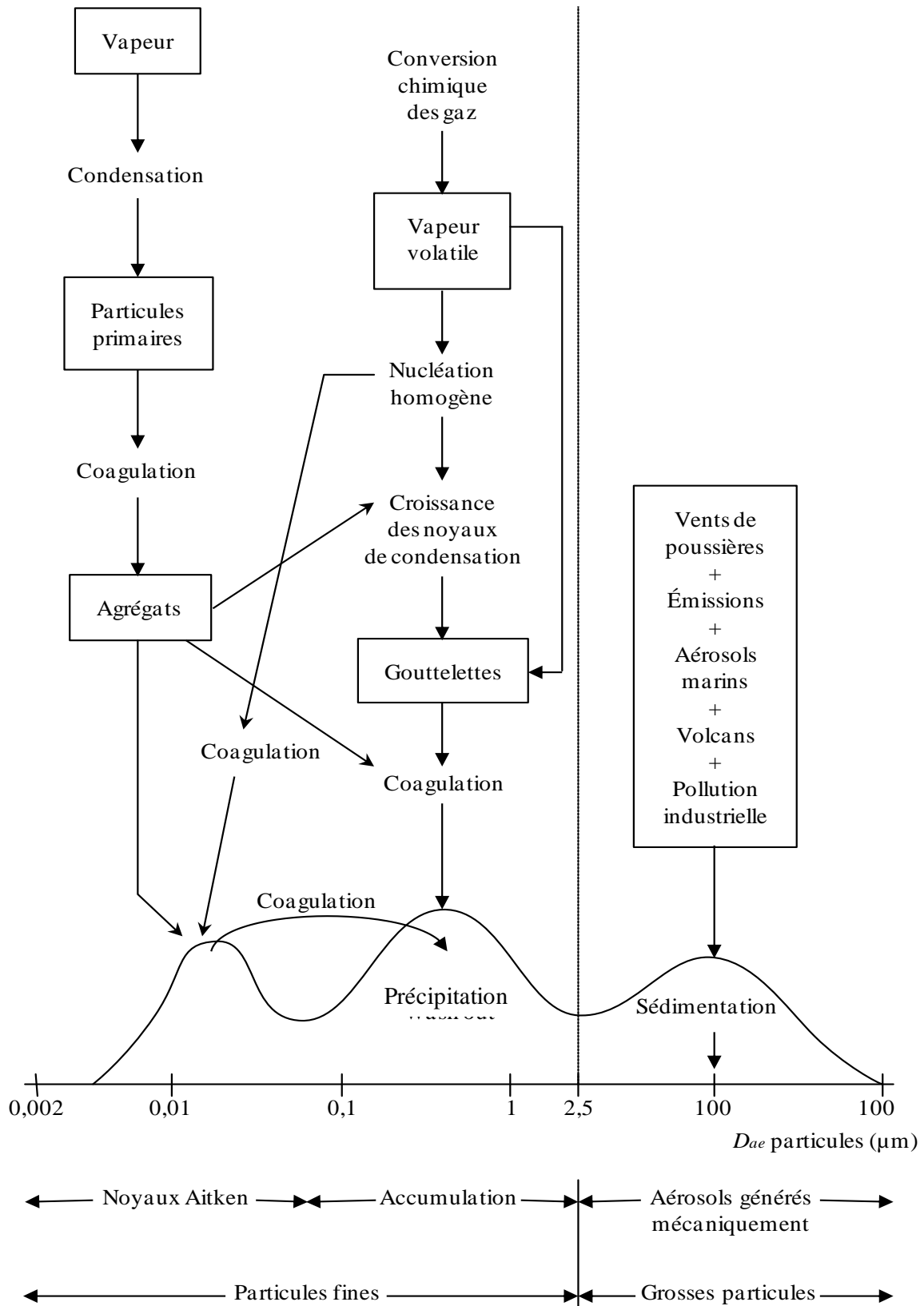


Figure I-1 : Schématisation des sources, des modes de formation et des modes de dépôt des aérosols atmosphériques selon leur taille (Whitby et Cantrell, 1976)

b. Surface spécifique et porosité

Quelles que soient leur composition chimique, les particules solides peuvent être caractérisées selon leurs propriétés texturales :

- la surface spécifique (m^2 / g),
- le volume poreux spécifique (cm^3 / g) et la porosité,
- la forme des pores,
- la répartition poreuse ou la distribution des volumes poreux en fonction de la taille des pores.

La surface spécifique représente la surface totale par unité de masse d'un solide divisé, c'est à dire, d'une part, la surface géométrique des grains, fonction de la distribution granulométrique et de leur forme, et d'autre part, la surface développée par les parois des pores. Il s'agit donc de considérer toute la surface de chaque particule, porosité ouverte comprise. Elle est mesurée à partir de la quantité de molécules de gaz (N_2 , CO_2 ou Kr) pouvant être adsorbée à la surface du solide.

La porosité est fonction des vides créés par l'arrangement des atomes (i.e. porosité intragranulaire) et des espaces vides générés par l'assemblage des grains (i.e. porosité intergranulaire). Suivant la taille des pores, les micropores (pores $< 2 \text{ nm}$) seront distingués des mésopores ($2 \text{ nm} < \text{pores} < 50 \text{ nm}$) et des macropores (pores $> 50 \text{ nm}$).

A l'interface solide-gaz, les molécules provenant de la phase gazeuse peuvent soit rebondir sur la surface du solide, soit se fixer pendant un temps plus ou moins long, entraînant une surconcentration à la surface du solide. Ce dernier cas correspond au phénomène d'adsorption. Suivant la nature et l'intensité des forces de liaisons mises en jeu, on distingue l'adsorption physique et l'adsorption chimique. Dans l'atmosphère, les particules industrielles à base d'oxydes métalliques sont généralement non poreuses, en particulier si elles ont subi un traitement thermique important. Au contraire, les particules de Dae inférieur à $1 \mu\text{m}$ possèdent une surface spécifique élevée. Pour cette raison, elles peuvent constituer des entités sur lesquelles des molécules gazeuses telles que les COV, les NO_x et les oxydes de soufre pourront s'adsorber. Par ailleurs, les suies possèdent une structure microporeuse et mésoporeuse qui contribue à l'aire spécifique totale, celle-ci pouvant dépasser $100 \text{ m}^2 / \text{g}$ (Rockne et al., 2000). Ces particules sont susceptibles de présenter un nombre élevé de sites de sorption pour différents composés organiques gazeux présents dans la troposphère, tels que les COV, les HAP légers, les PCDD-F et les PCB

La surface spécifique et la porosité des aérosols sont des caractéristiques qui reflètent la possibilité des particules d'adsorber des composés organiques à leur surface. Elles

conditionnent à la fois la pénétration, la rétention et l'excrétion dans le tractus respiratoire de ces composés, et, sont donc responsables de leurs effets sanitaires.

II.5.2. Propriétés chimiques des aérosols atmosphériques

a. Propriétés chimiques

Considérés isolément, ils représentent au moins 1 % de la masse des particules collectées. Ils se retrouvent dans la majorité des prélèvements urbains effectués dans le monde, même si leurs concentrations respectives peuvent fortement varier.

- Sulfates : SO_4^{2-}

Ils sont majoritairement issus de l'oxydation atmosphérique du SO_2 . Cette transformation chimique étant lente, les différences significatives de concentrations en sulfates n'apparaissent qu'à partir de plusieurs centaines de kilomètres, même si de légères augmentations locales sont parfois observées (APEG, 1999). Toutefois, à l'échelle d'un continent, les différences peuvent devenir très importantes (QUARG, 1996).

Les teneurs atmosphériques moyennes en sulfates tendent à diminuer en conséquence de l'utilisation de procédés de filtration des émissions plus performants et de combustibles à basse voire très basse teneur en soufre.

- Nitrates : NO_3^-

Les nitrates sont formés par oxydation des oxydes d'azote NO_2 et N_2O_5 . Sa forme majoritaire, le nitrate d'ammonium (NH_4^+ , NO_3^-), semble être en équilibre avec l'ammoniac (NH_3) et l'acide nitrique (HNO_3) (Harrison et Msibi, 1994). Son autre forme prédominante est le nitrate de sodium (Na^+ , NO_3^-) par réaction avec les sels marins (Na^+ , Cl^-).

Comme le NO_2 s'oxyde plus vite que le SO_2 , et du fait de la sensibilité du nitrate d'ammonium aux concentrations ambiantes d'ammoniac qui influent sur sa dissociation, la répartition géographique des concentrations en nitrate sera bien moins homogène que pour le sulfate.

- Ammonium : NH_4^+

Les sulfates et nitrates formés dans l'atmosphère le sont initialement sous forme acide, sulfurique (H_2SO_4) et nitrique (HNO_3) respectivement. Ils sont ensuite neutralisés par l'ammoniac atmosphérique pour former des sels d'ammonium : NH_4HSO_4 et $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pour les sulfates et NH_4NO_3 pour les nitrates (Harrison et Kitto, 1992).

- Chlorures : Cl⁻

Principalement émis au niveau de la mer, sous forme de cristaux de sels (Na⁺, Cl⁻), il se retrouve à des centaines de kilomètres des côtes. Dans les pays tempérés, en hiver, une quantité non négligeable de Cl⁻ provient du déneigement des routes par salage. Enfin, les chlorures sont présents suite à la neutralisation par l'ammoniac des vapeurs d'acide chlorhydrique émises par les incinérateurs et les centrales énergétiques.

- Carbone élémentaire et organique : C

Les processus de combustion de matière organique et notamment le trafic routier et les feux de forêt, émettent des cendres volantes ainsi que des particules de suies contenant un noyau de noir de carbone élémentaire à la surface duquel se condensent des composés organiques semi-volatils issus des gaz d'échappement (Amann et Siegla, 1982). Parmi ceux-ci, les HAP sont les composés organiques les plus fréquemment caractérisés, notamment plusieurs substances cancérigènes connues. Sur la liste non exhaustive des composés régulièrement identifiés figurent le naphthalène, le pyrène, le benzo(a)anthracène, le benzo(k)fluoranthène, le benzo[a]pyrène, le benzo[b]fluoranthène, l'indéno[1,2,3-*cd*]pyrène, le dibenzo[*ah*]anthracène, ou encore le benzo[*ghi*]pérylène (Finlayson-Pitts and Pitts, 1997; Baulig et al., 2004). Ces composés sont regroupés sous le nom de composés organiques semi-volatils (COSV) incluant les HAP les pesticides, les phtalates...

En outre, plusieurs dérivés nitrés des HAP peuvent aussi être au sein de particules issues de combustions ou lors d'analyses de la fraction gazeuse ambiante (Atkinson and Arey, 1994; Westerholm and Egebäck, 1994; Finlayson-Pitts and Pitts, 1997). A cette première fraction adsorbée s'ajoutent ensuite des composés organiques plus volatils (COV), qu'ils soient primaires ou issus de réactions photochimiques (Bowman et al., 1997). Plus de 200 composés ont ainsi déjà été retrouvés dans des analyses de particules atmosphériques. Parmi ceux-ci, plusieurs familles peuvent être distinguées : les alcanes, les alcènes, les composés aromatiques, les aldéhydes, les cétones et quinones, les acides carboxyliques ou encore les composés aminés (Seinfeld et Pandis, 2006).

Les capacités d'adsorption étant directement reliées à la surface spécifique disponible, les particules les plus petites présentent généralement la fraction organique la plus importante (Ravindra et al., 2001; de Kok et al., 2006). Des teneurs en HAP sensiblement plus fortes ont d'ailleurs été déterminées dans des particules ultrafines par rapport aux fractions fines et grossières d'un aérosol collecté à Los Angeles (Li et al., 2003). Cette étude a de plus

montré que la densité urbaine n'avait une influence significative que sur les teneurs en HAP des particules ultrafines, plus « chargées » en milieu très peuplé. Aucune différence n'a pu être constatée au niveau des particules plus grosses.

- Éléments terrigènes :

Les poussières de la croûte terrestre et les minéraux arrachés par le vent aux roches présentent une grande diversité car ils dépendent de la géologie locale. Leurs concentrations varient en fonction du climat. La mise en suspension de ces particules est maximale par temps sec accompagné de vents importants mais aussi par passage de véhicules ou de troupeaux d'animaux en milieu rural. Leur origine mécanique leur confère une taille relativement importante. Elles feront donc partie des particules grossières (PM_{2,5-10}) (Harrison et al., 1997).

- Fraction biologique :

La végétation, qui couvre les deux tiers de la surface continentale, apparaît depuis longtemps comme une source majeure de particules organiques, tant primaires que secondaires. Les forêts sont les sources majoritaires de ces émissions (Cachier et al., 1985).

Souvent prise en compte dans les analyses physico-chimiques en tant que carbone organique, cette fraction biologique présente une hétérogénéité considérable. Elle comprend de petits organismes comme les bactéries, des spores, des pollens, des fragments celluloseux de plantes, des algues, des protozoaires, des champignons, mais aussi des excréments et fragments d'insectes.

Les mécanismes mis en jeu lors de ces émissions ne sont toujours pas complètement établis, même s'ils sont souvent corrélés à des facteurs météorologiques (Jones and Harrison, 2004). Ils incluent probablement l'abrasion éolienne, l'activité biologique des micro-organismes à la surface des plantes et au sein de la litière, ainsi que les processus physiologiques des végétaux tels que la transpiration et la guttation. Ces processus peuvent produire des particules contenant des éléments biogéniques tels que le sodium (Na), le magnésium (Mg), le phosphore (P), le soufre (S), le potassium (K), le calcium (Ca), le zinc (Zn) et le rubidium (Rb) (Beauford et al., 1977). En outre, une fraction significative de l'aérosol est composée de particules biogéniques secondaires, formées par la conversion gaz-particule des gaz organiques biogéniques.

A l'exception des virus, ce matériel biologique, de par sa granulométrie relativement conséquente, fait partie des particules grossières.

Les concentrations des aérosols atmosphériques en ces composés majeurs peuvent substantiellement varier pour des raisons de localisation géographique, mais aussi pour un grand nombre de causes. Au premier rang de celles-ci, le facteur climatique tient un rôle important en influant fortement sur les teneurs des éléments terrigènes. Evidemment, la localisation des sources de polluants est, elle aussi, prépondérante. Ainsi, les sulfates qui dépendent des émissions de SO₂ seront plus concentrés dans les régions de production d'électricité à base d'énergies fossiles que les nitrates produits à partir des oxydes d'azote émis par le trafic routier. L'agriculture intensive, responsable d'émissions considérables d'ammoniac, va fixer les nitrates au sein des particules alors qu'en cas de faibles concentrations d'ammoniac, le nitrate d'ammonium sera peu stable.

b. Les éléments traces

La classification parmi les éléments traces des fractions particulières présentées ci-après ne peut être absolue. En effet, dans certaines situations locales, telles que la présence d'industries lourdes ou d'unités d'incinération d'ordures ménagères, les concentrations atmosphériques de ces éléments peuvent considérablement s'accroître.

- Les Métaux

Certains métaux, tels que le plomb, le cadmium ou le mercure sont connus depuis longtemps pour leur extrême toxicité. Toutefois, leurs concentrations dans les particules atmosphériques sont insuffisantes pour déclencher ces effets toxiques « classiques » (Department of Health, 1995). Par contre, les métaux de transition et plus particulièrement le fer peuvent initier des mécanismes d'action « non-classiques » en contribuant à la production d'Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) par l'intermédiaire de la réaction de Fenton (Gilmour et al., 1996; Borm et al., 2007; Vidrio et al., 2009).

La majorité des émissions de métaux concerne les industries, d'où une répartition géographique totalement hétérogène qui peut parfois leur conférer le statut de composants majeurs. La suppression du plomb dans les carburants a entraîné une diminution des teneurs moyennes atmosphériques de cet élément dans l'ensemble des agglomérations non industrielles des pays développés mais aussi des pays en développement où l'utilisation de l'essence sans plomb est effective.

Une caractéristique importante à étudier concernant la plupart des métaux est leur spéciation chimique, qui conditionne leur biodisponibilité et donc leur potentiel à participer à des réactions spécifiques dont celles de Fenton. Il faut enfin noter que cette spéciation dépend

de la source d'émission et que la simple mesure de la concentration élémentaire ne suffit pas à définir ses effets délétères potentiels.

- Acides forts :

Nous avons précédemment vu que, dans l'atmosphère, les nitrates et sulfates se forment à partir de leurs acides correspondants. L'acide nitrique est un gaz : il ne pourra donc être incorporé aux particules atmosphériques que suite à des réactions chimiques. Ainsi, il réagira avec des particules de sels marins en donnant du nitrate de sodium ou avec l'ammoniac pour former du nitrate d'ammonium (Harrison et Allen, 1990).

L'acide sulfurique, quant à lui, n'est pas volatil. Il s'incorpore donc très vite aux particules atmosphériques pour être le plus souvent neutralisé par l'ammoniac. C'est pour cette raison qu'en cas de concentrations atmosphériques limitées en ammoniac, les particules peuvent présenter des teneurs en acide sulfurique non négligeables.

Toutefois, l'analyse chimique de l'acidité d'un aérosol atmosphérique reste délicate, et n'a été menée que dans peu d'études. Nous observons tout de même d'importantes variations de la composition acide selon le lieu de prélèvement, en corrélation avec les concentrations de l'ammoniac atmosphérique.

- Les dioxines :

Le terme générique « dioxines » désigne deux familles de composés aromatiques tricycliques halogénés: les PolyChloroDibenzo-*p*-Dioxines (PCDD) et les PolyChloroDibenzoFuranes (PCDF). Les PCDD sont constitués de deux noyaux benzéniques interconnectés par deux atomes d'oxygène tandis que les PCDF se différencient des PCDD par la présence d'un seul atome d'oxygène dans le cycle central (**Figure I-2**). Le contenu en chlore de ces molécules peut varier de 1 à 8 atomes. Il existe donc un grand nombre de congénères en fonction des atomes de chlore et de leurs positions (i.e. 75 PCDD et 135 PCDF). Toutefois, seuls 17 congénères sont considérés comme toxiques. Ils sont caractérisés par un minimum de quatre atomes de chlore en position 2, 3, 7 et 8. Le plus toxique est la 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxine (2,3,7,8-TCDD) aussi appelée « dioxine de Seveso ».

Les PCDD et PCDF sont des composés peu ou non polaires, extrêmement lipophiles (i.e. coefficients de partage octanol-eau, Kow, élevés). Ils sont chimiquement très stables, même en milieu acide, et se décomposent thermiquement à des températures de l'ordre de 800 à 1 000°C. Le caractère lipophile de ces composés augmente avec le nombre d'atomes de chlore alors que leur volatilité, elle, décroît. De plus, ces molécules présentent une forte

tendance à s'adsorber à la surface des particules atmosphériques, même si leur quantification est rarement réalisée en raison de la complexité matricielle (Aristizábal et al., 2011)

Les PCDD et PCDF ne sont pas des produits de synthèse volontaire et n'ont jamais présenté une quelconque utilité. Ces composés sont libérés dans l'environnement à très faibles doses à partir de divers processus anthropogéniques. Il existe deux voies de synthèse des dioxines et furanes, dont la synthèse par des précurseurs, mais la synthèse *de novo* est actuellement fortement majoritaire. Cette dernière décrit la formation de dioxines, comme étant le produit de réactions secondaires entre le carbone et l'oxygène en présence de chlore et d'un catalyseur à des températures de l'ordre de 350°C. Cette voie de synthèse concerne tous les procédés faisant intervenir une étape de combustion tels que l'incinération des déchets ménagers et hospitaliers, la production d'acier, la combustion d'énergies fossiles, le chauffage au bois traité, la production d'électricité et la fumée de tabac, mais aussi des causes naturelles, comme les feux de forêt et les éruptions volcaniques.

- Les Polychlorobiphényles :

La classe des PolyChloroBiphényles (PCB) comporte 102 congénères. Les PCB sont constitués de deux noyaux benzéniques liés par une liaison covalente C-C. Bien qu'ils soient des hydrocarbures chlorés, les PCB ne sont pas des pesticides. Toutefois, en raison de leur utilisation importante et de leur résistance à la dégradation, ils constituent l'une des familles de composés organochlorés les plus présentes dans l'environnement. Ceci entraîne une contamination non négligeable des chaînes alimentaires. Les PCB sont en effet extrêmement lipophiles et très peu hydrosolubles.

Leurs propriétés de résistance thermique les ont notamment conduit à de nombreuses utilisations industrielles telles que la fabrication de plastiques, de peintures, de vernis, d'asphaltes, de gommes. Ces composés étaient aussi très employés en tant que retardateur de flamme, d'huile de lubrification, et dans les transformateurs électriques jusqu'à leur interdiction, à cause de leur toxicité, dans les pays développés, comme les Etats-Unis d'Amérique en 1976.

Le compartiment de dispersion le plus efficace des PCB est l'atmosphère. Toutefois, c'est en milieu aquatique qu'il subit la plus intense bioaccumulation. La voie majeure d'exposition de l'homme aux PCB est la consommation de produits de la mer, et ce même dans les zones particulièrement industrialisées (Yu, 2001).

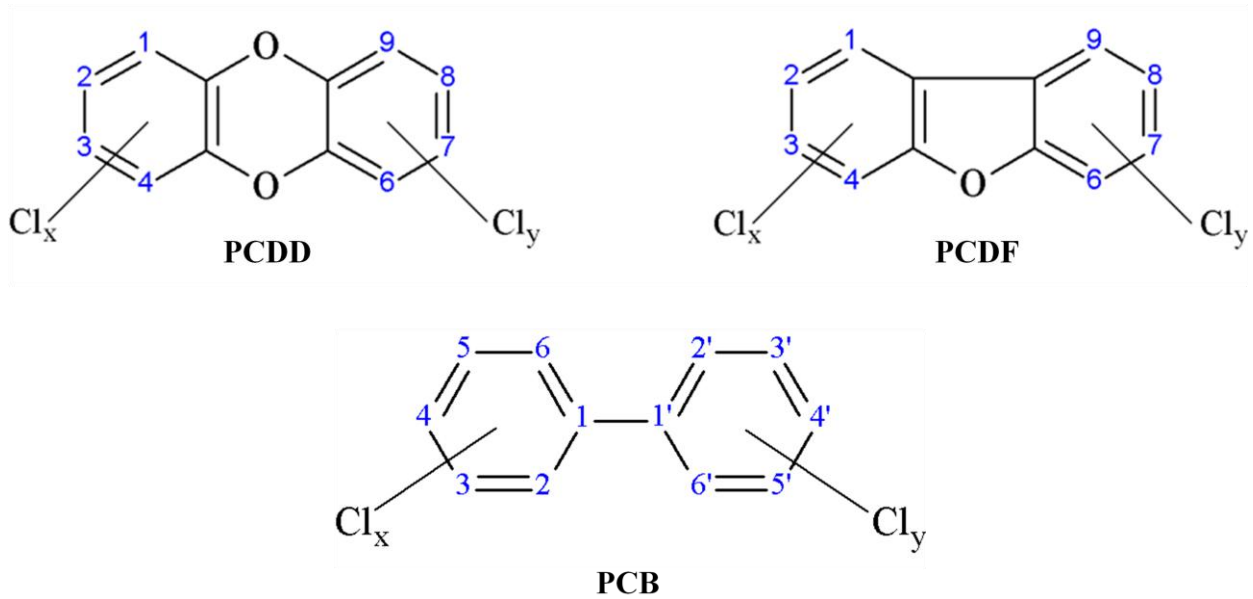


Figure I-2 : Structure chimique des composés organiques polychlorés

c. Spéciation chimique

La notion classique de spéciation qui prend en compte l'état physique de l'espèce chimique concernée, ses propriétés physico-chimiques et sa réactivité, est élargie en toxicochimie par le concept de spéciation chimique dynamique. Ce concept prend également en considération l'évolution des propriétés du xénobiotique dans les milieux et les matrices biologiques (Yokel et al., 2006; Gundacker et al., 2010). Les aérosols atmosphériques forment des entités complexes au sein desquelles la nature mais également la forme chimique des constituants, et notamment la fraction métallique, doivent être étudiées au cours de l'évaluation de leur impact toxicologique. La spéciation chimique module les conséquences physiopathologiques liées à la présence d'un élément dans l'organisme. Par exemple, lors de l'exposition *in vitro* de cellules épithéliales de trachées de lapin à des particules singulièrement riches en fer, les atteintes oxydantes, telles que la peroxydation lipidique et l'activation des enzymes antioxydantes, augmentent en présence de némalite ou de chrysotile (Fe^{2+}), alors qu'elles ne sont pas modifiées en présence d'hématite (Fe^{3+}) (Guilianelli et al., 1996). La détermination de la spéciation des éléments chimiques des aérosols s'avèrent donc un pré-requis indispensable à l'évaluation du risque posé par l'exposition à ces aérosols.

Selon un consensus scientifique, la spéciation recouvre les différents états séparables et les formes identifiables que peut prendre un élément chimique (Nieboer et al., 1999; Yokel et al., 2006). Ces aspects concernent tout autant les états chimique et morphologique du composé que son état physique. En effet, il est avéré que ce dernier peut modifier la voie

d'exposition de l'organisme au xénobiotique, l'absorption, ainsi que les conséquences toxicodynamiques de celui-ci. La spéciation doit permettre de décrire les comportements chimique et physique d'une substance chimique dans les systèmes biogéochimiques (Evans, 2003). La spéciation chimique est définie par plusieurs variables dont les plus importantes sont :

- La valence déterminée par le nombre d'électrons périphériques que l'atome perd ou gagne en s'engageant avec un autre atome. De nombreux métaux possèdent plus d'un état de valence possible dans les conditions physiologiques.
- L'isotope (les isotopes d'un élément possèdent le même nombre de protons mais diffèrent par leur nombre de neutrons.
- Le ligand qui est associé au métal.
- La taille de la particule. Cette dimension influence la distribution, notamment au niveau pulmonaire, ainsi que le taux de solubilité. C'est pour cela, que ce paramètre est généralement considéré comme un facteur important de la spéciation des métaux.

II.6. Valeurs guides Sénégalaises et internationales des PM atmosphériques et PM_{2,5}

Les normes de concentrations ambiantes de particules sont établies en $\mu\text{g}/\text{m}^3$ et ne sont pas universelles. Elles peuvent varier selon le pays, et ainsi être plus ou moins strictes. Ainsi au Sénégal les valeurs limites journalière et annuelle de PM₁₀ sont respectivement 260 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ et 80 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (Norme Sénégalaise NS 05-065 de Octobre 2003). Le Sénégal ne dispose pas à l'heure actuelle de norme pour les PM_{2,5}. Ces valeurs sont plus élevées que celles de l'OMS et des pays développés comme la France et les Etats-Unis. Les valeurs guides de l'OMS, pour les PM₁₀ sont 20 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en moyenne annuelle et 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en moyenne journalière. Pour les PM_{2,5} l'OMS a fixé des valeurs guides annuelle et journalière respectivement à 10 et 25 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. En France, les valeurs limites annuelles PM₁₀ et PM_{2,5} sont respectivement 40 et 25 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. Les Etats-Unis disposent d'une norme qualité de l'air récente (NAAQS pour National Ambient air Quality Standards) règlementant à la fois les PM₁₀ et PM_{2,5}. Cette norme donne des objectifs de qualité de l'air des concentrations moyennes annuelles de 50 et 15 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ respectivement pour PM₁₀ et PM_{2,5} et un seul jour de dépassement de la valeur 150 et 65 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ respectivement pour PM₁₀ et PM_{2,5}. L'inclusion d'une réglementation des PM_{2,5} résulte des résultats des études épidémiologiques mettant en cause les PM_{2,5} dans l'augmentation du mortalité et de morbidité. Il est donc important pour le Sénégal d'établir une norme pour les PM_{2,5} puisque le contexte local, comme nous l'avons

décrit dans l'exemple de la pollution de Dakar, favoriserait l'apparition des pathologies respiratoires liées à l'exposition aux PM_{2,5}.

III. Effets de la pollution particulaire sur la santé humaine

L'impact de la pollution particulaire sur la santé humaine a fait l'objet de nombreuses études épidémiologiques au cours des dernières années. Cependant les résultats obtenus sont souvent difficilement interprétables voire contradictoires en raison de la complexité de l'exposition et des nombreux facteurs de confusion potentiels, d'établir une relation causale claire entre un polluant déterminé à une concentration donnée et un effet sanitaire. D'où l'intérêt de réaliser des études expérimentales afin de conforter les observations réalisées chez l'homme.

III-1. Cible principale des particules en suspension : l'appareil respiratoire

Les polluants atmosphériques sont en contact direct avec l'appareil respiratoire. En effet, l'homme respire en moyenne 15 m³ d'air par jour et la zone d'échange gazeux de l'appareil respiratoire représente une superficie pouvant atteindre 100 m². Le poumon constitue ainsi l'interface la plus importante entre le milieu extérieur et l'organisme, ce qui, par son rôle dans l'oxygénation des différents tissus, lui confère un intérêt particulier en toxicologie. Il est une cible privilégiée pour les différents agents toxiques et polluants susceptibles de se trouver dans l'air que nous respirons comme les bactéries mais aussi des composés gazeux et particulaires.

III-1-1. Notion de cytophysiologie de l'appareil respiratoire

L'appareil respiratoire est un organe complexe dont la principale fonction est d'assurer l'échange, au niveau des alvéoles pulmonaires, entre l'air et le sang, du gaz carbonique contre l'oxygène. Il est constitué de deux régions fonctionnelles distinctes : les voies aériennes supérieures et les voies aériennes inférieures (**Figure I-3**).

Les voies aériennes supérieures sont constituées par les voies de conduction, localisées dans la région extra-pulmonaire. Elles comprennent :

- Fosses nasales : épithélium olfactif dont le rôle est la perception des odeurs, associé à un épithélium respiratoire, cylindrique, cilié, pseudo stratifié dont la fonction est de réchauffer, humidifier et filtrer l'air inspiré grâce à un réseau très dense de capillaires sanguins.

- Pharynx : épithélium squameux stratifié non kératinisé, participant à la respiration et à la digestion.
- Larynx : épithélium pluristratifié squameux au niveau des cordes vocales, et épithélium de type respiratoire, où les cellules ciliées battent vers la bouche pour écarter des poumons les particules, les bactéries et le mucus.
- Trachée : tube flexible, long de 11 cm et large de 2 cm chez l'Homme, qui amène l'air aux voies aériennes inférieures. Maintenu béant par des anneaux incomplets de cartilage, la trachée est composée d'un épithélium de type respiratoire renfermant de très nombreuses cellules caliciformes et reposant sur une lame basale d'une épaisseur inhabituelle. Sa surface est humidifiée par des sécrétions muqueuses et séreuses. Le liquide sécrété, qui contient des anticorps de type IgA, intervient comme agent protecteur contre les infections. Les battements ciliaires font remonter le film muqueux vers le larynx; ce film englobe des particules étrangères contenues dans l'air inspiré qui n'auraient pas été retenues en amont.

Les voies aériennes inférieures comprennent les voies de conduction de l'air situées dans la région intra-pulmonaire. Ces voies de conduction de l'air comprennent les bronches dont les parois contiennent du cartilage et des glandes séromuqueuses et bronchioles qui en sont dépourvues. La fonction de clairance de l'arbre trachéobronchique est un processus physiologique de première importance dans la protection des poumons contre les agressions extérieures. Elle est assurée par un épithélium mucociliaire pseudostratifié constitué de trois types de cellules : les cellules sécrétrices, notamment les cellules à mucus et les glandes séreuses, les cellules ciliées et les cellules basales. Le mucus est composé de deux phases : une couche superficielle épaisse de viscosité élevée et une couche sous-jacente, le liquide périciliaire, dont la fluidité permet le battement ciliaire et le déplacement du mucus sécrété dans un sens rétrograde afin d'assurer la remontée des particules déposées dans les voies aériennes et leur élimination (Jaurand et al., 1995). Au niveau des bronchioles l'épithélium devient simple et les cellules presque cubiques. Les cellules muqueuses sont remplacées par un autre type de cellules sécrétrices, les cellules de Clara et les cellules neuroendocriniennes ; les glandes séro-muqueuses sont absentes. Les cellules de Clara sont considérées comme étant les précurseurs des adénocarcinomes du poumon chez l'Homme (Herrera et al., 1983; Linnoila et al., 1992; Takezawa et al., 2002). En effet, leur activité enzymatique, et notamment leur système de monooxygénases à cytochrome-P450 (CYP), permet la métabolisation d'une vaste gamme de xénobiotiques, et entraîne ainsi la libération de métabolites réactifs potentiellement toxiques (Hukkanen et al., 2002; Bernauer et al., 2006;

Chang et al., 2006). Enfin, une autre fonction des cellules de Clara est la synthèse de protéines spécifiques (Clara cell specific protein, CCSP) capables d'inhiber la phospholipase A2, impliquée dans la régulation des processus inflammatoires (Johnston et al., 1999; Snyder et al., 2010).

La portion respiratoire est constituée des bronchioles terminales et de la zone alvéolaire, appelée aussi parenchyme pulmonaire où s'effectue la totalité des échanges gazeux respiratoire. Les alvéoles dont le nombre total est estimé à 300 millions chez l'homme et la surface à 100 m², représentent une structure bien différente des voies aériennes supérieures. L'épithélium alvéolaire comporte deux types cellulaires : les pneumocytes de type I et les pneumocytes de type II. Bien que la proportion en nombre de cellules soit sensiblement la même entre les deux types cellulaires, les Pneumocytes de type I couvrent 93% de la surface alvéolaire. Ces cellules, aplaties et incapables de se diviser, contiennent seulement quelques organites, et jouent le rôle de mince barrière à travers laquelle s'effectuent les échanges gazeux entre le sang et l'air (Andreeva et al., 2007). Contrairement aux Pneumocytes de type I, les Pneumocytes de type II sont capables de se diviser et sont riche en organites (mitochondries, appareil de golgi et réticulum endoplasmique très développés). Ces cellules morphologiquement très différentes des Pneumocytes de type I présentent une caractéristique qui leur est propre : des inclusions lamellaires osmiophiles qui sont la forme de stockage et de sécrétion du surfactant alvéolaire.

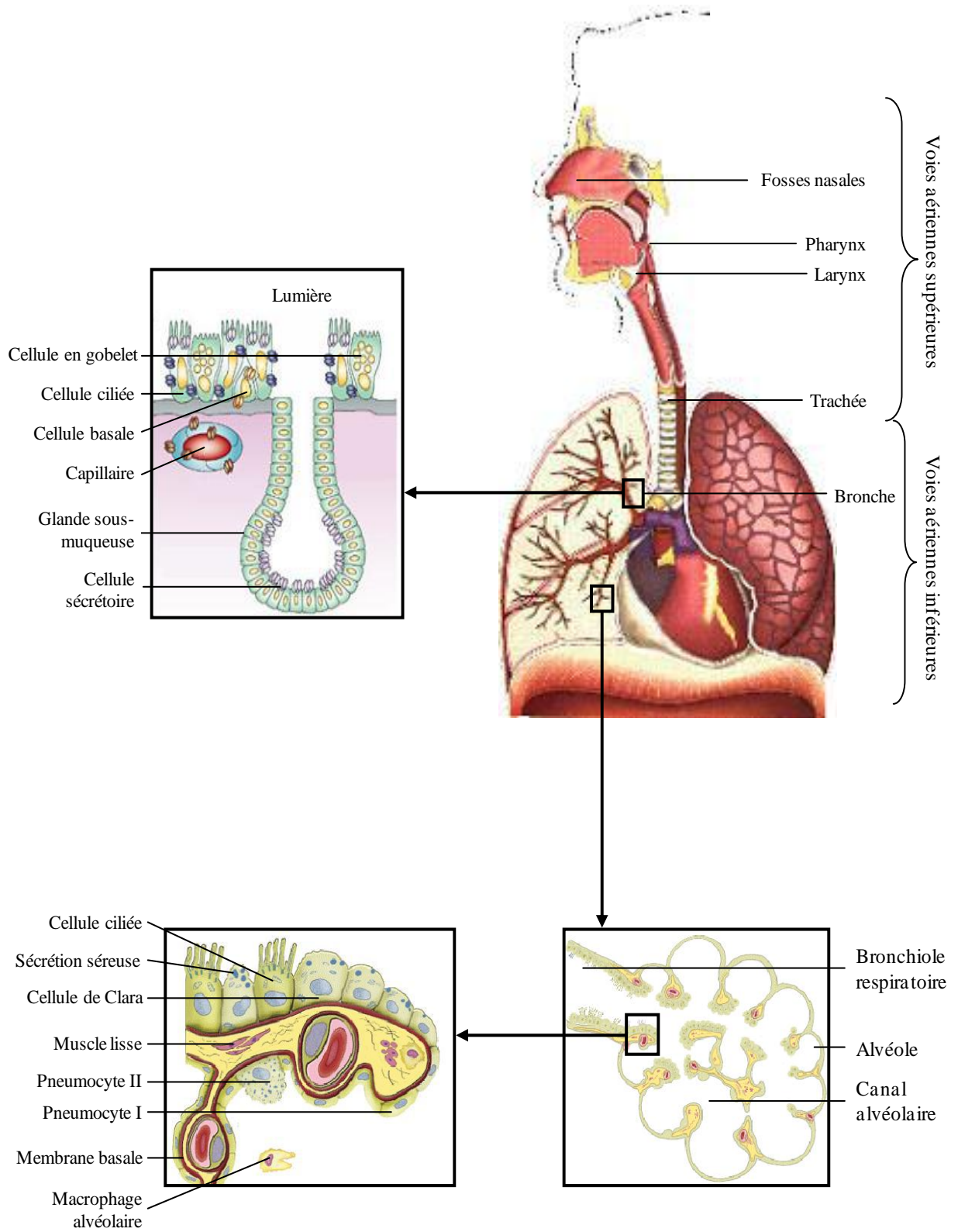


Figure I-3 : Appareil respiratoire humain et organisation cellulaire

III-1-2. Interaction des particules avec l'appareil respiratoire

a. Exposition aux particules atmosphériques

L'appareil respiratoire représente la plus grande surface épithéliale de l'organisme exposée au milieu extérieur. Lors de la respiration, les voies aériennes et les alvéoles pulmonaires sont en permanence en contact avec une multitude de polluants parmi lesquels se trouvent les particules, véhiculées par le flux aérien et parfois déposées à la surface de l'arbre trachéo-bronchique. A la différence d'autres surfaces épithéliales comme la peau ou le tube digestif, les alvéoles sont stériles. Ce phénomène résulte d'un système complexe de défenses particulièrement efficace. Il s'agit, d'une part de caractéristiques anatomiques des voies respiratoires et d'autre part du système de défense. Outre son action de barrière physique, l'épithélium bronchique joue un rôle crucial en déclenchant et en augmentant les mécanismes de défense pulmonaire au travers de la synthèse et la libération de divers médiateurs pouvant induire la différenciation, le chimiotactisme, et l'activation inflammatoires de cellules. L'appareil respiratoire est caractérisé par une hétérogénéité cellulaire qui se traduit par la présence d'une quarantaine de types cellulaires. Les différentes caractéristiques de ces cellules fournissent aux épithéliums bronchique et alvéolaire leurs fonctionnalités complexes. En outre, les cellules ciliées sont responsables de l'élimination des sécrétions trachéo-bronchiques vers le pharynx et sont également actives dans le transport trans-épithélial d'électrolytes. Les cellules séreuses synthétisent la mucine et sont responsables de la viscoélasticité du mucus qui recouvre une grande partie de l'épithélium bronchique. Les cellules basiques contribuent à l'aspect pseudo-stratifié de l'épithélium et semblent être intégralement impliquées dans l'attachement des cellules superficielles à la membrane basale. Les cellules de Clara, plus abondantes dans les voies aériennes distales surtout près des bronchioles terminales, présentent une très grande sensibilité à de nombreux polluants atmosphériques (Plopper et al., 1992; Broeckert and Bernard, 2000). En effet, elles expriment certaines des enzymes du métabolisme des xénobiotiques qui leur confèrent des capacités d'activation métabolique élevées, et les désignent alors comme des cibles privilégiées des xénobiotiques (Plopper et al., 1992). Les pneumocytes de types II sont également décrits comme possédant des capacités importantes d'activation métabolique des composés organiques. Différents autres types cellulaires, et notamment les macrophages alvéolaires, jouent un rôle prépondérant dans la défense de l'organisme contre les xénobiotiques tels que les constituants des aérosols atmosphérique.

L'exposition aux particules à base de silice (quartz, amiante) est la plus répandue dans l'exposition professionnelle en tant qu'exposition aux particules, chronique ou aiguë,

alors que d'autres particules non fibreuses de l'air ambiant peuvent jouer un rôle plus important en toxicologie pulmonaire environnementale due à la présence d'autres éléments chimiques. Ces particules peuvent contenir des HAP et des métaux qui peuvent devenir biodisponibles lors du dépôt dans les poumons. Cette disponibilité biologique peut également être aggravée après la phagocytose par le macrophage alvéolaire. Par ailleurs, les composés chimiques peuvent être biotransformés en espèces mutagènes et/ou cancérigènes par les Enzymes du Métabolisme des Xénobiotiques (EMX), et notamment les cytochromes P450 (CYP) présents dans les cellules pulmonaires. Ces espèces chimiques biologiquement réactives peuvent endommager les macromolécules cellulaires ; leurs interactions avec l'ADN pouvant contribuer à la production des tumeurs pulmonaires.

b. Pénétration des particules dans l'appareil respiratoire

La durée de l'exposition aux polluants atmosphériques peut être de l'ordre de la seconde (e.g. gaz) jusqu'à plusieurs jours (e.g. particules déposées dans les alvéoles). Les différents modèles d'exposition liés au temps et à la dose peuvent donc mener à différents niveaux de dommages structuraux et fonctionnels. On admet généralement que les particules de diamètre inférieur à 2,5 μm ont la capacité de se déposer dans les alvéoles. Les particules sont ensuite phagocytées par les macrophages et transportées hors du poumon par l'intermédiaire de l'appareil mucociliaire. Cependant, ce mécanisme prend habituellement 2 à 3 jours. Aussi bien, quelques particules peuvent demeurer incorporées dans les alvéoles pendant plusieurs centaines de jours. Cette exposition à long terme peut avoir comme conséquence une toxicité envers les cellules épithéliales, les cellules endothéliales, les fibroblastes et les macrophages alvéolaires.

La pénétration des particules dans l'appareil respiratoire est déterminée par leur granulométrie. Les PM dites « respirables » sont celles qui ont un diamètre aérodynamique moyen inférieur à 10 μm (PM_{10}). Elles regroupent elles-mêmes plusieurs fractions plus fines : les particules grossières ($\text{PM}_{2,5-10}$), les particules fines ($\text{PM}_{0,1-2,5}$) et les particules ultrafines ($\text{PM}_{0,1}$). Le D_{ae} des particules détermine leur degré de pénétration et de rétention dans les poumons. Les particules de taille supérieure au PM_{10} sont captées au niveau du segment nasopharyngien puis évacuées par mouchage ou déglutition. Les particules grossières dépassent cette première barrière et pénètrent jusqu'au segment trachéo-bronchique. Ce segment est protégé par des cellules ciliées et des cellules caliciformes produisant du mucus. Dans un mouvement ondulatoire, les poils des cellules ciliées transportent le film muqueux et les corps

étrangers qui y sont englués jusqu'au pharynx où ils sont déglutis en continu. Les particules fines peuvent pénétrer dans le système respiratoire jusqu'aux alvéoles terminales.

c. Déposition, rétention et clairance des particules dans l'appareil respiratoire

La déposition des particules inhalées varie en fonction de leur taille, de la géométrie des voies respiratoires et du mécanisme de dépôt. La **Figure I-4** présente les courbes de déposition des particules. Les principaux mécanismes de déposition sont l'impaction inertielle, la sédimentation et la diffusion Brownienne. On peut déterminer trois régions de dépôt : les régions nasopharyngée et trachéobronchiale où le mécanisme de clairance est mucociliaire et l'élimination des particules rapide (en 24h environ) et la région alvéolaire où la clairance macrophagique est plus lente, la demi-vie des particules pouvant atteindre des mois. Ceci est conforté par des études récentes (Churg and Brauer, 2000; Churg et al., 2003) fondées sur l'analyse au microscope électronique de biopsies provenant de poumons humains, à Mexico (forte pollution particulaire, PM_{10} : $66 \mu\text{g}/\text{m}^3$) et Vancouver (faible pollution particulaire, PM_{10} : $14 \mu\text{g}/\text{m}^3$). Ces études montrent que les premières contiennent environ 10 fois plus de particules que les secondes, et qu'il s'agit à 96 % de particules carbonées fines sans doute associées aux processus de combustion, dont le trafic automobile. Cette étude prouve, pour la première fois chez l'homme, que l'exposition à des particules fines conduit à une rétention pulmonaire qui dépend de la concentration ambiante et que cette persistance peut conduire à un remodelage bronchique. Cependant, les particules ultrafines se comportent de façon particulière dans la mesure où leur dépôt se fait à la fois essentiellement dans les régions nasopharyngée et alvéolaire. De plus, dans le poumon profond, leur élimination par le processus de clairance alvéolaire est perturbée. En effet, il semble qu'elles soient plus difficilement phagocytées que les particules fines par les macrophages alvéolaires, ce qui conduit à une persistance accrue et une interaction avec les cellules épithéliales (Chalupa et al., 2004). Par ailleurs, la déposition particulaire dans les poumons est sensiblement plus marquée chez des malades atteints de pathologies obstructives telles que l'asthme et la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO). Elle est hétérogène selon les zones du poumon et la variabilité interindividuelle est très forte (Chalupa et al., 2004; Araujo and Nel, 2009).

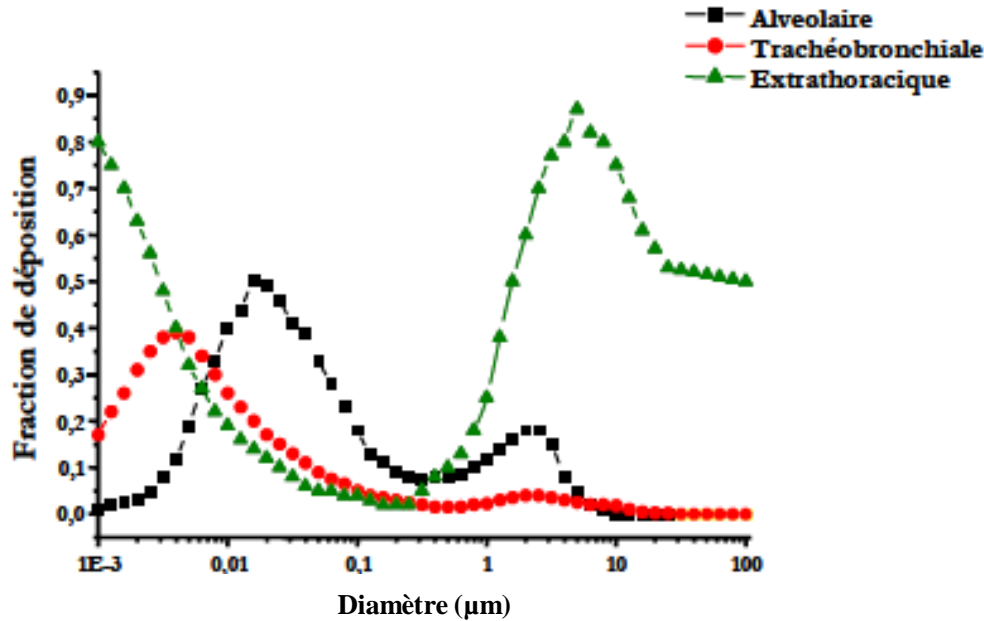


Figure I-4 : Modèle de déposition fractionnée des particules inhalées de diamètre compris entre 0,6 nm et 20 µm dans l'appareil respiratoire humaine pendant la respiration nasale, chez les individus en bonne santé, selon le modèle de l'ICRP (1994)

d. Incorporation cellulaire et translocation extra-pulmonaire des particules

La question de la translocation de particules fines et ultrafines à travers les barrières biologiques chez l'homme a été posée notamment par des études réalisées avec des nanoparticules de carbone de 20 nm marquées au Technicium 99. L'une d'entre elles montre une translocation rapide vers le sang et une accumulation significative dans le foie (Nemmar et al., 2002), alors qu'une autre conteste ces résultats (Brown et al., 2002). Cependant, si l'on considère aussi les études réalisées chez l'animal (Elder and Oberdörster, 2006), il paraît hautement probable que les particules ultrafines puissent passer la barrière épithéliale vers l'interstitium pulmonaire. Elles seraient aussi capables de franchir la paroi des vaisseaux et de se retrouver dans le flux sanguin, distribuées ensuite au niveau de l'organisme. Leur accumulation dans des organes cibles a été étudiée à l'aide de nanoparticules modèles (i.e. billes de polystyrène marquées). Le foie est le site majeur d'accumulation, mais une accumulation mineure dans le cœur et dans le rein a également été retrouvée (Akerman et al., 2002). Par ailleurs, le passage des barrières hémato-encéphalique et placentaire est suspecté mais encore insuffisamment démontré. Une autre voie d'entrée potentielle est la voie olfactive. Il est connu depuis de nombreuses années que certains virus peuvent emprunter le nerf olfactif, et des expériences anciennes chez le singe ont montré que des nanoparticules d'or colloïdal instillées dans les fosses nasales pouvaient être transportées vers le bulbe

olfactif (de Lorenzo, 1970). La question d'un tel transfert se pose donc pour les particules atmosphériques ultrafines. Des observations troublantes d'inflammation chronique du cerveau et de processus accélérés de maladies neurodégénératives chez des chiens, à Mexico, ont été associées à la forte pollution particulaire de la ville (Calderón-Garcidueñas et al., 2002).

III-2. Épidémiologie des particules

Les poumons sont les organes les plus largement exposés aux particules en suspension dans l'air. Les risques pour la santé sont donc essentiellement liés aux pathologies respiratoires mais aussi à des pathologies systémiques. De nombreuses études expérimentales ont reproduit l'exposition de l'organisme entier aux particules afin de trouver des explications causales aux données épidémiologiques qui ont associé la pollution particulaire à la mortalité et à la morbidité d'origine respiratoire et cardiovasculaire.

Les effets des particules (PM₁₀ et PM_{2,5}) ont largement été étudiés depuis une vingtaine d'années (Alfaro-Moreno et al., 2009; Janssen et al., 2011). Des études épidémiologiques ont mis en évidence une relation entre les concentrations ambiantes particules et la survenue ou l'aggravation pouvant aller jusqu'au décès, de pathologies cardio-respiratoires chez l'homme. Ces études font apparaître des effets consécutifs à des épisodes d'exposition aiguë mais aussi des effets chroniques. Les études réalisées aux Etats-Unis se rapportant essentiellement sur l'effet des PM₁₀ ont été jusqu'en 1997 la seule référence météorologique de la pollution particulaire. Ainsi, l'examen des admissions dans les hôpitaux de Chicago entre 1988 et 1993, ont révélé une corrélation entre épisodes de forte pollution particulaire et morbidité. Les auteurs ont déterminé qu'une augmentation de 10 µg/m³ de la quantité de PM₁₀ dans l'air entraîne des augmentations d'admissions pour cause de problèmes cardiaques (+1,27%), d'obstruction pulmonaire (+1,45%) et de pneumonies (+2%) (Schwartz, 2001). Des observations comparables réalisées dans 10 villes des Etats-Unis durant 9 années établissent une corrélation entre les admissions pour pneumopathies et cardiopathies et la pollution particulaire (Zanobetti et al., 2000). Des recherches, menées auprès des populations générales de 21 villes européennes, ont suggéré qu'une élévation de 10 µg/m³ de la concentration atmosphérique en PM₁₀ provoque une augmentation de 0,6 % de la mortalité journalière (Brunekreef and Holgate, 2002). Une autre étude, réalisée en 2005, a montré qu'un épisode de forte pollution atmosphérique (équivalent à +10µg/m³ de PM₁₀) entraînerait une augmentation de la mortalité de 0,41 % (données des hôpitaux de 90 villes des Etats-Unis) (Dominici et al., 2005).

En ce qui concerne les PM_{2,5}, il existe très peu d'études relatives à des expositions épisodiques. Cependant, une étude portant sur 9 grandes villes de Californie de 1999 à 2002 a montré une relation entre la mortalité journalière et une augmentation de la concentration en PM_{2,5}. Les auteurs ont ainsi déterminé qu'une augmentation de la concentration en PM_{2,5} sur deux jours, de 10µg/m³ entraîne une hausse de la mortalité journalière due aux pneumopathies, cardiopathies ou encore diabètes de 0,6 % (Ostro et al., 2006). La morbidité est également affectée suite à de multiples épisodes de forte pollution atmosphérique (Künzli et al., 2005; Hoffmann et al., 2007). Une étude épidémiologique basée sur le suivi de la mortalité de 8111 adultes de 6 villes des Etats-Unis sur une période de 14 à 16 années a montré un lien entre les niveaux d'exposition aux PM_{2,5} et la mortalité cardio-pulmonaire ainsi que des déclenchements de cancer des poumons (Dockery et al., 1993).

Dans les pays en développement, les populations des mégapoles d'Asie, d'Afrique et d'Amérique latine en forte urbanisation rapide sont de plus en plus exposées à des niveaux ambiants de pollution qui dépassent souvent les teneurs rencontrées dans les pays développés. L'OMS a rapporté que près d'un quart de la totalité des décès survenus en Afrique obtenus en 2002 seraient attribués à des facteurs de risque liés à l'environnement dont 40000 décès liés à la pollution de l'air (WHO, 2006 ; 2007).

Il est important de noter que certaines personnes sont davantage susceptibles de développer une pathologie liée à la pollution particulaire. En effet, les personnes présentant des troubles asthmatiques, des problèmes cardiaques ou une infection pulmonaire ont un risque deux fois plus élevé de morbidité lorsqu'elles sont exposées à des particules. L'analyse des données épidémiologiques par le biais des admissions hospitalières, ont montré que les diabétiques présentent deux fois plus de risque d'être admis pour des problèmes cardiaques qu'une personne non diabétique (Zanobetti and Schwartz, 2002). Ces études permettent d'apporter des éléments de réponses aux hypothèses relatives aux mécanismes physiopathologiques responsables des effets mentionnés ci-dessus.

Les particules peuvent être responsables de pathologies respiratoires qui peuvent être aiguës ou chroniques. L'une des pathologies les plus répandues est la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) dont les symptômes sont la réduction du diamètre des voies aériennes, l'air circule moins efficacement et en moins grande quantité, ce qui conduit rapidement à l'essoufflement. Chaque année, ce sont quelques 150 000 personnes qui décèdent suite à ces complications. C'est le tabac qui est responsable dans 90 % des cas, cependant, la pollution atmosphérique particulaire semble exacerber cette pathologie (Ling

and van Eeden, 2009). Une autre pathologie respiratoire chronique pouvant être induite par les particules est l'asthme. Les particules, du fait de leur capacité à entraîner une inflammation et à produire un stress oxydant, sont également responsables de l'aggravation des symptômes de l'asthme (Long et al., 2005; Roy et al., 2011). L'asthme est une maladie inflammatoire qui affecte les bronches, entraînant une inflammation et la formation d'œdème au niveau de l'épithélium bronchique, une contraction des muscles lisses bronchiques et une hypersécrétion de mucus. Cette affection est en constante augmentation d'après l'OMS. L'hypothèse de l'implication de la pollution particulaire dans ce phénomène a été avancée. Les données d'une étude réalisée par l'ACS (American Cancer Society) sur 1,2 millions d'adultes en 1982 via un questionnaire visant à identifier les facteurs de risques, a permis de montrer une corrélation entre des expositions prolongées à des particules fines et des cancers du poumon (Pope et al., 2004). Harrison et collaborateurs (2004), se basant sur cette même étude, ont suggéré qu'il la possibilité que ces cancers soient dus à la présence de molécules potentiellement carcinogènes (As, Ni, Cr et HAP) sur les PM_{2,5}. Cependant, elle émet aussi l'hypothèse que les PM_{2,5}, indépendamment de leurs compositions, pourraient entraîner des cancers du poumon (Harrison et al., 2004).

De nombreuses publications montrent que la pollution particulaire peut modifier le fonctionnement de l'appareil cardiovasculaire. En effet un épisode d'augmentation de la concentration en particules peut entraîner un changement du rythme cardiaque, un rythme cardiaque variable ou une modification du tonus vasculaire (O'Neill et al., 2005; Simkhovich et al., 2008). L'équipe de Gold a montré en 2000, une diminution du rythme cardiaque chez des personnes d'une maison de retraite de Boston suite à une exposition de 15,5 µg/m³ de PM_{2,5} (Gold et al., 2000). Au contraire, des concentrations importantes en PM₁₀ (100 µg/m³) accélèrent le rythme cardiaque de 5 à 10 pulsations par minute (Pope et al., 2004). Sur le long terme, la pollution particulaire peut entraîner une accélération de la progression de l'athérosclérose (Hoffmann et al., 2007). Contrairement aux pathologies pulmonaires, les mécanismes et/ou voies d'actions liés aux pathologies cardiovasculaires restent encore très incertains. Deux possibilités sont proposées : (1) une action directe des particules ultrafines par passage dans le système circulatoire sanguin ; elles peuvent alors atteindre le cœur, (2) une action indirecte consécutive au phénomène inflammatoire de l'épithélium pulmonaire, conduisant à la sécrétion de cytokines, de médiateurs du stress oxydant et/ou la diffusion des composés solubles des particules (Brook et al., 2004; Simkhovich et al., 2008).

IV. Mécanismes physiopathologiques impliqués dans la toxicité des particules

Les mécanismes d'action cellulaires et moléculaires des particules font actuellement l'objet de nombreuses recherches qui utilisent pour cela différents modèles cellulaires in vitro. Ces approches complémentaires aux études épidémiologiques ont permis d'apporter des éléments de réponses sur l'apparition des mécanismes physiopathologiques sous-jacentes à l'exposition aux particules atmosphériques.

IV.1. Activation métabolique des composés organiques adsorbés par les particules

IV.1.1. Principe de la biotransformation

Au cours de l'évolution, les organismes vivants ont perfectionné des outils visant à favoriser l'élimination des xénobiotiques, ce qui constitue en quelque sorte, un moyen de défense contre l'action néfaste de certains d'entre eux. Le processus de biotransformation est l'un des outils. Il désigne l'ensemble des réactions qui résultent en des modifications, par l'intermédiaire d'enzymes, de la structure chimique d'un xénobiotique. Ces réactions ont pour effet de rendre les xénobiotiques liposolubles plus polaires (ionisables), donc soluble dans l'eau et ainsi plus facilement excrétables dans l'urine. Le foie est le principal organe impliqué dans ce processus et dans une moindre mesure certains organes comme la peau, le rein, la muqueuse intestinale et le poumon. Nous nous intéresserons principalement à ce dernier puisqu'il constitue l'organe cible principale des polluants atmosphériques. Il faut remarquer que la biotransformation, généralement bénéfique puisqu'elle permet l'élimination des composés étrangers hors des tissus pulmonaires, peut se révéler parfois néfaste en transformant une substance non toxique en un métabolite réactif donc sa bio-activation ou activation métabolique. Ainsi, de nombreuses substances chimiques intrinsèquement non pneumotoxiques induisent des dommages cellulaires une fois métabolisées. Le B[a]P est un exemple de composé toxique indirect, dont le métabolite réactif, le B[a]P-7,8-diol-9,10-époxyde (BPDE), est capable de former un adduit à l'ADN, et d'entraîner l'initiation d'un processus tumoral (**Figure I-5**). En raison de leur forte réactivité, les métabolites ainsi formés exercent leur toxicité localement. En fonction de la concentration pulmonaire du composé initial et des capacités enzymatiques tissu-dépendantes, la toxicité apparaîtra dans tel ou tel type de cellules. Le potentiel toxique rend compte de l'équilibre entre les réactions d'activation et celles de détoxification (Ding and Kaminsky, 2003). Les travaux réalisés sur différents modèles d'animaux montrent que plusieurs types de cellules cibles du compartiment respiratoire participent significativement à la conversion des xénobiotiques tant en métabolites réactifs qu'inactifs (Hukkanen et al., 2000, 2002; Spivack et al., 2003). Chez

l'homme, les CYP sont principalement exprimés dans les cellules de Clara, les pneumocytes alvéolaires de type I et II, les cellules endothéliales, les macrophages alvéolaires, ainsi que dans les cellules bronchiales ciliées (Hukkanen et al., 2000, 2002).

Deux classes de réactions enzymatiques peuvent intervenir au cours du processus de biotransformation : les réactions de phase I et les réactions de phase II.

Les réactions de phase I sont des réactions d'activation proprement dite et sont de trois types : l'oxydation, la réduction et l'hydrolyse. Ces réactions mettent en jeu un groupe d'enzymes appelées « monooxygénase à fonction mixte » incluant le cytochrome P-450 (CYP-450) et la NADPH-cytochrome P-450 réductase et l'Époxyde Hydrolase microsomale (EHm) (Ding and Kaminsky, 2003; Nebert et al., 2004; Shimada and Guengerich, 2006). Une fois métabolisés par les enzymes de la phase I, les xénobiotiques peuvent se réarranger ou exercer une action toxique directe au niveau cellulaire, via leur interaction avec les différentes macromolécules.

Les réactions de phase II confèrent également un caractère hydrosoluble aux molécules et facilitant ainsi leur excrétion. Elles produisent des conjugués suite au couplage entre un xénobiotique (ou métabolite) et un produit endogène, déjà présent dans l'organisme. Ces réactions peuvent être la glucuronoconjugaison et sulfoconjugaison mettant en jeu des enzymes comme glucuronyl-transférase et la sulfotransférase. Certains enzymes comme la NADPH-quinone oxyréductase (NQO1) sont également mise en jeu au cours de cette phase. La NQO1 est présente dans tous les types de cellules humaines, mais ses niveaux d'expression diffèrent en fonction des tissus (Joseph and Jaiswal, 1994; Jaiswal et al., 1999; Ross et al., 2000). La réduction à deux électrons catalysée par cette enzyme nécessite l'oxydation d'un cofacteur, le Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit (NADPH). L'action de la NQO1 engendre la diminution de la quantité de quinones intermédiaires, d'une part, et de semi-quinones, d'autre part. Ces dernières s'auto-oxydent en benzoquinones, substrats et inducteurs de la NQO1. Il est à noter que cette dernière réaction forme parallèlement des espèces réactives de l'oxygène (ERO), ce qui a notamment pour effet de réduire le pool cellulaire de glutathion réduit (GSH). Parmi les enzymes responsables de la phase II, la famille multigénique des Glutathion S-Transférases (GST) jouent un rôle considérable (Haag et al., 2001). Ces enzymes ont pour substrat des composés chimiques contenant un groupement électrophile hautement réactif vis-à-vis des protéines, des lipides ou des acides nucléiques, et donc potentiellement toxiques pour l'organisme (Hayes and Pulford, 1995; Hayes and Strange, 1995). Elles conjuguent le GSH à ce groupement, ce qui aboutit à l'inactivation des

xénobiotiques en vue de leur excrétion facilitée par l'hydrophilie du métabolite formé (Thier et al., 2003; Manfredi et al., 2007).

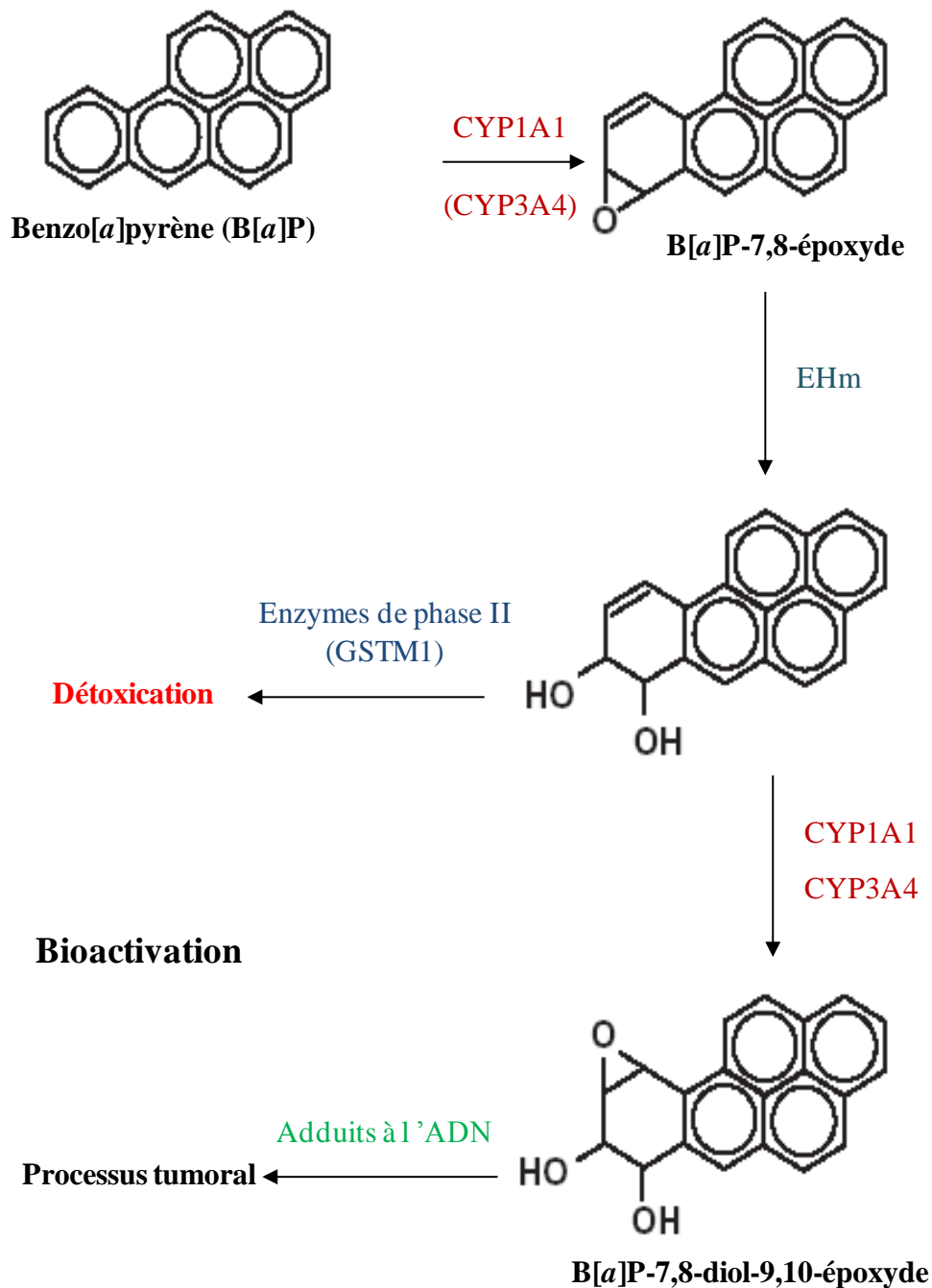


Figure I-5 : Métabolisme du Benzo[a]Pyrène (B[a]P): en cas d'induction importante de la première phase de sa métabolisation, le B[a]P est converti en B[a]P-7,8-diol-9,10-époxyde, un métabolite réactif capable de former un adduit à l'ADN. (CYP, Cytochrome-P450; EHm, Epoxyde Hydrolase microsomale; GSTM1, Glutathion-S-Transférase Mu 1) (adapté de (Castell et al., 2005)

IV.1.2. Activation métabolique des Composés Organiques Volatils (COV)

L'activation métabolique des COV est représentée par la métabolisation du benzène sur la Figure I-6. Les CYP, impliqués dans l'activation métabolique des COV au niveau du poumon, sont principalement le CYP 2E1 et le CYP 2F1 (Rossi et al., 1999). L'expression génique du CYP 2E1 a été clairement démontrée à différents niveaux pulmonaires, comme dans les bronches, les macrophages alvéolaires, les lymphocytes (Hukkanen et al., 1997; Crawford et al., 1998; Macé et al., 1998). De plus, ce CYP est considéré comme inductible, la force de son induction étant en rapport avec la concentration de l'inducteur dans le tractus respiratoire (Ding and Kaminsky, 2003). L'oxydation de composés organiques, et notamment des COV, par les CYP conduit à la synthèse d'époxydes qui peuvent se réarranger soit directement en phénol, soit indirectement, grâce à l'action de EHm, en dihydrodiols (Guengerich et al., 1996; Bauer, Faiola, Abernethy, Marchan, Pluta, Wong, Gonzalez, et al., 2003). Le métabolite alors obtenu pourra à son tour subir l'oxydation par le même CYP que le composé organique initial. Les hydroquinones sont détoxifiées par la NQO1 en hydroxyquinones (Rothman et al., 1997; Jaiswal et al., 1999; Ross et al., 2000; Bauer, Faiola, Abernethy, Marchan, Pluta, Wong, Roberts, et al., 2003).

Les époxydes dérivant de l'activation métabolique du benzène sont ainsi majoritairement conjugués par les GST- μ 1, GST- π 1 et GST- σ 1, tandis que le phénol, les hydroquinones, les catéchols et les trihydroxybenzènes sont conjugués aux sulfates ou aux glucuronides, en vue de leur excrétion (Henderson et al., 1989; Rossi et al., 1999).

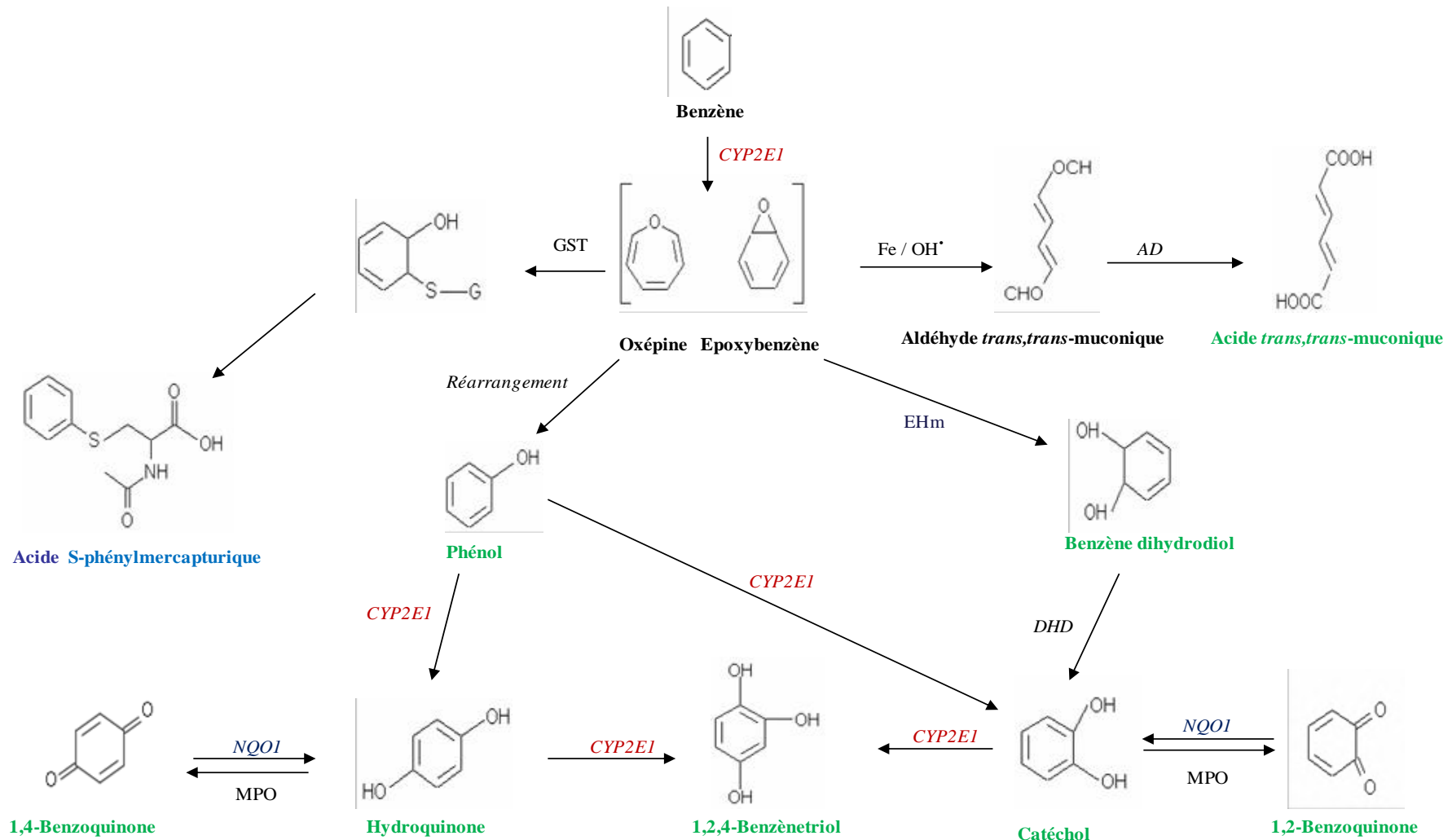


Figure I-6 : Métabolisme du benzène (ATSDR, 1997)

Cytochrome P450 (CYP)2E1 ; Epoxyde Hydrolase microsomale (EHm) ; NADPH quinone oxydoréductase (NQO1) Glutathion-S-transférase (GST) ; Myéloperoxydase (MPO) ; Aldéhyde déshydrogénase (AD) ; Dihydrodiol Déshydrogénase (DHD)

IV.1.3. Activation métabolique des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP)

a. Mécanismes

Il existe 3 principales voies de métabolisation des HAP (Xue and Warshawsky, 2005). La plus importante implique la famille des cytochromes P450 (CYP450) qui catalyse la mono-oxygénation des HAP en époxyde. La 2^{ème} voie repose sur la formation d'un radical cation suite à l'oxydation à un électron des HAP, catalysée par des cytochromes P450 peroxydase. Enfin une voie mise en évidence plus récemment implique la formation de *o*-quinones à partir de catéchols, catalysée par des dihydrodiols déshydrogénases. L'activation métabolique du B(a)P par oxydation mono-électronique a été décrite comme majoritairement impliquée dans l'apparition d'adduits à l'ADN et par conséquent dans les phénomènes de la mutagenèse et de la cancérogenèse (Baer-Dubowska, 1999; Darwish et al., 2010)

L'oxydation des HAP, et notamment du Benzo(a)pyrène (B(a)p) par les *CYP1A1* conduit à la synthèse d'époxydes qui peuvent se réarranger, grâce à EHM, en dihydrodiols (Guengerich et al., 1996; Bauer, Faiola, Abernethy, Marchan, Pluta, Wong, Gonzalez, et al., 2003, 2003). Le métabolite alors obtenu pourra à son tour subir l'oxydation par le *CYP1A1*: à noter qu'entre tous les métabolites intermédiaires possibles du B(a)P, le 7,8-diol-9,10-époxyde est extrêmement réactif envers l'ADN et est considéré comme le métabolite ultime cancérogène du B(a)P (Shimada, 2006). Ces B(a)P-époxydes peuvent également être métabolisés par d'autres enzymes de métabolisation des xénobiotiques (EMX), tels que les GST- π et l'EHM (Nebert et al., 1996; Shimada, 2006).

Les GST- π , ont été décrites comme catalysant la conjugaison du glutathion aux fonctions époxydes de certains métabolites du B(a)P (Robertson and Jernström, 1986; Jernstrom et al., 1996; Eaton and Bammler, 1999). Ces EMX peuvent donc contribuer à la détoxification et à l'élimination de certains des métabolites mutagènes et/ou cancérogènes générés lors des diverses réactions issues de la mono-oxygénation du B(a)P par le CYP 1A1 (Tew and Ronai, 1999; Shimada, 2006).

Le B(a)P peut également engendrer des B(a)P phénols qui sous l'action des GST donneront des B(a)P quinones détoxifiées par la NQO1 en B(a)P hydroxyquinone. Enfin l'EHM peut également interagir avec les B(a)P phénols pour donner des B(a)P phénoldiols. Les B(a)P phénols et les B(a)P phénoldiols sont excrétés sous forme de conjugués glucuronides sulfates (Shimada 2006).

Enfin, les enzymes de la superfamille des aldo-céto réductases (AKR) sont capables de convertir certains B(a)P dihydrodiols en B(a)P *o*-quinone via une étape par les B(a)P-catéchols. Le B(a)P *o*-quinone est très réactif et capable d'interagir avec l'ADN, formant des

adduits d'ADN stables et dénaturés (Shimada 2006). D'autre part, les HAP chlorés sont extrêmement stables, très peu réactifs chimiquement, résistants à la chaleur (décomposition au-delà de 800°C), ils sont très peu solubles dans l'eau et légèrement solubles dans les graisses.

b. Rôle du récepteur AhR (Aryl hydrocarbon Receptor)

Les dioxines et les HAP ont un récepteur intracellulaire commun, le récepteur AhR (Figure I-7). Ce récepteur cytosolique, à l'état stable, forme un complexe avec une protéine de choc thermique ou Heat shock protein 90 (Hsp 90). La liaison de la dioxine à AhR entraîne une dissociation de ce complexe. L'association AhR-dioxine migre alors vers le noyau où elle se lie à la protéine Arnt (Ah Receptor Nuclear Translocator). Enfin, ce nouveau complexe va se fixer à différentes séquences d'ADN appelés « Eléments de Réponse aux Xénobiotiques » (ERX) pour former un complexe qui, agissant comme un facteur de transcription, induira l'expression génique de nombreux gènes dont ceux qui affectent la production du CYP (Lucier et al., 1993). Le caractère indispensable du récepteur Ah dans la médiation de certains effets de la 2,3,7,8-TCCD est désormais acquis et fait considérer AhR comme un chef d'orchestre dans le rôle des effets toxiques de la dioxine. Il existe un processus d'auto-induction enzymatique par les HAP et notamment le B(a)P. Le mode de fonctionnement et de liaison de AhR avec les HAP est identique que celui des HAP halogénés. Le complexe B(a)P/AhR/Arnt constitue un hétérodimère jouant le rôle de facteur de transcription induisant l'expression du CYP 1A1 et de certaines isoformes de GST (Denison and Whitlock, 1995; Whitlock et al., 1997; Whitlock, 1999).

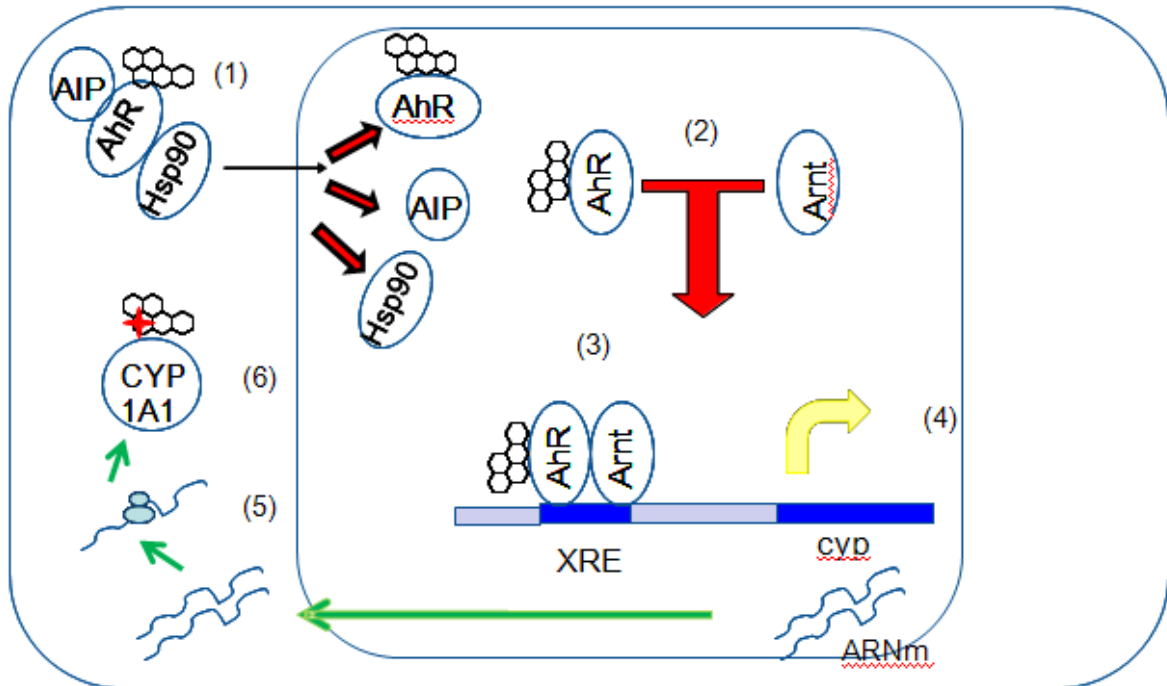


Figure I-7 : Schéma simplifié de l'induction des gènes *CYP1A1* par le B[a]P : (1) Liaison du B[a]P au AhR, Translocation du complexe AhR/Hsp90 dans le noyau et dissociation (2) Dimérisation du AhR avec l'Arnt, (3) Fixation du complexe AhR/Arnt au niveau d'un élément de réponse aux xénobiotiques XRE, (4) Transcription des gènes cyp, (5) Translocation de l'ARNm dans le cytoplasme et traduction par les ribosomes pour donner une protéine CYP1A1, (6) Métabolisation d'une molécule de B[a]P par la protéine néo-synthétisée (Delescluse, 2000)

IV.2. Le stress oxydant

IV.2.1. Définition

Le terme stress oxydant est relativement récent, il a été décrit en 1991 par Sies (Sies, 1991), comme un déséquilibre dans la balance des pro- et antioxydants (balance redox) qui peut conduire à des altérations cellulaires. Dans les conditions physiologiques, l'oxygène, indispensable à la respiration, produit au niveau des mitochondries des espèces réactives oxygénées (ERO) pro-oxydantes pouvant affecter l'intégrité des cellules lorsqu'elles sont en excès. Ces molécules, issues de la métabolisation de l'oxygène, incluent des espèces chimiques radicalaires possédant un ou plusieurs électrons non appariés (**Figure I-8**) et de ce fait vont réagir indifféremment avec les autres molécules proches de leur lieu de production. Ces molécules sont essentiellement des composés des membranes cellulaires (lipides, glucides et protéines) et dans une moindre mesure l'ADN (Kelly, 2003; Baeza and Marano, 2007). D'où leur implication dans de multiples processus biologiques tels que le vieillissement et l'inflammation mais aussi des pathogénèses comme la cancérogénèse et l'athérosclérose. Outre le transfert d'électrons au niveau mitochondrial à partir de l'O₂, d'autres facteurs endogènes responsables de la production d'ERO existent comme une altération de la chaîne respiratoire mitochondriale qui intervient avec le vieillissement ou lors de phénomènes d'ischémie. L'activation des cellules immunitaires est également une source importante de production d'ERO. En effet, la présence d'agents étrangers active les macrophages entraînant une augmentation de la consommation en oxygène (appelé poussée respiratoire). Cet oxygène, par l'action de processus enzymatiques, va être transformé en radicaux libres qui vont s'attaquer non seulement à l'agent étranger mais aussi aux tissus sains (Torres and Forman, 1999; Forman and Torres, 2002; Liu et al., 2006). Il existe également des facteurs exogènes amenant à la production d'ERO et donc à une induction du stress oxydant : expositions prolongées au soleil et aux radiations, contacts avec des agents cancérogènes, tabagisme, prise de médicaments (dont la pilule contraceptive), pratique intense ou mal gérée d'un sport, consommation excessive d'alcool, stress intellectuel ou thermique, agents infectieux et les polluants atmosphériques gazeux (NO₂, O₃) et particulaires (Imrich et al., 2007; Li et al., 2008; Araujo, 2010).

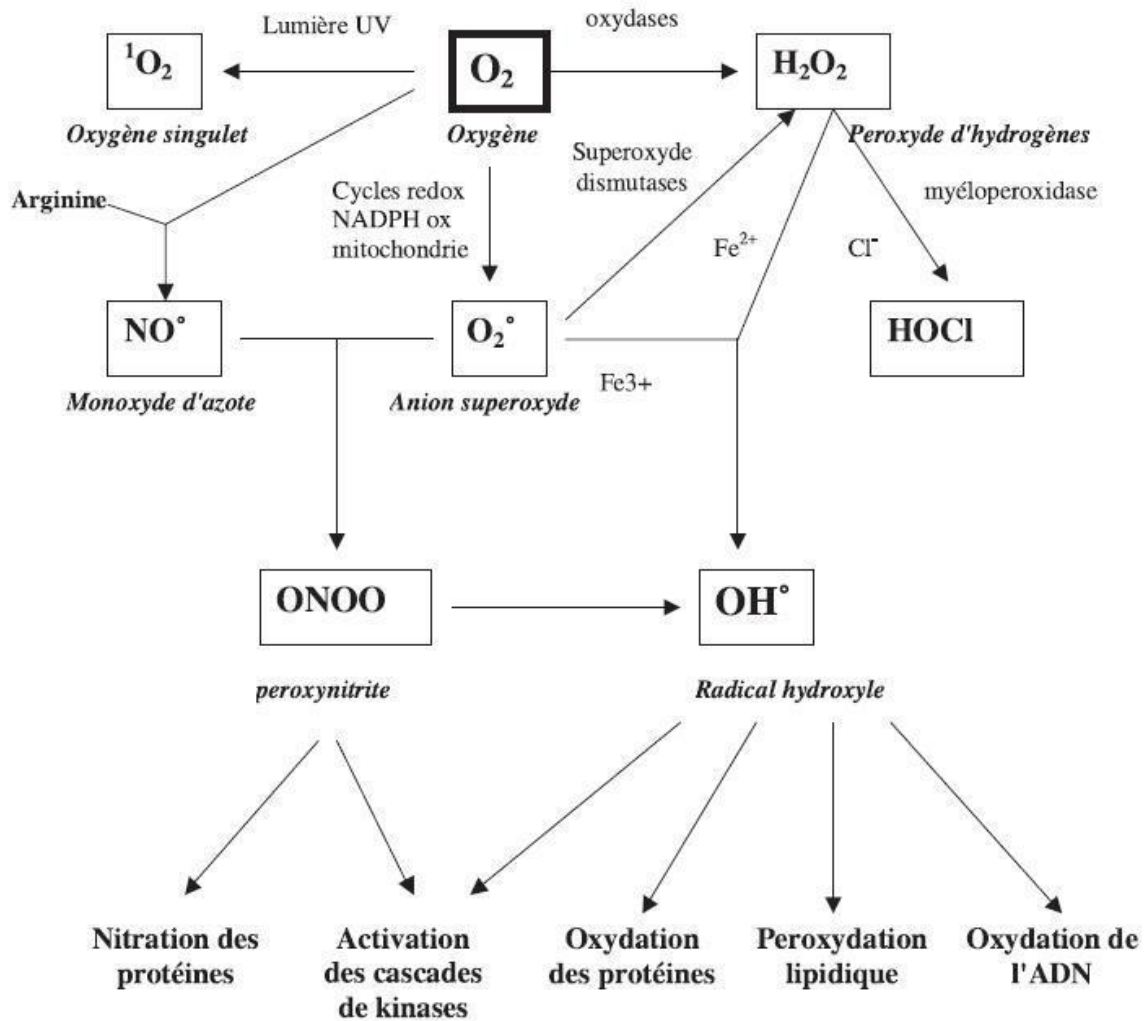


Figure I-8 : Origines des différents radicaux libres oxygénés, nitrogénés et des espèces réactives de l'oxygène produits au niveau cellulaire (Favier, 2003)

IV.2.2. Dommages des membranes cellulaires

Une des atteintes cellulaires les plus caractéristiques du stress oxydant est la réaction des ERO avec les lipides insaturés des membranes. Ce phénomène permanent et ubiquitaire en milieu aérobie, encore appelé peroxydation lipidique, s'avère être probablement le processus biologique délétère induit par les ERO le mieux étudié. L'altération des membranes par la peroxydation lipidique résulte généralement en la formation de nombreux composés, incluant notamment des alcanes et des carbonyles. Certains d'entre eux, notamment le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) présentent une toxicité intrinsèque et peuvent servir d'intermédiaires dans la formation de dommages radicalaires, en générant des adduits avec les protéines et / ou l'ADN (Forman et al., 2008; Valavanidis et al., 2008). La détermination du MDA dans des conditions pathologiques a été décrite comme un

marqueur biologique des altérations membranaires induites par la peroxydation lipidique (Shirali et al., 1994; de Zwart et al., 1999).

IV.2.3. Effets cellulaires du stress oxydant

Les dommages à l'ADN induits par les ERO recouvrent plusieurs aspects : (i) la formation d'adduits entre les dérivés lipidiques issus de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et l'ADN, (ii) la formation d'adduits entre les protéines altérées par le stress oxydant et l'ADN, (iii) l'altération du pool de désoxyribose-phosphates, (iv) l'hydroxylation des bases puriques et pyrimidiques de l'ADN, (v) les cassures simple et double brins de l'ADN, (vi) l'induction d'aberrations chromosomiques, et (vii) la distorsion de la double hélice de l'ADN (Prahalad et al., 2001; Higuchi, 2003; Valavanidis et al., 2005). En outre, la formation de bases modifiées de l'ADN a été décrite lors de conditions de stress oxydant. En particulier, la désoxyguanosine est caractérisée par une grande sensibilité à l'action du radical hydroxyle ; aussi la 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine (8-OHdG), issue de l'adduit ou liaison covalente du radical hydroxyle avec la désoxyguanosine, est-elle un marqueur biologique spécifique du stress oxydant et de ses effets délétères au niveau des acides nucléiques.

Les effets délétères du stress oxydant sur les protéines se traduisent par l'altération de leurs chaînes d'acides aminés, le clivage radicalaire de leurs peptides et leurs réactions avec les intermédiaires issus de la peroxydation lipidique et en particulier le MDA (De Zwart et al., 1999). Les protéines ainsi altérées ont une sensibilité accrue à l'action des protéases et, dans le cas précis des enzymes, une perte de leur activité enzymatique (**de Zwart et al., 1999**). En outre, la formation d'adduits des composés issus de la peroxydation lipidique avec les protéines résulte en la formation d'auto-anticorps ou de lipofuscines caractéristiques du vieillissement (Favier, 1997). Les ERO étant continuellement générées dans les cellules aérobies, des systèmes enzymatiques de défenses antioxydantes ont co-évolué avec le métabolisme cellulaire afin de prévenir leurs conséquences délétères (**de Zwart et al., 1999**).

IV.2.4. Les mécanismes de défense antioxydants

La production des ERO est limitée par différents systèmes de défense complémentaires. Les radicaux libres sont neutralisés par des systèmes enzymatiques comme la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et le glutathion peroxydase (GPX), ainsi que par des agents antioxydants non enzymatiques que sont les vitamines A, C et E. A cela s'ajoutent des enzymes protéolytiques qui dégradent les substrats oxydés. Ainsi, le potentiel oxydant de l' $O_2^{\cdot-}$ issu de l' O_2 est diminué par une série de réactions enzymatiques aboutissant à la

formation d'H₂O (Torres and Forman, 1999); Thannickal et Fanburg, 2000). Le glutathion réduit (GSH) va contribuer à la transformation de H₂O₂, issu de l'oxydation de l'O₂^{•-}, en H₂O par une réaction enzymatique catalysée par la GPX. Cette réaction conduit à la production de la forme oxydée du glutathion, le glutathion disulfide (GSSG). Ce dernier sera en retour réduit en GSH par une réaction catalysée par la glutathion réductase (GR). Il existe donc un équilibre entre ces deux formes dont les proportions respectives sont fonction du potentiel redox global de la cellule. Le rapport GSH/GSSG est ainsi considéré comme un indicateur pertinent du degré de stress oxydant subit par la cellule (Schafer and Buettner, 2001). Baeza et Marano (2007) ont établi une hiérarchisation des phénomènes biologiques en fonction du ratio GSH/GSSG présenté sur la Figure I-9. Lors d'un faible niveau de stress oxydant (Etape I), les processus antioxydants permettent de restaurer « l'homéostasie redox » de la cellule, par le facteur de transcription nucléaire Nrf2 notamment, qui induit la formation de plus de 200 enzymes antioxydantes et 61 détoxifiantes comme la SOD, la Glutathion S-transférase (GST), la catalase et l'hème oxygénase 1 (HO-1) (Cho et al., 2006; Li and Nel, 2006). Cette dernière enzyme est une Heat Shock Protein (HSP) dont l'expression est induite rapidement lors de stress oxydant dont elle constitue un bon marqueur. La HO-1 a des fonctions antioxydantes et cytoprotectrices car elle dégrade l'hème en bilirubine et biliverdine qui sont de puissants antioxydants (Choi et Alam, 1996). Lorsque le déséquilibre est plus important (Etape II), il y a activation des voies de signalisation MAPK et NF-κB, sensibles au potentiel redox de la cellule. Ces facteurs de transcription participent à l'induction de la réponse pro-inflammatoire, notamment par l'induction de l'expression de cytokines et de molécules d'adhésion. Finalement, en cas de stress oxydant important, traduit par un déséquilibre prononcé dans le rapport GSH/GSSG (Etape III), un effet toxique est mesurable, notamment par des perturbations de perméabilité mitochondriale conduisant à une désorganisation de la chaîne de transport d'électron qui entraîne l'apoptose ou la nécrose de la cellule par relargage de facteurs pro-apoptotiques par les mitochondries (Imrich et al., 2007; Li et al., 2008; Valavanidis et al., 2008).

Au niveau des poumons, les systèmes de défenses contre le stress oxydant sont très importants du fait de leur constante exposition aux polluants atmosphériques. Quand un polluant atteint les poumons, il va tout d'abord entrer en contact avec le surfactant. Celui-ci constitue donc une première barrière de défense anti-oxydante vis-à-vis des polluants atmosphériques. Toutefois, il peut après une exposition à des polluants être lui-même source d'autres molécules oxydantes telles que les produits de peroxydation lipidique qui peuvent altérer les cellules pulmonaires.

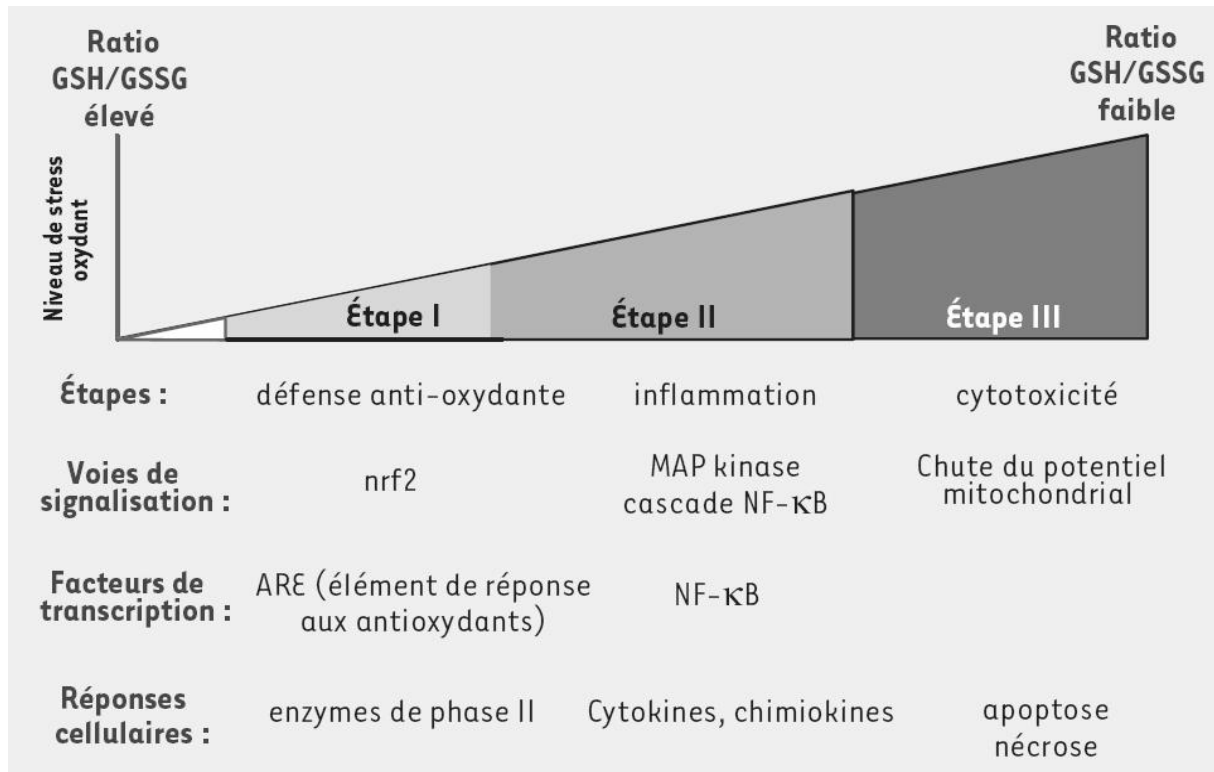


Figure I-9: Hiérarchisation des phénomènes biologiques en fonction du ratio GSH/GSSG (Baeza et Marano, 2007)

IV.2.5. Induction du stress oxydant par les particules

L'implication du stress oxydant dans le mécanisme d'action des particules a été mise en évidence dans divers modèles cellulaires. Shi et al (2006) ont démontré que les particules, PM_{2,5-10} et PM_{2,5}, prélevées dans deux zones différentes, rurale et urbano-industrielle, de l'Allemagne avaient la capacité de produire des radicaux hydroxyles et d'induire la formation de 8-OHdG et de cassures de brin d'ADN dans les cellules épithéliales pulmonaires humaines (A549) (Shi et al., 2006). Toutefois, ces particules montrent une variabilité considérable en fonction de l'endroit et du temps de prélèvement. Les cassures de brin d'ADN semblent être corrélées avec les capacités des particules à générer un radical hydroxyle mais présentent des profils différents pour les échantillons ruraux versus urbains/industriels. En effet, les particules diesel (PDi) peuvent être à l'origine de la génération de radicaux libres (HO[•] et O₂^{•-}) et d'ERO non radicalaires (H₂O₂) par des cellules pulmonaires endothéliales humaines et par les cardiomyocytes (Bai et al., 2001; Knuckles and Dreher, 2007). Des travaux réalisés au sein de notre laboratoire ont montré que les PM_{2,5} prélevées en zone urbano-industrielle induiraient le stress oxydant lors de leur exposition au cellules épithéliales pulmonaires humaines (L132 et A549) (Dagher et al., 2006; Kouassi et al., 2010). Les recherches visant à

identifier les effets des particules impliquent la mesure des caractéristiques des particules pouvant induire un stress oxydant. En effet, les particules sont composées d'un ensemble hétérogène de composés organiques (e.g. HAP, COV) et les métaux (Billet et al., 2007; Valavanidis et al., 2008). La taille joue un rôle important dans l'induction des effets biologiques car les particules les plus fines seraient capables de traverser les barrières de l'organisme et pénétrer dans les cellules voire dans les organites qui les composent. En effet, des observations en microscopie électronique comparant la pénétration des PM₁₀, PM_{2,5} et PM_{0,1}, montrent que les particules ultrafines peuvent être localisées dans les mitochondries entraînant ainsi leur altération (Li et al., 2003). Cette altération de ces organites contribuerait à la production d'ERO et donc à l'induction d'un stress oxydant. Parallèlement à la taille, il faut aussi considérer la surface spécifique qui traduit mieux les effets biologiques potentiels des particules. De nombreuses études ont montré que la capacité des particules ultrafines à générer des ERO en condition acellulaire est liée à l'augmentation de surface spécifique donc de la réactivité de surface (Brown et al., 2001; Wilson et al., 2002). *In vitro* une étude a montré que les particules ultrafines de carbone induisent une baisse du taux de glutathion dans des cellules épithéliales alvéolaires humaines de type II (A549) indiquant un stress oxydant alors que les fines n'ont pas d'effet sur les taux de glutathion réduit (Stone et al., 1998). Une étude sur les cellules A549 et différentes tailles de particules de TiO₂ montre que les particules les plus fines génèrent un stress oxydant alors que les plus grosses ne l'induisaient pas (Singh et al., 2007). *In vivo*, on constate le même effet des particules ultrafines sur les cellules des poumons de rats (Li et al., 1999).

Une corrélation a été établie entre la composition des particules en molécules à potentiel redox élevé et leur capacité à induire un stress oxydant dans les macrophages et les cellules épithéliales bronchiques (Li et al., 2003). Ces particules, et les substances qui les composent sont en partie responsables de la toxicité des particules sur les cellules (Li et al., 2003; Xia et al., 2004). En présence des formes ioniques du fer et de NADH, un cycle redox se met en place et produit de l'H₂O₂ et le radical hydroxyl HO[•]: c'est la réaction de Fenton (production de HO[•] à partir de H₂O₂ en présence de Fe²⁺ ou Cu⁺) (Bolton et al., 2000; Squadrito et al., 2001).

Les HAP présents dans les PDI peuvent également être convertis en quinones via les processus de biotransformation à travers l'action du cytochrome P450 1A1, de l'époxy hydrolase et de la dihydrodiol déhydrogénase (Li et al., 2008). Les PM₁₀ présentant une teneur élevée en métaux (cuivre) induisent, *in vitro*, l'activation du facteur de transcription NF-kB, utilisé comme indicateur de l'induction d'un stress oxydant, dans des cellules

épithéliales humaines (lignée BEAS-2B) (Baeza-Squiban et al., 1999). *In vivo* l'instillation de PM_{2,5} chez des humains en bonne santé entraînent une inflammation des voies respiratoires caractérisée par une production d'ERO. Les auteurs suggèrent donc l'importance de ce métal dans le déclenchement de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et TNF- α) via la production d'ERO (Schaumann et al., 2004). D'autres métaux semblent plus spécifiquement impliqués dans des phénomènes de stress oxydant, notamment des dommages à l'ADN. Pendant 1 an, l'exposition aux PM_{2,5} de 49 étudiants de l'université de Copenhague a été suivie. Après analyse de la composition en Cr, Fe, Ni, Cu, V et Pt des PM_{2,5} et des dommages sur l'ADN des lymphocytes prélevés chez les étudiants, les auteurs ont montré l'importance du Cr et du V dans les altérations de l'ADN (Sørensen et al., 2005).

IV.3. L'inflammation

L'inflammation est une réponse biologique complexe de type défense immunitaire stéréotypée de l'organisme face à une agression par : (1) un agent pathogène exogène qui peut être infectieux, de type biochimique, une atteinte physique ou chimique, (2) un agent endogène (cellules endommagées). En cas de dysfonctionnement des systèmes de défense et/ou en cas d'un épisode de forte concentration en particules atmosphériques, celles-ci peuvent s'accumuler dans le système respiratoire. Cette accumulation va déclencher une réaction inflammatoire locale, contrôlée par l'interaction de nombreux médiateurs, qui peut s'étendre au niveau systémique et entraîner des pathologies. De plus, la présence des particules peut entraîner une modulation de la réponse immunitaire vis-à-vis d'un agent pathogène. Ainsi, on peut distinguer deux types d'action potentielle des particules sur la réponse inflammatoire : (1) une action directe en tant qu'agent pathogène exogène (2) une action indirecte en tant que modulateur de la réponse inflammatoire.

IV.3.1. La réaction inflammatoire

L'effet principal de la réaction inflammatoire est d'amener les phagocytes sur le lieu de l'inflammation. La mobilisation des phagocytes circulants (polynucléaires neutrophiles, monocytes et macrophages) a lieu lors de la phase vasculo-sanguine qui se déroule comme suit :

- Congestion active : vasodilatation artérielle et dilatation des capillaires par un mécanisme nerveux et la sécrétion d'amines vasoactives (histamine, sérotonine) par les mastocytes et les basophiles qui entraînent une augmentation du débit sanguin.

- Formation d'un œdème inflammatoire : observation d'une augmentation locale de la pression hydrostatique qui permet le passage de plasma dans le milieu interstitiel et la formation de l'œdème. L'œdème permet une dilution du foyer inflammatoire, la limitation du foyer par une barrière fibrineuse et un ralentissement local du courant circulatoire qui facilite le passage des phagocytes du flux circulatoire au foyer de l'inflammation.
- Diapédèse: à la surface des cellules épithéliales on observe, du fait, de l'action de médiateurs chimiques (cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, notamment) l'expression de molécules d'adhésion (sélectine, ICAM-1 (Inter-Cellular Adhesion Molecule 1)). Ces molécules permettent l'adhésion des phagocytes mobilisés arrivant par le flux circulant avant la traversée des parois vasculaires par diapédèse. A la phase précoce de la réaction inflammatoire, les cellules mobilisées le plus rapidement, donc prédominantes, sont les polynucléaires neutrophiles alors que les macrophages sont présents plus tardivement. Ces cellules phagocytent les pathogènes qu'ils soient endo- ou exogènes ce qui permet par la suite leur élimination. Dans le cas d'une inflammation pulmonaire, les phagocytes chargés en particules sont éliminés par le phénomène de clairance pulmonaire (Bevilacqua et al., 1994); Baulig, 2004a).

Au niveau pulmonaire, la réaction inflammatoire peut être due au fait que les particules fines peuvent pénétrer jusqu'aux bronches et aux alvéoles (Baulig, 2004b). Celle-ci va se traduire par: (1) une contraction des muscles lisses (congestion active), (2) une sécrétion en excès de mucus, (3) la contraction des muscles lisses qui favorise l'arrivée massive de cellules du système immunitaire dans le tissu pulmonaire par diapédèse, (4) la formation de l'œdème inflammatoire qui provoque un renflement localisé, (5) le renflement réduit alors le diamètre du tube bronchique. Ce phénomène physiologique complexe est induit et entretenu par de nombreux médiateurs sécrétés par les cellules du système immunitaire, à savoir : les macrophages alvéolaires et les cellules immunitaires du système circulatoire.

IV.3.2. Médiateurs de l'inflammation

La réponse inflammatoire implique l'interaction de nombreux médiateurs. Ces médiateurs ont soit une action synergique qui a pour effet d'amplifier la réaction, soit une action antagoniste qui freine la réaction. Ces médiateurs sont classés en trois groupes selon leur origine:

- cellulaire locale : amines biogènes (sérotonine et histamine) nécessaires à la vasodilatation mais aussi des médiateurs d'origines lipidiques dérivés de l'acide arachidonique (prostaglandines, thromboxanes et leucotriènes).

- plasmatique : produits du complément (C3b, une opsonine ; C5b-9, complexe d'attaque membranaire) et facteur de coagulation (fibrine).
- cellulaire : cette classe concerne essentiellement les cytokines. Les cytokines jouent un rôle essentiel dans les interactions entre les cellules. En conséquence, les cellules des tissus lésés produisent entre autres de l'histamine, de la sérotonine et des prostaglandines. Ces molécules sont à l'origine de la production en cascade de médiateurs indispensables à la mise en place et à l'entretien de l'inflammation. Par exemple l'interleukine1 (IL-1) et le facteur de nécrose tumorale (TNF- α) ont un rôle essentiel au cours d'une inflammation d'origine microbienne. Les macrophages et les polynucléaires recrutés grâce aux médiateurs chimiotactiques (leucotriènes, IL-8) éliminent les pathogènes. La réponse inflammatoire initie aussi le processus de cicatrisation tissulaire par le jeu de médiateurs. A l'opposé, d'autres facteurs permettant de limiter l'action des médiateurs proinflammatoires sont produits. Ces médiateurs anti-inflammatoires sont d'autres cytokines (IL-10, IL-4), des antagonistes de récepteurs membranaires des cytokines (tels que l'antagoniste du récepteur de l'IL-1), ou des formes solubles de récepteurs des cytokines (Baulig, 2004b).

IV.3.2.1. Les cytokines

a. Les familles de cytokines

Les cytokines sont des glycoprotéines de faibles poids moléculaire (8 à 50 kDa), solubles ou membranaires, qui permettent la communication entre les cellules participant aux divers processus physiologiques (prolifération, différenciation cellulaire, activation cellulaire et apoptose). 5 catégories peuvent être distinguées selon leur fonction ou les types cellulaires capables de les sécréter :

- Les Interleukines (IL) : elles sont sécrétées par les leucocytes, celles sécrétées par les lymphocytes sont nommées lymphokines et celles sécrétées par les monocytes ou les macrophages sont appelées monokines. Actuellement 35 interleukines ont été identifiées (Chen et al., 2006; Niedbala et al., 2007). Les fonctions de quelques une d'entres elles seront précisées ultérieurement.
- Les Interférons (IFN-) : au nombre de 4 (IFN- α , β , γ et ω), on leur prêtait initialement un rôle uniquement antiviral. Les interférons jouent un rôle dans l'immuno-modulation dans la mesure où ils peuvent inhiber ou induire la production d'anticorps par les lymphocytes B mais également activer les macrophages, les cellules NK (Natural Killer) et les lymphocytes T en participant au processus de présentation de l'antigène (Decker et al., 2002).

- Les chemokines : Ce sont généralement des cytokines de faibles poids moléculaires. Leur nomenclature est basée sur le nombre de cystéines, mais aussi leur espacement dans l'enchaînement des acides aminés constituant la chemokine (CC-L1 à CC-L28, CXCL1 à CXC-L16, XC-L1 & 2, CX3C-L1). Elles ont en commun d'avoir un pouvoir chimiotactique et la capacité d'activer les cellules de l'inflammation (Murphy et al., 2000).
- Facteurs stimulant les colonies (CSF) : stimulent la prolifération mais jouent aussi un rôle dans l'hématopoïèse. Le granulocyte CSF (G-CSF) est par exemple spécifique à la prolifération et à la différenciation de cellules souches qui donneront des granulocytes. De même, le macrophage CSF (M-CSF) active la différenciation des cellules souches en macrophages (Burgess and Metcalf, 1980; Hamilton, 2008).
- Facteur de nécrose tumorale (TNF- α et TNF- β) : sont des cytokines impliquées dans l'inflammation systémique et dans la réaction inflammatoire de phase aiguë (Tracey et al., 2008).

Bien que les cytokines remplissent un nombre important de fonctions différentes, elles présentent un grand nombre de caractéristiques communes.

b. Caractéristiques générales des cytokines

La plupart sont souvent produites à l'issue d'une activation cellulaire par l'antigène ou la substance mitogène. Dans ce cas, les cytokines sont synthétisées *de novo* et leur production passe nécessairement par la synthèse d'ARN. Une fois synthétisées, elles sont rapidement sécrétées par la cellule. Ainsi, leur mode d'action peut être autocrine (action sur les cellules sécrétrices elles-mêmes), paracrine (action sur d'autres cellules) tandis que les cytokines endocrines peuvent emprunter les systèmes circulatoires et agir sur des cellules éloignées. De plus, les cytokines agissent rarement seules, mais de manière conjointe avec d'autres. Leur mode d'action peut être : (1) additif, une cytokine va renforcer l'action d'une autre, (2) synergique, l'effet d'une cytokine va être de multiplier l'effet d'une première cytokine et enfin (3) antagoniste, une cytokine va venir inhiber l'effet d'une autre (Matsumoto and Kanmatsuse, 2000; Foster, 2001). Ces différents modes d'action sont à l'origine d'un réseau de communication intercellulaire qui conduit souvent à une production en cascade. L'illustration parfaite de ce réseau de communication, qui est également une des principales caractéristiques des cytokines, est la double ubiquité de ce type de molécule. Au niveau des cellules productrices, une même cytokine peut être produite par différents types cellulaires et une cellule peut produire différentes cytokines. D'autre part, au niveau des cellules cibles, les cytokines sont capables d'induire différents effets biologiques sur des types cellulaires

distincts, c'est la pléiotropie (Sun et al., 1999; Foster, 2001). Au contraire, plusieurs cytokines peuvent avoir le même effet biologique sur un même type cellulaire, c'est la redondance.

c. Récepteurs des cytokines

Le mécanisme d'action des cytokines sur les cellules cibles est comparable à celui des hormones peptidiques. En se fixant à des récepteurs membranaires spécifiques, une activation de seconds messagers intracellulaires se produit, suivie de l'induction d'une chaîne de réactions biochimiques qui aboutit à l'effet attendu de la cytokine. Les récepteurs aux cytokines sont des glycoprotéines transmembranaires constituées d'un domaine extracellulaire (NH₂ terminal), d'un domaine transmembranaire hydrophobe unique (sauf pour les récepteurs des chémokines qui en possèdent 7) et un domaine intracytoplasmique de longueur variable. La plupart des récepteurs ne possèdent pas d'activité kinase propre qui permet une transduction des signaux d'activation. L'intervention de kinases intracytoplasmiques est alors indispensable pour traduire l'effet de la cytokine considérée (Foster, 2001).

IV.3.2.2. Cytokines d'intérêts

Dans le cadre de ce travail, 4 cytokines ont été mesurées : l'IL-1 β , l'IL-8, le TNF- α , l'IL-6 du fait de leurs rôles dans le processus inflammatoire au niveau pulmonaire.

Dans le cadre de ce travail, 4 cytokines ont été mesurées : l'IL-1 β , l'IL-8, le TNF- α , l'IL-6 du fait de leurs rôles dans le processus inflammatoire au niveau pulmonaire.

- L'IL-1 β est une cytokine pro-inflammatoire souvent considérée comme une molécule d'alarme. Au niveau pulmonaire, elle est rapidement produite par les macrophages en réponse à un stimulus et induit l'expression de nombreux gènes aboutissant à la synthèse de protéines qui participent à l'induction de l'inflammation (Dinarello, 2002).

- L'IL-8 est un médiateur indispensable de l'activité inflammatoire des neutrophiles du fait de son rôle de chimio-attracteur. De plus, l'IL-8 intervient dans les pathogénèses liées à l'inflammation des voies respiratoires (Mukaida, 2003).

- Le TNF- α est une cytokine qui participe à la phase aiguë de l'inflammation, en effet, elle stimule la phagocytose des macrophages mais aussi la production d'IL-1 et de lipides proinflammatoires comme les prostaglandines (Tracey and Cerami, 1993; Tracey et al., 2008).

- L'IL-6 est une cytokine pro-inflammatoire qui intervient lors de la phase aiguë de l'inflammation (fièvre, mobilisation des leucocytes) (Heinrich et al., 1990) ; cependant elle intervient également comme une cytokine anti-inflammatoire dans la mesure où elle a un effet

inhibiteur sur l'action de l'IL-1 et du TNF- α qui sont des cytokines pro-inflammatoires (Tilg et al., 1994).

- L'interleukine 1

C'est une cytokine de 159 acides aminés (AA) ou 153 AA (17 kDa) (forme mature) suivant que l'on considère sa forme moléculaire α ou β . L'homologie de ces deux formes au niveau de leur séquence d'AA est assez faible (26 %). Cependant, malgré cette faible homologie de séquence, l'IL-1 α et l'IL-1 β se lient aux mêmes récepteurs. L'IL-1 est sécrétée par les macrophages mais aussi par les neutrophiles, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les lymphocytes T et B. Elle est sécrétée en réponse à différents stimuli tels que : le TNF- α , IFN- α , IFN- β , IFN- γ , les LPS (Lipopolysaccharides), des virus et tout autre antigène. C'est un médiateur incontournable de la réponse immunitaire et de l'inflammation : adhésion des monocytes et neutrophiles, chimio-attracteur des leucocytes, activation des cellules T helper, prolifération des lymphocytes B, etc. Son effet principal est d'induire la cyclo-oxygénase 2 (COX-2) qui converti l'acide arachidonique des membranes cellulaires en prostaglandines directement impliquées dans le processus inflammatoire (phase aiguë de l'inflammation), c'est une cytokine précoce de la réponse immunitaire face à une agression. L'IL-1 est aussi un puissant inducteur de la production d'un grand nombre de cytokines par différentes cellules. De ce fait, un certain nombre de ses activités biologiques sont vraisemblablement indirectes et résultent de l'effet d'autres cytokines (Dinarello, 2002).

- L'interleukine 8

L'IL-8 fait partie des plus petites cytokines avec 72 AA pour un poids moléculaire de 8 kDa. Cette chimiokine, également nommée CXCL8, est principalement sécrétée par les monocytes activés mais aussi par les macrophages, les fibroblastes et les cellules épithéliales. C'est une cytokine qui a une action chimio-attractrice sur l'ensemble des cellules immunitaires capables de migration (polynucléaires neutrophiles principalement) (Mukaida, 2003).

- Le facteur nécrose tumorale (TNF- α)

C'est une cytokine de 17 kDa. Le TNF- α est libéré principalement par les leucocytes et les lymphocytes T activés mais aussi dans une moindre mesure par les cellules endo- et épithéliales. Il possède plusieurs actions pro-inflammatoires sur divers organes et systèmes, généralement en coopération avec l'IL-1 et l'IL-6 :

- sur le foie, stimulation de la phase de réponse aiguë de l'inflammation qui provoque notamment l'augmentation de la concentration en protéine C réactive. Ce sont des protéines qui permettent notamment d'opsoniser les antigènes en vue de leur phagocytose et donc de recruter les neutrophiles.

- sur les macrophages en stimulant la phagocytose. Une activité biologique majeure du TNF est de provoquer la lyse de cellules tumorales par nécrose ou apoptose (Tracey and Cerami, 1993; Tracey et al., 2008).

- L'interleukine 6

C'est une cytokine de 185 AA (21,5 à 28 kDa). Bien qu'elle soit sécrétée par différents types cellulaires, l'IL-6 est majoritairement sécrétée par les monocytes, les fibroblastes et les cellules épithéliales stimulées ; après stimulation, les macrophages, les lymphocytes B et les lymphocytes T sont capables de sécréter l'IL-6. Tout comme l'IL-1 β elle est impliquée dans la phase aiguë de l'inflammation en induisant la production de protéines par les hépatocytes. Les protéines de la phase aiguë de l'inflammation sont constituées d'une trentaine de protéines aux diverses fonctions : des protéines inhibitrices de protéases (alpha-1 antitrypsin), des protéines modulatrices de la coagulation (antithrombine-3), des protéines composantes du complément (C2, C4, C9, Facteur B) et des protéines activatrices des macrophages (LPS Binding Protein, LBP) (Ruminy et al., 2001). Il existe deux types de protéines de la phase aiguë : le type I, qui pour être synthétisé en quantité, nécessite l'action synergique de l'IL-1 et de l'IL-6 et le type II, qui pour une induction maximale ne nécessite que l'action de l'IL-6 (Gruys et al., 2005).

L'IL-6 est le médiateur le plus important lors de la phase aiguë de l'inflammation de par son nombre de fonctions (pyrétiq). Cette cytokine intervient dans la réponse immunitaire innée et est sécrétée par les macrophages en réponse à un PAMP. Cette cytokine possède également un rôle régulateur dans la mesure où elle induit la différenciation des lymphocytes B et l'activation/différenciation des lymphocytes T en cellules cytotoxiques (Goulaouic, 2009)

IV.3.3. Effets inflammatoires des particules

IV.3.3.1. Effets *In vivo*

Afin d'élucider la relation de cause à effet entre une exposition à des particules et la réponse de l'organisme, des études *in vivo* ont été réalisées sur des animaux de laboratoire, mais aussi dans quelques cas, sur des volontaires humains exposés à des particules dans des conditions contrôlées. La plupart des études relatives à la relation entre les particules et la

réponse inflammatoire réalisées *in vivo* portent sur les particules de Diesel, les PM₁₀ (Saber et al., 2006; Barlow et al., 2008) et plus récemment sur les PM_{2,5}. A titre d'exemple, concernant les PM_{2,5}, suite à des instillations intra-trachéales de suspension de particules, une augmentation de la production en TNF- α et IL-6 a été mesurée dans les lavages broncho-alvéolaires de rats Wistar, de même qu'une diminution de la capacité de phagocytose des macrophages traduisant le déclenchement d'une réaction inflammatoire (Huang et al., 2008). Chez l'Homme, des expositions chez un sujet sain pendant 2h (concentrations en PM_{2,5} comprises entre 23 et 311 $\mu\text{g}/\text{m}^3$), induisent une augmentation du nombre de polynucléaires neutrophiles dans les lavages broncho-alvéolaires, ainsi qu'une diminution de viabilité de ces cellules correspondant également à des symptômes inflammatoires (Ghio et al., 2003; Holgate et al., 2003). Des expositions de rats sains et adultes, pour 6 h/j pendant 3 jours, à des particules de suie et/ou de fer, ont montré une interaction synergique entre ces particules (45 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ pour le fer pour une concentration en masse totale de 250 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) expliquant des réponses biologiques significatives tels que le stress oxydant, l'augmentation d'IL-1 β , du cytochrome P450 et l'activation du NF- κ B (Smith et al., 2003; Zhou et al., 2003) ont déterminé la cytotoxicité et la réponse pro-inflammatoire des fractions de particules fines et ultrafines (Fresno, Californie) dans les poumons des rats Sprague-Dawley. Les particules ont été principalement riches en nitrates d'ammonium, carbone organique et élémentaire, et en métaux.

Ces études *in vivo* montrent que les particules atmosphériques et notamment les PM_{2,5} ont un effet inflammatoire. L'étude mécanistique du processus d'action des particules nécessite quant à lui une approche *in vitro*.

IV.3.3.2. Effets *In vitro*

Les particules atmosphériques induisent une inflammation au niveau pulmonaire, les études *in vitro* portent donc principalement sur des cellules de types épithéliales (16-HBE, A549, BEAS-2B AEC, L132, NHBE,...) et de type monocytes/macrophages (HPBMC, J774.4, RAW364.7, THP-1, U937, macrophages alvéolaires humains ou d'animaux issus de lavages broncho-alvéolaires,...). Les particules étudiées sont de deux types :

- des particules standards de caractéristiques connues comme les PDi et les particules de carbone (Printex 90 et Hubber 990 notamment) (Monteiller et al., 2007; Li et al., 2010)
- des particules de l'environnement, à savoir les PM₁₀ (Brown, Donaldson, and Stone, 2004)) et plus récemment les PM_{2,5} (Payne et al., 2004; Garçon et al., 2006; Fuentes-Mattei et al., 2010).

Plus particulièrement, les particules atmosphérique $PM_{2,5}$ ont ainsi révélé un effet pro-inflammatoire, à la fois sur des cellules épithéliales en culture et sur les cellules de type macrophagique. Dans notre laboratoire une étude réalisée sur les cellules humaines épithéliales L132, exposées pendant 24h à des $PM_{2,5}$ (collectées dans la région de Dunkerque) à des concentrations de 18,84 à 75,36 $\mu\text{g/mL}$, secrètent des quantités de $\text{TNF-}\alpha$ supérieures aux cellules non exposées (Garçon et al., 2006). De même, des expositions aux particules atmosphériques EHC-93 induisent la sécrétion de $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 et GM-CSF par des monocytes humains provenant de lavages broncho-alvéolaires (van Eeden et al., 2001). Au contraire, à la concentration de 500 $\mu\text{g/mL}$, les auteurs ont constaté une chute significative de la sécrétion de ces trois cytokines (Payne et al., 2004). La plupart des résultats, montrent une induction significative de la sécrétion de cytokines et indiquent donc un processus d'inflammation initié par les cellules épithéliales et les monocytes/macrophages suite à une exposition (entre 9 et 24 heures) à des particules (de 50 à 100 $\mu\text{g/mL}$). Les résultats ne semblent pas être différents que l'on considère le type cellulaire et/ou le type de particules. Aucun effet ne semble observable pour des concentrations de particules inférieures à 10 $\mu\text{g/mL}$. Cependant, très peu d'études portent sur de telles concentrations (Mitschik et al., 2008).

Outre les particules elles-mêmes, c'est le rôle des caractéristiques physiques et des composés constituant les particules qui est maintenant le plus étudié.

IV.3.3.3. Influence de la taille et de la réactivité de surface

Actuellement, beaucoup de recherches s'appliquent à déterminer les caractéristiques qui rendent un type de particules plus toxique qu'un autre. Plusieurs études mettent ainsi en évidence des effets biologiques délétères plus importants pour les particules les plus fines (à composition identique). Les particules de noir de carbone (Carbon Black, CB) printex 90 (particule ultrafine, ufCB) et Hubber 990 (particule fine, CB) sont souvent utilisées comme modèle de particules atmosphériques et diffèrent essentiellement de par leur taille. Une étude comparative de leurs effets sur des cellules épithéliales humaines (A549) à des concentrations allant de 15 à 250 $\mu\text{g/mL}$, durant 24 heures, montre des augmentations de sécrétions d'IL-8 variables selon la taille. Pour les cellules exposées aux CB, seule la dose la plus élevée conduit à une augmentation significative. Au contraire, les ufCB induisent une sécrétion croissante pour les concentrations de 15, 31 et 63 $\mu\text{g/mL}$, mais les concentrations en IL-8 dans le milieu diminuent pour les concentrations de 125 et 250 $\mu\text{g/mL}$ (Monteiller et al., 2007). Brown et al (2004) ont exposé des macrophages alvéolaires de rat, à des concentrations

d'ufCB (Printex 90) de 25 à 200 µg/mL pendant 4 heures pour étudier l'effet des particules ultrafines. L'effet pro-inflammatoire des ufCB a été suivi par la mesure de TNF- α dans le milieu. Les résultats montrent un effet-dose dès 25 µg/mL (Brown, Donaldson, Borm, et al., 2004). *In vivo*, des rats Wistar exposés aux particules ultrafines de noir de carbone pendant 7 heures ont présentés un nombre plus important de leucocytes pulmonaires que ceux exposés aux particules fines (Gilmour et al., 2004). Au-delà de la taille, c'est la surface spécifique qui détermine l'activité biologique des particules ; plus cette surface est élevée, plus il y aura de sites de réactions possibles avec le milieu environnant (Koike and Kobayashi, 2006). De plus, des cellules épithéliales A549 exposées à des particules de quartz de différentes réactivités de surfaces sécrètent d'autant plus d'IL-6 et d'IL-8 que la réactivité est élevée (Hetland et al., 2001).

IV.3.3.4. Influence des composés adsorbés sur les particules

Les composés organiques tels les HAP constituent une part importante dans la composition des particules formées par combustion. Il a été montré grâce à l'étude des PDI, connues pour leur forte teneur en HAP, que ces composés étaient responsables de réactions pro-inflammatoires (Bonvallot et al., 2001; Nel et al., 2001). Les métaux associés aux particules sont également responsables de phénomènes inflammatoires au niveau des poumons. Ainsi, des extraits aqueux de particules collectées pendant le fonctionnement intermittent d'une aciérie (dans la vallée de l'Utah), ont été instillés à des volontaires sains. Il en a résulté une inflammation pulmonaire pour les volontaires exposés aux extraits de particules collectées lors du fonctionnement de l'aciérie alors que les extraits collectés lors des périodes de non activité de l'aciérie n'ont pas eu d'effet. Cette inflammation a été mise en relation avec les fortes teneurs en métaux (Fe, Cu, Ni, Pb, V et Zn principalement) des particules (Dye et al., 2001; Ghio and Devlin, 2001; Ghio, 2004). Une approche *in vitro*, avec ces mêmes extraits sur des cellules épithéliales humaines (BEAS-2B) révèle une induction de l'expression de l'IL-6 et de l'IL-8 pour les extraits datant de la période de fonctionnement de l'aciérie, toujours en relation avec les métaux présents (Frampton et al., 1999). Les particules atmosphériques contiennent également un grand nombre de molécules d'origines biologiques telles les endotoxines et des spores qui s'adsorbent plus particulièrement sur les PM₁₀, et dans une moindre mesure sur les PM_{2,5} (Soukup and Becker, 2001; Schwarze et al., 2006). Ces composés ont aussi un effet pro-inflammatoire. En effet, par l'utilisation d'un inhibiteur du TLR-2 (Toll-like récepteur 2), un des récepteurs aux endotoxines, la sécrétion d'IL-8 par des

macrophages alvéolaires humains exposés à des particules atmosphériques a été diminuée (Becker et al., 2005).

Des aberrations épigénétiques, notamment au niveau de l'acétylation des histones et de la méthylation de l'ADN, sont souvent retrouvées associées à l'initiation et/ou à la progression de tumeurs. Des études ont montré que le génome de tumeurs ou de tissus hyperplasiques prétéumoraux est hypométhylé globalement, et hyperméthylé localement. Ces mécanismes pourraient contribuer à la carcinogénèse via l'inhibition des gènes suppresseurs de tumeurs (hyperméthylation des îlots CpG des promoteurs de ces gènes), la surexpression des oncogènes et/ou une diminution de la stabilité du génome (Counts and Goodman, 1995).

L'étude des mécanismes épigénétiques impliqués dans le développement des tumeurs s'est intensifiée ces dernières années (Clark, 2007; Lopez-Serra and Esteller, 2008; Vucic *et al.*, 2008). De nouvelles stratégies thérapeutiques très prometteuses consistent à corriger ces anomalies épigénétiques à l'aide de composés modulant l'acétylation des histones et la méthylation de l'ADN. Des inhibiteurs de ces mécanismes constituent ainsi une classe grandissante de composés anticancéreux (Allen, 2007; Kim *et al.*, 2006; Pali and Robertson, 2007).

OBJECTIFS DU TRAVAIL

La pollution particulaire constitue un véritable problème de santé publique. Dans les agglomérations des pays en développement, la situation est devenue très préoccupante en raison de l'accroissement des rejets majoritairement attribuable au trafic automobile vétuste. Le Sénégal n'est pas en reste où la ville de Dakar est caractérisée par un trafic dense et un parc automobile à 70% constitué de véhicules de plus de 10 ans. De nombreuses études épidémiologiques ont mis en évidence la relation entre l'exposition aux particules atmosphériques et l'apparition des pathologies cardiorespiratoires chez l'homme. Des travaux récents ont attribué à la fraction fine des particules comme majoritairement responsable de leur toxicité globale des aérosols. Aussi, cette toxicité des aérosols dépend de la composition chimique elle-même dépendante de leur source d'émission. Afin de comprendre les mécanismes d'actions sous-jacents impliqués dans la toxicité des aérosols, de nombreuses études *in vitro* ont été réalisées sur les cellules épithéliales pulmonaires dans certaines régions. En revanche peu d'études ont été effectuées sur les aérosols de l'Afrique Sub-saharienne dont aucune au Sénégal.

Le travail de recherche entrepris dans cette étude consiste à évaluer la toxicité *in vitro* des particules atmosphériques prélevées à Dakar au Sénégal sous influence automobile. Pour ce faire nous avons :

- Effectué des prélèvements de particules par impacteur en cascade haut débit sur deux sites urbains (Fann, P₁ et Faidherbe, P₂) et sur un site rural (R)
- Effectué une caractérisation physico-chimique de nos aérosols notamment par la détermination de sa granulométrie, de sa surface spécifique, de sa composition en éléments inorganiques et organiques et en ion solubles
- Déterminé sa cytotoxicité globale sur un modèle de culture de cellules épithéliales pulmonaires humain (lignée cellulaire BEAS-2B)
- Étudié la biotransformation subie par la fraction organique adsorbée à la surface des particules, en recherchant l'induction de l'expression génique des enzymes du métabolisme des xénobiotiques (i.e. CYP 1A1, CYP 2E1, CYP 2F1, NQO1)
- Déterminé sa capacité à induire un stress oxydant par l'étude de certains marqueurs du stress oxydant (MDA, statut du Glutathion),

Chapitre I : Rappels bibliographiques sur la pollution atmosphérique

- Déterminé la réponse inflammatoire par l'induction génique et la sécrétion des médiateurs pro et anti-inflammatoire

Chapitre II :
Partie expérimentale

Chapitre II : Partie expérimentale

METHODOLOGIE GENERALE DE L'ETUDE

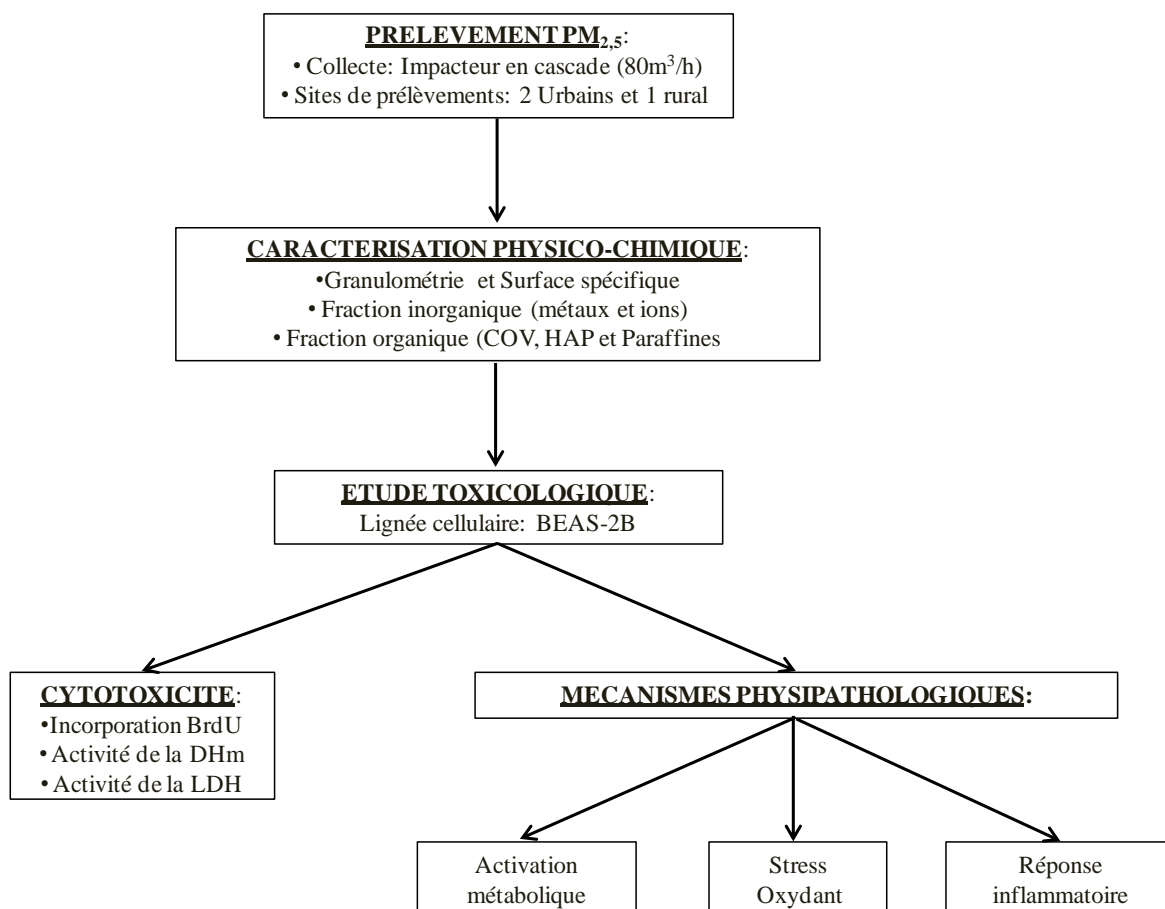


Figure II-1 : Schéma de la méthodologie générale de l'étude

Le schéma ci-dessus (**Figure II-1**) résume la méthodologie générale de notre travail. En effet l'étude de la toxicité d'un aérosol particulaire d'origine urbaine a nécessité le prélèvement d'une quantité importante d'échantillon dans la ville de Dakar. De plus, cette collection de particules sans utilisation de filtre, susceptible d'engendrer une toxicité cellulaire, devait répondre à une granulométrie très précise : la fraction fine de l'aérosol (PM_{2,5}) capable de pénétrer profondément et atteindre la région alvéolaire (Harrison and Yin, 2000). Par ailleurs, même si la granulométrie reste un paramètre fondamental dans l'étude de la toxicité d'un aérosol, du fait de la complexité des particules atmosphériques, il s'avère tout aussi important de mieux connaître les principales phases qui constituent l'aérosol urbain dont nous recherchons la toxicité. C'est pourquoi nous avons choisi de réaliser une caractérisation physico-chimique en utilisant plusieurs techniques. Ainsi la granulométrie a été réalisée par Microscopie Electronique à Balayage couplée à une sonde d'analyse X (MEB-EDX) et par granulométrie laser; la surface spécifique de l'échantillon

étant, quant à elle, mesurée par porosimétrie à azote. La composition élémentaire et ionique est recherchée par Spectrométrie de Masse couplée à un Plasma inductif (Inductively Coupled plasma Mass Spectrometry, ICP-MS) et Chromatographie Ionique (CI). Par la Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (Gas Chromatography-Mass Spectrometry GC-MS), nous avons déterminé la composition en éléments organiques de nos particules.

L'évaluation de la toxicité *in vitro* de nos particules sur les cellules pulmonaires humaines, a porté sur les tests de cytotoxicité grâce à trois méthodes complémentaires : l'incorporation à l'ADN de la 5-Bromo-2'-désoxyUridine (BrdU), l'activité de la DésHydrogénase mitochondriale (DHm), l'activité de la LacticoDésHydrogénase (LDH) extracellulaire. A l'issue de ces tests nous avons choisi deux concentrations qui encadrent la concentration effet à 10% en vue de la détermination des mécanismes physiopathologiques. L'étude des mécanismes physiopathologiques a porté sur la capacité de nos particules à induire une expression génique des enzymes impliquées dans la biotransformation de la fraction organique adsorbée en leur surface (HAP et COV) par méthode PCR en temps réel, à induire un stress oxydant via la peroxydation des lipides membranaires (Malondialdéhyde, MDA) et du statut du glutathion (GSSG/GSH) par HPLC et une réponse inflammatoire via l'expression et la sécrétion des cytokines par PCR à temps réel et méthode ELISA.

I. Caractérisation physico-chimique

I.1. Site et méthodes de prélèvements

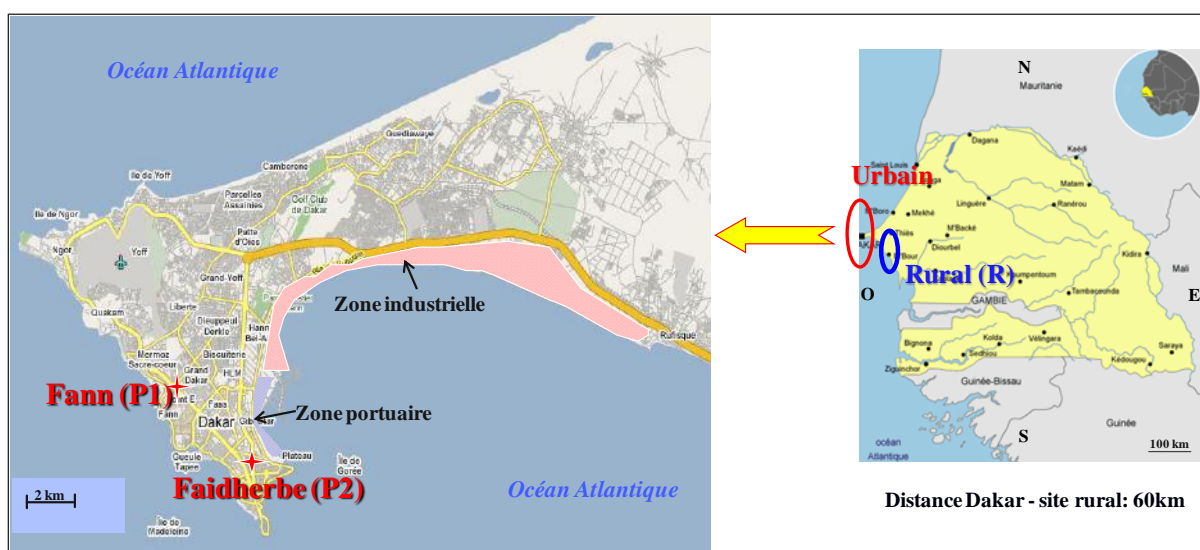


Figure II-2 : Sites de prélèvements

L'agglomération de Dakar, a été choisie comme cadre d'étude. C'est sur une presqu'île à écosystème de savane sèche de 550 km² qui concentre une population de près 2,6 millions d'habitants et 80% des industries nationales. Le trafic automobile est particulièrement dense et vétuste (70% des véhicules ont plus de 10 ans). La majorité des trajets motorisés (86%) est assurée par des véhicules de transport en commun (« cars rapides »), qui pour la plupart utilisent du carburant diesel (90%) (Banque Mondiale, 2003). Les PM ont été prélevées à l'aide d'un impacteur en cascade de type Sierra 235 (Sierra Anderson, Smyrna, USA), comportant 5 étages, et d'une pompe aspirante haut débit (80m³/h) modèle TFIA (Staplex, New York, USA). Cette technique de collecte sélective permet une ségrégation des aérosols en fonction de leur taille. Les prélèvements ont été réalisés sur deux sites urbains, Fann ou P₁ (14° 41' 47" N; 17° 27' 57" W) et Faidherbe ou P₂ (14° 40' 31" N; 17° 26' 15" W) dans la ville Dakar au Sénégal et sur site rural (Ngaparou ou R), situé à 60 km au Sud de Dakar (14° 27' 53" N; 17° 30' 36" W), choisi comme site témoin (**Figure II-2**). Nous disposons de deux impacteurs pour la campagne de prélèvement : un pour le site rural et un autre en alternance chaque semaine pour les sites urbains. Les sites, urbains caractérisés par un trafic automobile dense, sont principalement différents par le type de véhicules qui y circulent. A Fann (P₁) la majorité du trafic est faite de véhicules de transport en commun (« cars rapides »), alors qu'à Faidherbe (P₂) ils sont absents et le trafic est presque totalement assuré par les véhicules particuliers. La pompe est placée sur un support de 1,50 mètre environ de hauteur, à environ 3 mètres de la voie. Les prélèvements ont été effectués uniquement la journée avec un temps de prélèvement de 8 heures par jour sur une période de trois mois. Cette période qui va de fin juillet à début octobre 2009, correspond à la saison des pluies au Sénégal. Les particules a été récupérées des plaques 48h après séchage puis conservées -20°C. Les masses de particules obtenues pour les trois sites sont respectivement 406 mg, 756 mg et 1063 mg de particules pour le site Rural (Ngaparou, R), Fann (P₁) et Faidherbe (P₂).

Il est à noter que la campagne de prélèvements ne s'est pas faite sans difficulté. En effet un arrêt systématique du prélèvement est observé en milieu urbain en cas de pluie, faute de protection des appareils. De plus les nombreux délestages électriques constatés pendant cette période ont également constitué un facteur limitant.

I.2. Méthodologie d'analyse des caractéristiques physiques

I.2.1. Granulométrie

L'analyse granulométrique des particules a été réalisée par deux méthodes complémentaires : MEB-EDX et granulométrie par diffusion laser.

I.2.1.1. Méthode par Microscopie Electronique à Balayage couplée à une sonde d'analyse X (MEB-EDX)

a. Principe

Le principe de la microscopie électronique à balayage est schématisé sur la **Figure II-3**. Lorsque le faisceau d'électrons pénètre dans l'échantillon, les électrons sont diffusés plus ou moins profondément en fonction de la composition de la matière (numéro atomique) et de la tension d'accélération du faisceau (énergie du faisceau). Des détecteurs collectent les électrons secondaires et rétrodiffusés générés lors du balayage de l'échantillon par le faisceau. Les photons X également émis après excitation sont détectés par un spectromètre dispersif en énergie (EDX). Les spectres d'émission de rayons X présentent des pics caractéristiques des éléments présents au sein de l'échantillon.

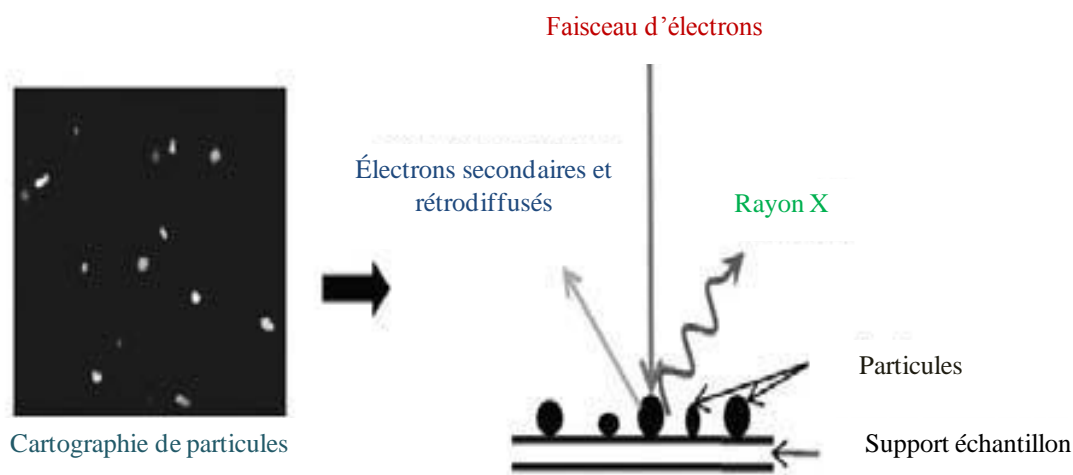


Figure II-3 : Schéma du principe de la microscopie électronique à balayage

b. Protocole

Préparation de l'échantillon

Une petite quantité d'échantillon (~ 1 mg) est mise en suspension dans du n-hexane et leur dispersion est effectuée sous ultrasons. La suspension est ensuite filtrée sur une membrane en polycarbonates (Nuclepore ®) de porosité 0,45 µm. Une partie de la

membrane est ensuite fixée sur un plot en aluminium de 1 cm de diamètre. L'échantillon est ensuite métallisé au carbone de manière à le rendre conducteur puis est placé dans la chambre du microscope.

Conditions analytiques

Les analyses ont été effectuées sur un appareil LEO 438 VP muni d'un détecteur X Gresham

- Détermination des profils granulométriques et examen morphologique des particules.

Pour l'étude de la taille des particules et de leur morphologie, les paramètres fixés sont un courant de faisceau de 20 pA et une tension d'accélération de 25 keV. Le profil granulométrique des échantillons a été établi suite au comptage et la mesure de taille d'une quantité de particules comprises entre 1500 et 2500. La détermination de la taille des particules est retirée de la mesure de la surface occupée par la particule sur le filtre support. A partir des valeurs de surface, les diamètres de particules sont calculés en assimilant au préalable les particules à des sphères.

- Analyse de composition des particules

Lors de l'analyse individuelle des particules, le courant de faisceau est élevé à 200 pA dans le but d'augmenter l'intensité des signaux d'électrons rétrodiffusés mais aussi celle des raies d'émission des éléments détectés. Le grandissement est fixé à $\times 3000$ ou $\times 3500$, ce qui permet de considérer des particules de taille comprise entre 0,2 et 10 μm de diamètre.

De façon à obtenir des informations représentatives sur les échantillons selon sa complexité, environ 1000 particules ont été analysées par échantillon. Ce critère suit les recommandations de (Mamane et al., 2000).

L'échantillon est d'abord décomposé en plusieurs champs d'analyse, puis pour chaque particule située dans un champ, un spectre de rayons X est acquis et analysé. La tension d'accélération appliquée permet de couvrir un grand nombre d'éléments du tableau périodique. Néanmoins, la détection des éléments légers tels que $Z < 8$ (H, C, N, O, ...) n'a pas été prise en compte dans ce travail et ceci pour deux raisons principales. D'abord, la forte tension d'accélération appliquée empêche une exploitation fiable des raies correspondantes à ces éléments légers. De plus, lors de la préparation de l'échantillon une couche de carbone est utilisée pour le recouvrir. La quantité de carbone détectée dans ce cas, n'est pas liée à l'échantillon (phase de métallisation).

Les conditions d'analyse individuelle sont adaptées pour l'analyse des éléments : Na, Mg, Al, Si, P, S, Cl, K, Ca, Ti, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn et Pb. Néanmoins, la sensibilité de l'analyse X ne permet que la détection des éléments majoritaires au sein de la particule, sans parvenir à la détection des éléments présents à l'état de traces.

L'ensemble des résultats d'analyses est ensuite traité statistiquement à l'aide du logiciel IDAS (Bondarenko *et al.*, 1996). Une Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) est réalisée sur l'ensemble des données et permet de regrouper les particules de composition chimique proche. Ce traitement aboutit ainsi à la connaissance des types de particules composant l'échantillon, ainsi que de leur abondance

I.2.1.2. Granulométrie par diffraction laser

a. Principe

Le principe de cette méthode repose sur la théorie de la diffusion de Mie. Elle prend en considération l'ensemble des phénomènes optiques liés à la diffusion des particules (diffraction, réfraction, réflexion). Le calcul de l'image de diffusion dépendra dans ce cas non seulement de la distribution granulométrique théorique considérée, mais également de la nature du matériau diffusant, par l'intermédiaire de ses propriétés optiques (Figure II-4).

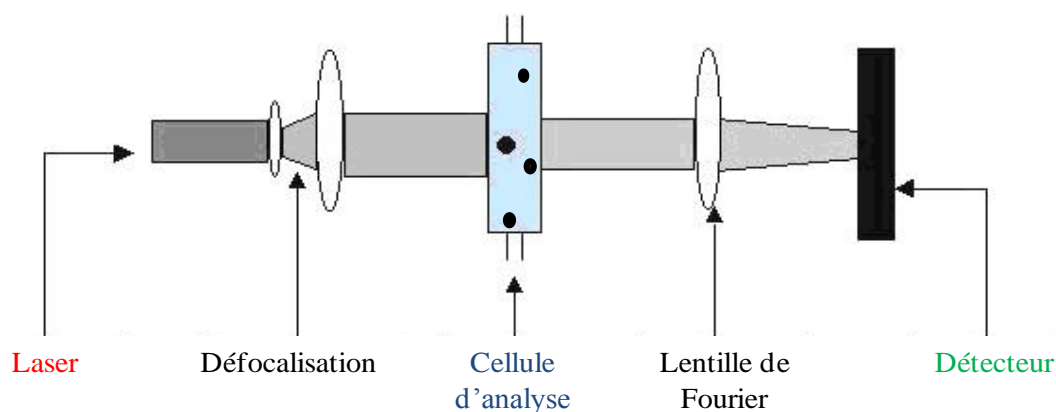


Figure II-4 : Schéma du principe de la granulométrie laser

b. Protocole

L'échantillon de particules est dispersé aux ultrasons dans une phase aqueuse (appareil LE LS 13 320, BECKMAN COULTER, France). Il est ensuite exposé à une lumière quasi monochromatique : rayonnement laser. Les intensités reçues aux différents

angles par photodiodes en silicium sont numérisées. Ces données sont traitées par informatique (Logiciel LS 3.01), en prenant en compte :

- les indices de réfraction et d'adsorption des particules
- l'indice de réfraction du milieu dispersant (milieu aqueux)

La distribution granulométrie est modélisée par une loi log-normale.

I.2.2. Surface spécifique

La connaissance de la surface spécifique est d'une grande importance dans la caractérisation d'une poudre ou d'un aérosol, quel que soit le domaine d'application. Sa détermination contribue à connaître la réactivité de l'échantillon.

I.2.2.1. Principe

Le principe physique, universellement reconnu pour la détermination de la surface spécifique, repose sur l'adsorption de gaz à basse température. Il permet :

- une mesure sans modification de la texture géométrique de l'échantillon ;
- la détermination de l'aire de la totalité de la surface des particules, y compris la surface des pores ouverts ou criques en cul-de-sac, accessible aux molécules de gaz extérieures.

Ce phénomène d'adsorption s'effectue grâce à des forces dites faibles ou secondaires (forces de Van der Waals) à la surface des particules; ces forces agissent vers l'extérieur, notamment sur des molécules de gaz qui entoureraient l'échantillon à analyser, elles se manifestent toujours à des températures basses, quelque soient la nature chimique de corps en présence.

La surface spécifique de l'échantillon collecté est déterminée par porosimétrie à azote à l'aide d'un appareil Quantasorb junior (ANKERSMITH). Cette technique permet de déterminer la quantité d'azote adsorbable à la surface d'un composé pulvérulent. La théorie Brunauer, Emmett et Teller (BET) permet ensuite, à partir des résultats obtenus, de déterminer la surface spécifique de l'aérosol analysé.

I.2.2.2. Protocole

Expérimentalement, un dégazage de l'échantillon préalablement placé dans une cellule est effectué durant 30 minutes à 130°C sous un flux constant d'azote (30% N₂) et d'Hélium (70% He) afin d'éliminer les impuretés présentes dans les pores. Ensuite, une adsorption de molécules d'azote à la température d'azote liquide (-196°C) et une

désorption à la température ambiante sont réalisées. Le calcul de l'aire spécifique est réalisé par rapport au témoin d'azote (calibrateur) suivant les formules :

$$S_t = 3,98 (1 - P/P_0) \frac{A * V_{cal}}{A_{cal}}$$

$$S = \frac{S_t}{M_E}$$

S_t : Surface totale

S : Surface spécifique (en m^2/g)

P_0 : P atm + 15

P : $X_{N_2} * P$ atm

P atm: Pression atmosphérique (760 mm Hg)

A : Aire adsorption de l'échantillon

A_{cal} : Aire adsorption du calibrateur (azote)

V_{cal} : Volume calibration (en **mL**)

M_E : masse échantillon dégazée (en **g**)

I.3. Méthodologie d'analyse des caractéristiques chimiques

L'aérosol collecté peut être représenté par deux fractions principales : la fraction chimique et la fraction biologique. Notre étude s'est intéressée à la fraction chimique notamment aux métaux, ions et composés organiques adsorbés à la surface des particules. Plusieurs techniques ont été utilisées pour identifier ces éléments.

I.3.1. Composés inorganiques ou métaux

I.3.1.1. Principe

L'analyse des métaux a été réalisée par spectrométrie de masse couplée à un à plasma inductif (Inductively Coupled Plasma-mass Spectrometry, ICP-MS, **Figure II-5**). L'échantillon introduit sous forme liquide est dispersé en très fines gouttelettes (de l'ordre de 10 μm) à l'aide d'un nébuliseur. Ces gouttelettes sont amenées au centre de la torche à plasma, alimentée par de l'argon où les températures variant entre 6000 et 8000°C vont permettre l'ionisation complète de l'échantillon sous forme de cations monovalents. Une interface, composée de deux cônes (un cône échantillonneur et un cône écréteur) suivie d'une série de lentilles, permet d'éliminer les photons et les neutrons et de focaliser les

cations vers le quadripôle où ils seront séparés en fonction du rapport de leur masse atomique sur la charge (m/z). Le faisceau ionique est amené sur un détecteur multiplicateur d'électrons. Cette analyse multi-élémentaire possède une grande plage de linéarité (du ppb à la centaine de ppm) ainsi qu'une meilleure sensibilité pour les éléments réfractaires tout en minimisant les interférences et les effets matrice. Cette technique permet d'analyser la quasi totalité des éléments du tableau de classification périodique.

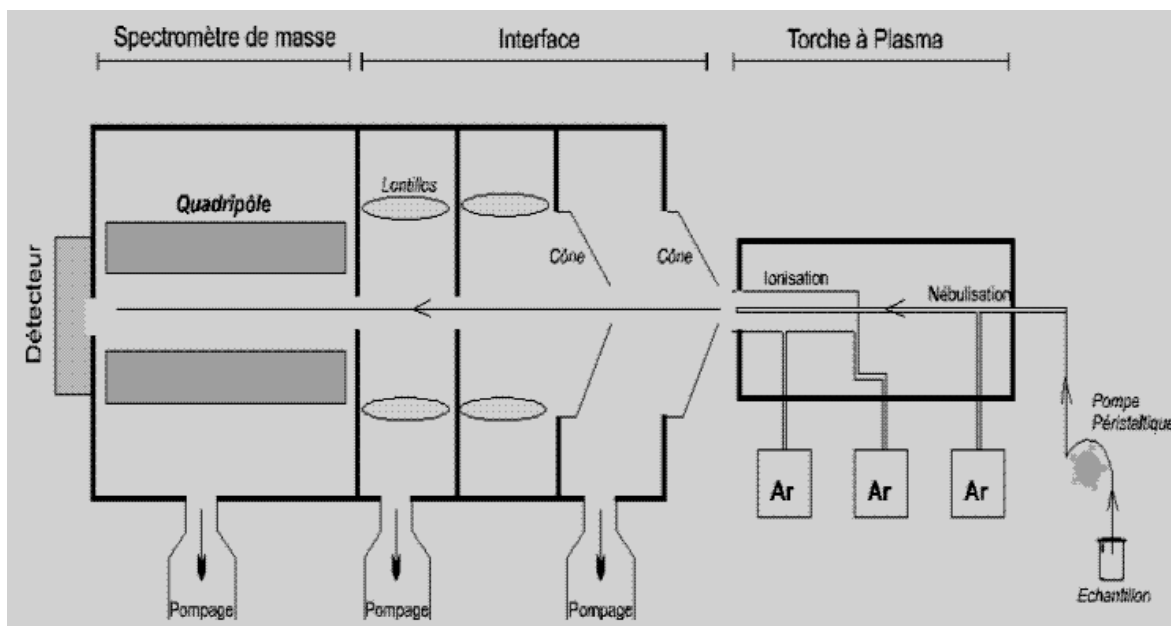


Figure II-5 : Schéma du principe de fonctionnement de l'ICP/MS

I.3.1.2. Protocole

L'échantillon préalablement pesé est introduit dans une bombe en téflon où ils sont mis en contact avec un mélange d'acide nitrique (HNO_3) et perchlorique (HClO_4) concentrés dans des proportions respectives 4ml et 2ml. La bombe est ensuite introduite dans un four micro-onde (model MSP1000 CEM) où un programme variable de paramètres (puissance en W, température et pression) permet de dissoudre les particules, suivant la nature de l'échantillon et du nombre d'échantillons. L'ajout d'acide fluorhydrique s'avère nécessaire pour une bonne dissolution des échantillons difficiles à digérer. Mais celui-ci sera par la suite neutralisé par de l'acide borique. A la fin de la digestion, le mélange est filtré puis dilué par de l'eau ultra pure pour avoir une concentration en acide inférieure à 5%. Cette dilution est nécessaire pour éviter d'endommager l'appareil. Le blanc d'analyse, constitué uniquement du mélange d'acide, est préparé dans les mêmes conditions que les échantillons.

Les solutions ainsi obtenues serviront à l'analyse des métaux par ICP-MS (spectromètre type VARIAN de model 820-MS). La méthode de calibration utilisée pour la quantification est l'étalonnage externe multi élémentaire et un étalon interne.

I.3.2. Ions solubles

I.3.2.1. Principe

La composition ionique de l'aérosol est recherchée suite à une seule et même extraction reposant sur l'hydrosolubilité des ions. Le dosage des ions est ensuite réalisé par chromatographie ionique.

Le principe de cette technique consiste en l'injection de l'échantillon d'aérosol, mis en suspension, dans une colonne échangeuse d'anions. La séparation des différents constituants ioniques se fait en fonction du temps de rétention de chaque ion, donc de l'affinité des ions présents dans l'échantillon avec la phase stationnaire constituée par un solide échangeur d'ions. La détection spécifique des composés ioniques à partir de leur caractère polaire est rendue difficile par leur faible concentration, au regard de l'abondance des ions présents dans la phase mobile. L'emploi d'un suppresseur est alors nécessaire pour convertir l'éluant fortement ionique en une espèce électriquement neutre. Ce qui permet un gain considérable de sensibilité avec une diminution du bruit de fond et une augmentation du signal des espèces à analyser. L'identification des ions est réalisée par comparaison des temps de rétention relevés pour des ions présents dans les échantillons avec ceux correspondant à des standards. La quantification est effectuée grâce à un étalonnage externe.

I.3.2.2. Protocole

Les ions étant fortement solubles dans l'eau, ils sont extraits dans l'eau ultrapure (résistance spécifique : 18.2 M Ω) et au moyen d'ultrasons pendant 30 minutes. Le lixiviat est filtré sur filtre millipore 0,22 μ m. La solution ainsi préparée est utilisée pour les analyses par chromatographie ionique des anions et des cations.

L'appareil utilisé, pour la chromatographie ionique, est de type Dionex DX 500, muni d'un suppresseur électrochimique et d'une détection conductimétrique. L'éluant est composé de mélange de NaHCO₃ (0,5 mM) et Na₂CO₃ (4,5 mM) pour l'analyse des anions et d'acide méthane sulfonique(CH₃SO₃H) à 2,6 mM pour les cations. Le débit d'analyse des anions est de 1,2 mL/min et 1mL/min pour les cations.

I.3.3. La fraction organique de l'aérosol

I.3.3.1. Principe

Le couplage de la Spectrométrie de Masse à la Chromatographie en phase Gazeuse (Gas Chromatography - Mass Spectrometry, GC-MS) est une technique couramment employée en chimie analytique pour la détection des composés organiques. En effet, cette méthode permet de séparer des molécules d'un mélange plus ou moins complexe de caractéristiques physico-chimiques diverses. Elle s'applique principalement aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans être dénaturés. L'échantillon injecté, est vaporisé à l'entrée de la colonne chromatographique et ses composés sont séparés en fonction de leur affinité avec la phase stationnaire (**Figure II-6**). La ligne de transfert chauffée à 290°C permet le passage des composés en phase gazeuse dans la chambre d'ionisation du spectromètre de masse où un filament chauffé va les ioniser grâce à un faisceau d'électrons. A ce stade, tout composé formé de molécules conduit à un mélange statistique d'ions de fragmentation. Un champ magnétique sépare les ions ainsi formés en fonction de leur masse et les dirige vers le détecteur. L'étude des trajectoires suivies, dans une enceinte où règne un vide poussé, permet de déterminer la nature des ions en fonction de leur masse/charge. Le détecteur traduit l'empreinte de chaque composé sous forme de spectre masse, représentant l'abondance de chaque ion formé, suivant son rapport masse/charge. Il traduit, en intensité, la présence du très grand nombre d'espèces individuelles semblables, apparues à partir de la quantité de tout échantillon soumis à cette analyse. En opérant dans les mêmes conditions, ce spectre est reproductible et caractéristique du composé. La quantification absolue est effectuée par étalonnage externe via l'injection de standards.

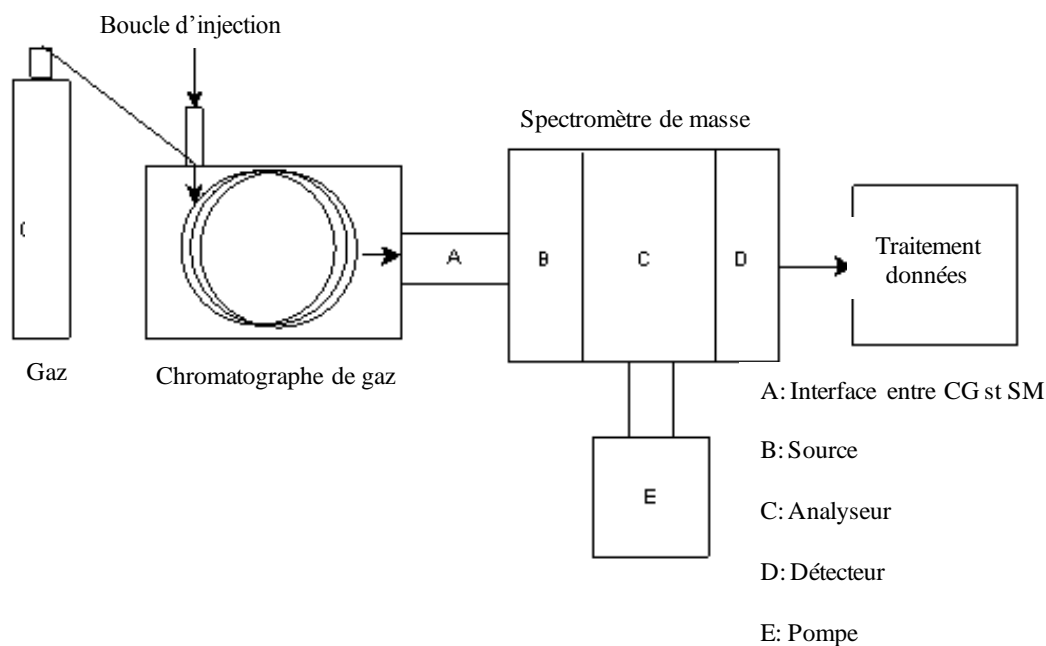
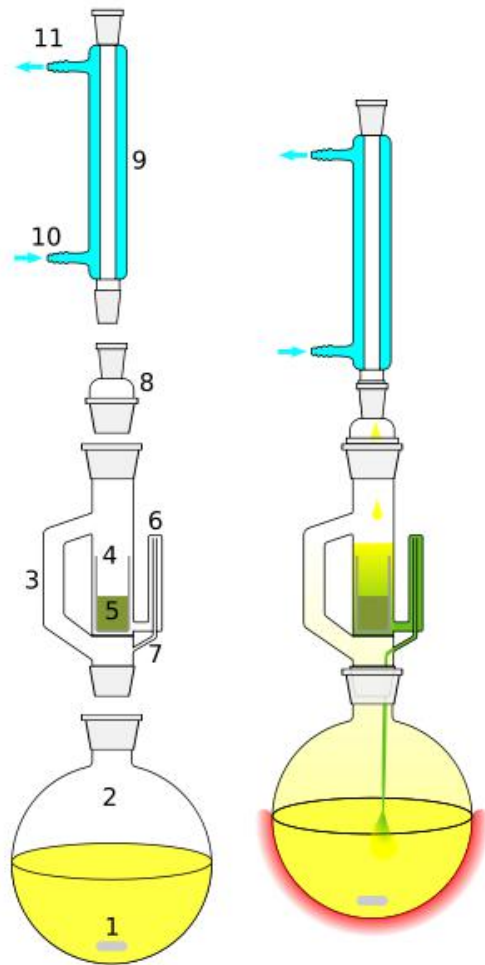


Figure II-6 : Schéma illustrant les différentes parties de la CPG/MS (Varian CP-3800)

I.3.3.2. Protocole

Pour l'analyse des composés organiques volatils (COV), les particules ont été placées dans un flacon porté à une température de 180°C. Ce qui permet la désorption de certains composés organiques légers, regroupés sous le nom de BTEX.

L'extraction des composés organiques lourds a été effectuée à l'aide du dichlorométhane par la technique du Soxhlet car elle préserve l'intégrité de la matière organique adsorbée à la surface des particules. Il s'agit d'une extraction solide-liquide, reposant sur le principe de la percolation d'un solvant à travers un échantillon solide contenu dans une cartouche poreuse. Le corps de l'extracteur (i.e. le soxhlet), comprenant la cartouche, est fixé sur un ballon contenant le dichlorométhane. Le solvant est vaporisé puis condensé, et reste en contact avec le solide. La solution est soutirée périodiquement par l'amorçage d'un siphon. La solution du ballon s'enrichit petit à petit en soluté et le solide est toujours mis en contact avec du solvant fraîchement distillé (**Figure II-7**). L'ébullition du solvant est effectuée pendant 24 heures, ce qui peut entraîner la perte des composés organiques légers via le reflux. A la fin de l'extraction, l'essentiel des molécules à analyser est transféré dans l'extract. L'éluât recueilli est ensuite concentré par évaporation du solvant au moyen d'azote gazeux, puis injecté en automatique dans la colonne de la GC-MS.



Légende :

- 1: Agitateur magnétique
- 2: Ballon à col rodé
- 3: Tube d'adduction
- 4: Corps en verre
- 5: Cartouche
- 6: Haut siphon
- 7: Sortie siphon
- 8: Adaptateur d'expansion
- 9: Condensateur
- 10: Entrée de l'eau de refroidissement
- 11: Sortie de l'eau de refroidissement

Figure II-7 : Représentation schématique d'un extracteur de soxhlet

II. Etude toxicologique

II.1. Matériel biologique

Le matériel biologique utilisée afin d'étudier la toxicité des trois aérosols (R, P₁ et P₂) est constitué de cellules BEAS-2B qui d'origine épithéliale bronchique humaine, (**Figure II-8**), obtenue à partir de la collection européenne de cellules de cultures (ECACC, Wiltshire, UK; reference: 95102433). C'est une lignée immortalisée, transformée par l'antigène T de Simian Virus 40 (SV40) (Reddel et al., 1988). Cette lignée cellulaire est considérée comme étant un modèle *in vitro* pertinent pour l'étude de la toxicité des substances inhalables (Fuentes-Mattei et al., 2010). Ces capacités métaboliques ont été prouvées par Uppstad et collaborateurs (Uppstad et al., 2010).

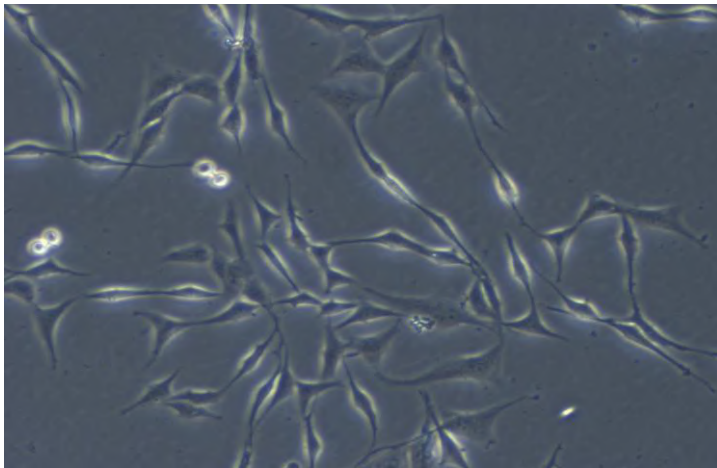


Figure II-8 : Cellule BEAS-2B en culture (x100)

II.2. Culture des cellules BEAS-2B

En fonction des paramètres d'étude considérés, la lignée BEAS-2B est ensemencée dans des microplaques de culture à 6 ou 96 puits, ou encore des flacons de culture de 75 cm² (CellBind ; Corning; Fisher Scientific Labosi SAS, Elancourt, France) contenant du milieu de culture défini (Bronchial Epithelial cell Growth Medium ; BEGM) obtenu après supplémentation du BEBM (Bronchial Epithelial cell Basal Medium) avec 9 éléments : 0.1% (v/v) retinoic acid, 0.1% (v/v) epinephrine, 0.1% (v/v) triiodothyronine, 0.1% (v/v) human recombinant epidermal growth factor, 0.1% (v/v) insulin, 0.1% (v/v) gentamicin sulfate amphotericin-B, 0.1% (v/v) transferrin, 0.1% (v/v) hydrocortisone, and 0.4% bovine pituitary extract (BEGM Bronchial Epithelial BulletKit, LONZA Verviers SPRL) et d'une solution de Fongizone à 0,5%. Les cultures de cellules sont placées dans un incubateur (T = 37°C ;

CO₂ = 5 % et humidité = 100 %). Des repiquages successifs nous ont permis d'obtenir, à partir d'une même ampoule de cellules mères, un nombre suffisant de cellules en phase exponentielle de croissance afin de pouvoir appliquer nos protocoles d'exposition.

II.3. Etude de la cytotoxicité globale

Afin de réaliser la cytotoxicité globale, les particules atmosphériques ont été mises en suspension dans du BEGM de manière à obtenir une solution mère permettant d'exposer les cultures de cellules à une gamme de concentrations. Des études précédemment réalisées dans notre laboratoire (Dagher et al., 2006; Garçon et al., 2006; Billet et al., 2007; Kouassi et al., 2010) nous ont permis de choisir nos six concentrations qui sont : 0 ; 3 ; 6 ; 12 ; 24 et 48µg/cm².

II.3.1. Observation des cultures de cellules exposées

Chaque test de cytotoxicité fait l'objet d'une observation en microscopie optique à l'aide d'un microscope inversé (Olympus CKX41 ; Olympus France S.A.S.) muni d'une glissière de contraste de phase pré-centrée (IXS2-SL ; ClaraVision). Une acquisition d'images est réalisée à l'aide d'une caméra numérique couleur (Scion CFW-1310C ; ClaraVision) et du logiciel Perfect Image (ClaraVision).

II.3.2. Tests de cytotoxicité

Les tests de cytotoxicité ont été réalisés sur des plaques de 96 puits comme le présente le schéma de plaque ci-dessous (**Figure II-9**).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Milieu de culture: BEGM	BEGM + PM_{2,5}	Témoins négatifs: BEGM + cellules		3 µg/cm² PM_{2,5}	6 µg/cm² PM_{2,5}	12 µg/cm² PM_{2,5}	24 µg/cm² PM_{2,5}	48 µg/cm² PM_{2,5}	Témoins positifs: BEGM + cellules + Triton X-100 4%		
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

BEGM + Cellules + Particules (R, P₁, P₂)

Figure II-9 : Schéma de microplaque pour l'étude de la cytotoxicité

II.3.2.1. Incorporation de la 5-Bromo-2'-désoxyUridine (BrdU)

La prolifération cellulaire est directement corrélée à l'incorporation de la BrdU, analogue de la Thymine, au niveau de l'ADN néo-synthétisé. C'est donc un biomarqueur de l'activité mitotique cellulaire.

Les cellules sont cultivées en présence de BrdU dans une microplaque de culture à 96 puits. La cinétique observée (24, 48 et 72 h) nous conduit à utiliser 3 microplaques où un ensemencement différentiel a été effectué de façon obtenir $40 \cdot 10^3$ cellules / 200µL / puit à chaque temps. Pour chacune des microplaques (96 puits), 8 puits contenant des cellules ont été exposés à chacune des concentrations testées et pour chaque type de particules (3 ; 6 ; 12 ; 24 et 48µg/cm²), 16 puits ne contenant que les cellules et le BEGM sont considérés comme des témoins négatifs, et enfin 8 puits contenant du Triton X100 (2 % v/v) servent de témoins positifs. Ce test de cytotoxicité est réalisé grâce à l'utilisation du kit « Cell proliferation ELISA BrdU (colorimetric) » (Roche Applied Science ; Allemagne). Son principe consiste en l'immunodétection par fixation d'un anticorps Anti-BrdU conjugué à une peroxydase sur la BrdU incorporée à l'ADN des cellules exposées. La conversion du substrat, la tétraméthylbenzidine par la peroxydase est quantifiée par une mesure spectrophotométrique à 370 nm (λ référence = 490 nm) grâce à un lecteur de microplaques (MRX ; Dynatech laboratories ; France).

II.3.2.2. Activité de la DésHydrogénase mitochondriale (DHm)

La prolifération cellulaire est corrélée à l'activité de la DHm. Les cellules sont cultivées dans une microplaque de culture à 96 puits. La cinétique observée (24, 48 et 72 h) nous conduit à utiliser 3 microplaques où un ensemencement différentiel a été effectué de façon à obtenir 40.10^3 cellules / $200\mu\text{L}$ / puit à chaque temps. Pour chacune des microplaques (96 puits), 8 puits contenant des cellules ont été exposés à chacune des concentrations testées et pour chaque type de particules (3 ; 6; 12 ; 24 et $48\mu\text{g}/\text{cm}^2$), 16 puits ne contenant que les cellules et le BEGM sont considérés comme des témoins négatifs, et enfin 8 puits contenant cellules et du Triton X100 (2 % v/v) servent de témoins positifs. L'activité de la DHm est étudiée grâce au test de cytotoxicité WST-1 (Roche Applied Science ; Allemagne), qui consiste à étudier la transformation par clivage d'un sel de tétrazolium, le 1,3-disulfonate de 4-[3-(4-iodophényle)-2-(4-nitrophényle)-2H-5-tétrazolio]-benzène, en composé formazan coloré par mesure spectrophotométrique à 450 nm (λ référence = 630 nm) grâce à un lecteur de microplaques MRX (**Figure II-10**).

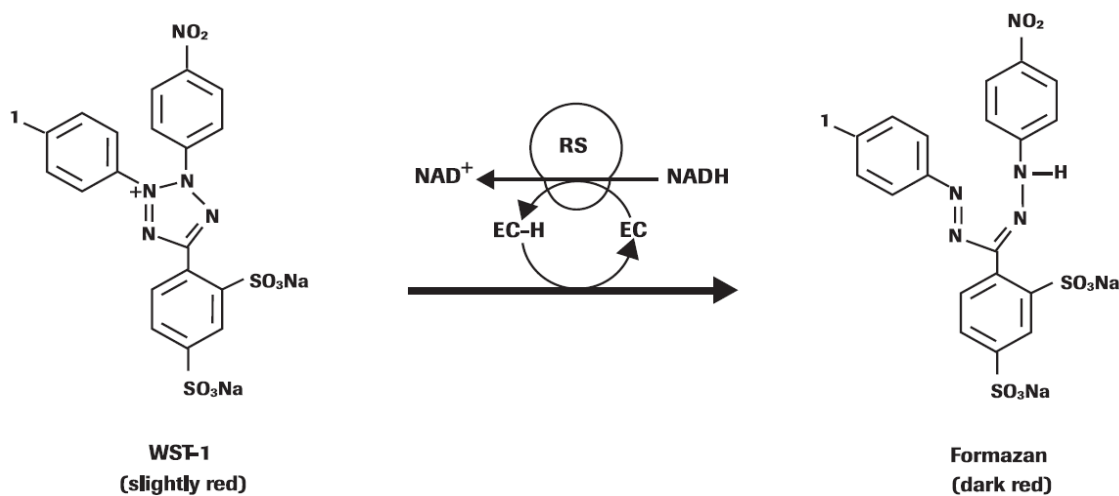


Figure II-10 : Principe du test de la déshydrogénase mitochondriale (WST-1)

RS: mitochondrial succinate-tetrazolium-reductase system; EC: electron coupling reagent (Roche Applied Science)

II.3.2.3. Activité de la LacticoDésHydrogénase (LDH) extracellulaire

Ce test consiste à doser la lactico-déshydrogénase (LDH), enzyme cytoplasmique stable impliquée dans la fermentation lactique, relarguée par les cellules dans le milieu extracellulaire lorsqu'elles subissent des dommages membranaires. La détermination de l'activité de la LDH extracellulaire est réalisée sur les surnageants de cellules des plaques servant à l'étude de l'activité de la DHm en utilisant le kit « cytotoxicity detection kit

(LDH) » (Roche Applied Science ; Allemagne). La LDH oxyde le lactate en pyruvate, ce qui a pour effet de réduire le NAD^+ en NADH/H^+ qui se régénère en réduisant un sel de tétrazolium jaune en composé formazan rouge, détecté par mesure spectrophotométrique à 490 nm (λ référence = 630 nm) grâce à un lecteur de microplaques MRX (**Figure II-11**).

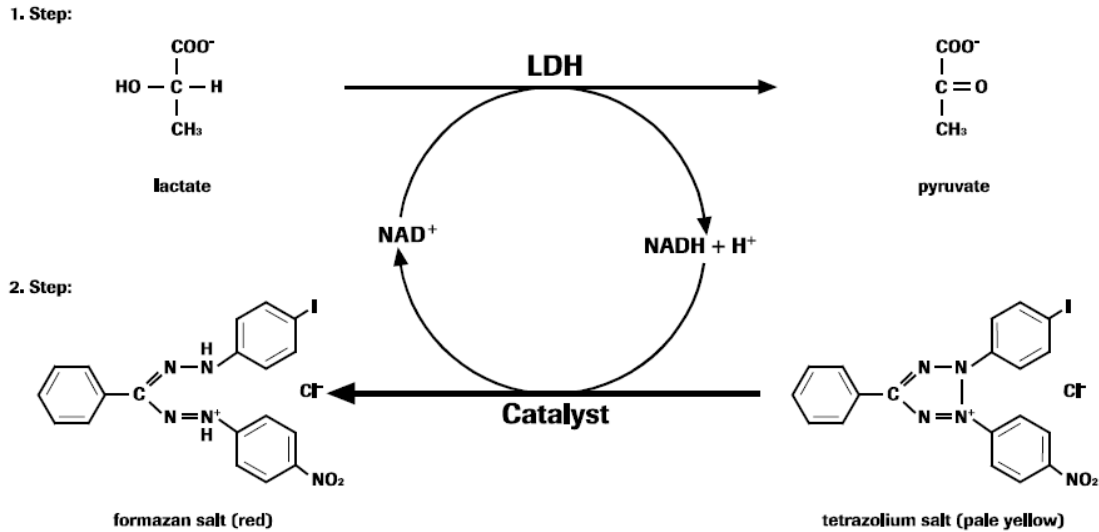


Figure II-11 : Principe du test Lactico-déshydrogénase (LDH) (Roche Applied Science)

La relation dose/réponse mise en évidence par ces tests cytotoxiques nous a permis de choisir deux concentrations ($C_1 = 3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ et $C_2 = 12 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) pour la détermination des mécanismes physiopathologiques sous-jacents à l'exposition des cellules aux aérosols (activation métabolique des composés organiques adsorbés à la surface des particules, le stress oxydant, la réponse inflammatoire).

II.4. Exposition des cellules et prélèvements

A partir d'une même ampoule de cellules mères, des repiquages successifs ont été effectués afin d'obtenir suffisamment de cellules en phase exponentielle de croissance pour ensemercer les flacons de culture (75 cm^2) ou dans des plaques de 6 puits. Pour réaliser une cinétique (24, 48, 72 h) tout en ayant un nombre suffisant de cellules ($16 \cdot 10^6$ cellules / flacon ou $1 \cdot 10^6$ / puits), un ensemencement adapté à chaque test a été réalisé pour chacun des temps d'incubation. En effet, compte tenu du temps de doublement théorique des BEAS-2B (environ 24 h), les trois séries de flacons sont respectivement ensemençées avec $4 \cdot 10^6$, $2 \cdot 10^6$ et $1 \cdot 10^6$ cellules / flacon ou $0,25 \cdot 10^6$, $0,125 \cdot 10^6$ et $0,0625 \cdot 10^6$ cellules / puit. Pour chaque temps d'incubation, 4 flacons ou 6 plaques de cellules sont exposés aux particules aux

concentrations C_1 ($3\mu\text{g}/\text{cm}^2$) et C_2 ($12\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Les flacons (ou plaques) de culture ne contenant que les cellules et le BEGM sont considérés comme des témoins négatifs ($n = 8$ flacons ou $n = 12$ plaques). De même, des flacons ($n = 4$) ou des plaques ($n = 6$) exposés à des particules de dioxyde de titane (TiO_2 , anatase ; $D_{\text{ae}} < 2 \mu\text{m}$; pureté : 99 % ; Acros Organics, Noisy Le Grand, France) à des concentrations équivalentes à la C_2 ($12\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Par ailleurs, l'exposition de flacons ($n = 4$) ou des plaques ($n = 6$) au benzène ($7 \mu\text{M}$), au toluène ($7 \mu\text{M}$) et au B[a]P ($1 \mu\text{M}$) constituent des contrôles positifs de composés susceptibles d'être adsorbés à la surface des particules atmosphériques.

A la fin de chaque temps d'incubation, les cellules des flacons sont prélevées, lavées 2 fois dans 5 mL de tampon phosphate ($0,01 \text{ M}$; $\text{pH} = 7,2$), puis les aliquotes de culots cellulaires sont rapidement congelées dans l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à utilisation ultérieure. Parallèlement, des aliquotes de surnageants ont été recueillies pour le dosage des médiateurs de l'inflammation ($\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , IL-8). Par contre pour les expositions sur plaques de 6 puits, elles ont été directement congelées à -80°C jusqu'aux analyses, après leur lavage au tampon phosphate.

II.4.1. Activation métabolique de la fraction organique de l'aérosol atmosphérique

L'activation métabolique des composés organiques (COV et HAP) adsorbés à la surface de la fraction inorganique particulaire est étudiée via la détermination de l'expression génique des *CYP 1A1*, *1B1*, *2F1* et *NQO1* par la méthode de Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) à temps réel.

a. Principe

L'expression d'un gène est une succession de synthèses chimiques et de réactions aboutissant à la production d'un ARN ou d'une protéine. Dans un premier temps, a lieu la synthèse d'un ARN, dont la séquence est complémentaire d'un des deux brins du gène donc identique à celle de l'autre brin, hormis la substitution des bases Thymine (T) par des bases Uracile (U): c'est la transcription. Après des réactions de maturation, le transcrit primaire, ou ARN, devient un ARN messager (ARNm) et sort du noyau vers le cytoplasme. La structure transcrite de ces ARNm s'exprime par la synthèse de protéines dont la structure primaire traduit en acides aminés l'information portée par la structure primaire de l'ADN : c'est la traduction.

La régulation de toute voie métabolique s'effectue préférentiellement au niveau de la première réaction afin d'éviter la synthèse d'intermédiaires inutiles. Pour l'expression d'un

gène, la régulation peut avoir lieu à quatre niveaux : (i) lors de la transcription, (ii) lors de la maturation du transcrit, (iii) lors de la traduction, ou (iv) lors de l'activation de la protéine mature. Le point de contrôle principal est la transcription : l'ARN polymérase est l'enzyme-clé de l'expression d'un gène. Afin de mieux caractériser dans la lignée de BEAS-2B, l'impact de l'exposition à un aérosol atmosphérique anthropogénique adsorbant à sa surface une fraction organique sur cette étape prépondérante de la toxicité des composés organiques, l'induction de l'expression génique des *CYP 1A1*, *1B1* et *2F1*, de la *NQO1*, a été recherchée par RT-qPCR en temps réel.

b. Protocole

• Extraction des ARN

Les ARN totaux sont extraits à partir des cellules BEAS-2B cultivées dans des plaques 6 puits. La récupération a été effectuée en suivant le protocole du kit TaqMan[®] Gene Expression Cells-to-CT[™] (Ambion 2007, US). Cette méthode de traitement a été choisie afin de faire une PCR en temps réel. Les cellules préalablement lavées au PBS, sont traitées avec 50µl DNase diluée au centième dans une solution de lyse (Lysis Solution) puis mixé pendant 5 min. Ce qui permet de détruire l'ADN génomique et de libérer l'ARN dans la solution de lyse. Cette solution de lyse inactive également les ARNases. Une solution Stop est ensuite ajouté (5µl) pour inactiver la solution de lyse qui pourrait inhiber la réaction de RT ou de PCR. Les cellules ainsi lysées sont utilisées pour rétro-transcription des ARNm (ou reverse transcriptase, RT).

• Rétro-transcription des ARN messagers (ARNm)

Les ARNm présents dans la solution de lyse cellulaire précédemment obtenue sont convertis en leurs ADN complémentaires (ADNc) grâce à la méthode de la RT. Ces ARNm ont pour caractéristique spécifique d'avoir une extrémité 3' polyadénylée (500 à 2000 nucléotides), encore appelée queue poly(A). La RT consiste en l'hybridation spécifique de l'extrémité poly(A) avec une amorce formée à la fois de plusieurs 2'-désoxy-thymidine-5'-triphosphates (dTTP), encore dénommée oligo (dT), et d'un site promoteur de la RT. En présence des désoxynucléotides triphosphates (dNTP) requis, une transcriptase reverse transcrit alors les ARNm en leurs ADNc.

Ainsi 5µl de solution de lyse cellulaire est mise en suspension dans un volume final de 20µl de mélange réactionnel (12,5µl 2X RT Buffer, 1,25µl 20X RT Enzyme Mix, 6,25µl Nuclease-free Water ; Ambion 2007, US). Le mélange est ensuite porté dans un

thermocycleur 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) permettant de réaliser la réaction RT suivant le programme : incubation pendant 60 min à 37°C, puis à 95°C pendant 5 min pour dénaturer l'enzyme et arrêter la réaction.

- **PCR quantitative en temps réel des gènes codant pour les enzymes du métabolisme des xénobiotiques**

L'une des propriétés de toutes les ADN polymérases est de ne pouvoir synthétiser le brin complémentaire qu'à partir d'une amorce oligonucléotidique. Cette propriété est mise à profit dans la méthode de PCR quantitative en temps réel à l'aide de sondes fluorogéniques TaqMan spécifiques au gène d'intérêt. Les sondes sont marquées à leur extrémité 5' par un fluorochrome émetteur (« reporter ») et à leur extrémité 3' par un fluorochrome suppresseur (« quencher »). Lors de la phase d'hybridation la sonde vient s'accrocher à la séquence, mais ne génère aucune fluorescence. Au cours de la phase d'élongation, l'activité hydrolytique de l'enzyme Taq polymérase vient cliver le reporter et le quencher, générant un signal détectable dans la longueur d'onde d'émission du reporter (**Figure II-12**). Les amorces oligonucléotidiques synthétiques, capables de s'hybrider aux bornes de la séquence cible, c'est-à-dire de *CYP1A1*, *1B1*, *2F1* et de la *NQO1* (TaqMan® Gene Expression Assays) dont les codes sont respectivement Hs00153120_m1, Hs0016164383_m1, Hs00167949_m1, Hs00168547_m1, sont utilisées pour réaliser les réplifications qui assureront la multiplication spécifique de la séquence encadrée par ces amorces. Les réactions d'amplification ont été réalisées selon le protocole du kit TaqMan® Gène Expression Cells-to-CT™ (Ambion 2007, US) avec pour chaque réaction un mélange de 16µl de Mix (10µl de TaqMan Gene expression Master Mix (2x), 1µl de TaqMan Gene expression Assay (20x), 5µl de Nuclease free water) et 4µl de RT reaction (cDNA). Le protocole d'amplification comprend une étape à 95°C de 10 min suivie de 40 cycles constitués d'une phase de dénaturation de 15 secondes à 95°C, d'une phase d'hybridation des amorces et d'élongation de 1min à 60°C. Pour déterminer la positivité d'une PCR et/ou quantifier un échantillon par PCR en temps réel, on détermine le nombre de cycles à partir duquel le produit PCR est détectable. Le moment d'apparition du signal, dénommé cycle seuil ou Ct (Cycle threshold), est dépendant de la quantité de matrice initialement présente dans l'échantillon amplifié. Le Ct calculé est inversement proportionnel au logarithme décimal du nombre de copies initiales. Il apparaît toujours au cours de la phase exponentielle de la PCR. L'abondance de l'ARNm étudié dans l'échantillon traité par rapport au témoin a été calculée selon la méthode du delta delta Ct ($\Delta\Delta Ct$). L'expression du gène *ARN 18S* a été utilisée pour normaliser les résultats.

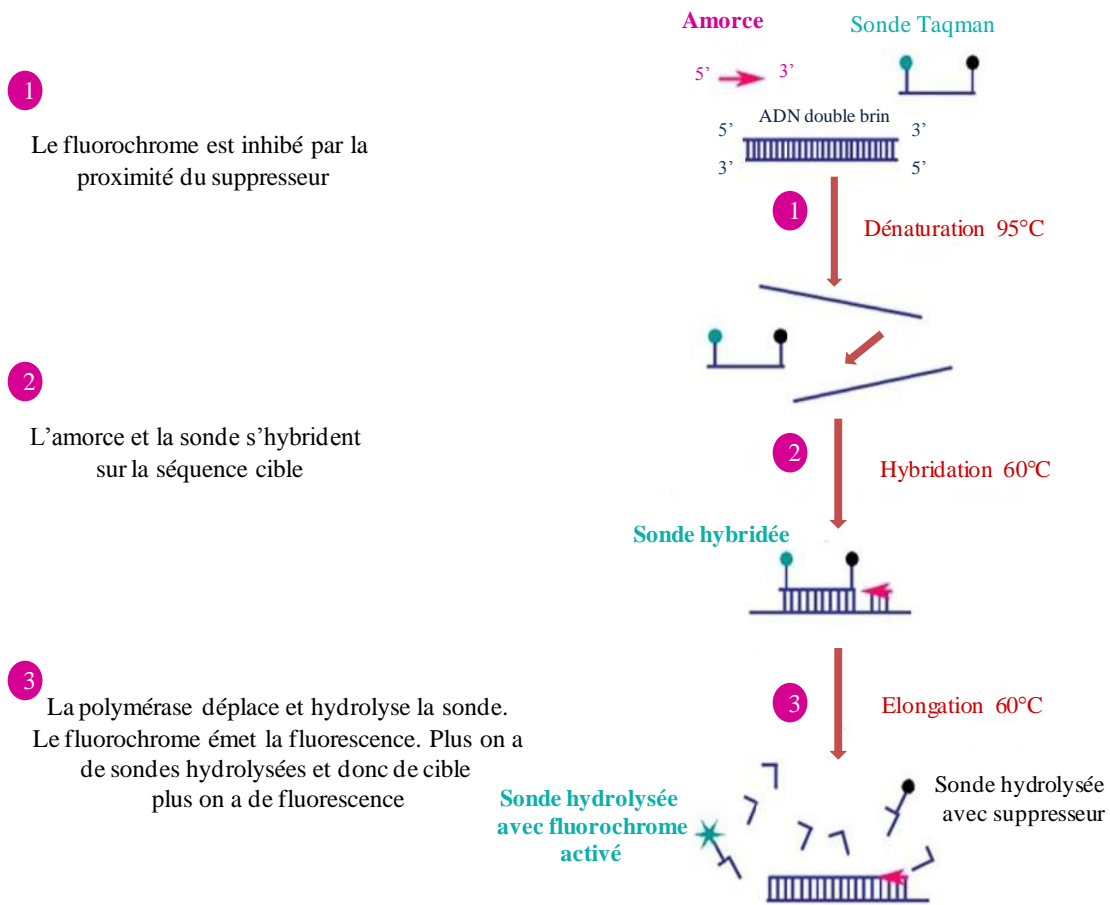


Figure II-12 : Schéma du principe de fonctionnement de la PCR quantitative en temps réel

II.4.2. Evaluation du stress oxydant

Les propriétés pro-oxydantes des aérosols anthropogéniques et la formation d'Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) participent à l'apparition de dommages cellulaires et à l'induction de mécanismes physiopathologiques. Les ERO constituent des entités chimiques certes réactives, mais indispensables au métabolisme des êtres vivants. Cependant, en cas de déséquilibre de l'homéostasie redox cellulaire, la genèse d'un stress oxydant peut engendrer de graves conséquences délétères sur les diverses macromolécules cellulaires (protéines, lipides, ADN) produisant des molécules souvent toxiques que l'on retrouve dans les fluides biologiques et qui constituent des biomarqueurs du stress oxydant.

Pour cette étude, nous nous sommes limités au dosage du Malondialdéhyde (MDA) et du glutathion.

II.4.2.1. Peroxydation lipidique : Dosage du Malondialdéhyde (MDA)

a. Principe

Le stress oxydant induit par les particules atmosphériques peut résulter de différentes sources notamment la production directe des ERO à la surface des particules, des composés solubles tels que des métaux de transition ou des composés organiques, le complexe NADH oxydase, etc. certains composés de la fraction inorganique des particules collectées, tels que le Fer, sont à l'origine d'altérations oxydatives cellulaires dont la peroxydation des lipides cellulaires qui aboutit à la formation d'aldéhydes très réactifs et donc extrêmement toxiques tel que le Malondialdéhyde.

b. Protocole

Le MDA est déterminé grâce au test à l'acide Thiobarbiturique (TBA) de Miller et Aust (1989). Dans un culot cellulaire a été ajouté à un mélange contenant, une solution d'acide d'HCl (0,1 M) et d'acétate d'éthyle pour en extraire le MDA. L'extrait est ensuite repris dans un mélange réactionnel contenant de TBA à 0,6 % et d'acide orthophosphorique (H_3PO_4) au 1/100 placé dans un bain-marie à 100°C pendant 30 minutes. L'injection de 50 μ L de la solution colorée permet le dosage du MDA par HPLC (détecteur UV SPD-M20A, Shimadzu LC-20AD). La phase mobile est constituée d'un mélange de tampon phosphate (KH_2PO_4) et de méthanol (60% et 40% en volume).

II.4.2.2. Dosage du glutathion.

a. Principe

Le glutathion, un tripeptide (γ -glutamyl-cysteinyl-glycine), joue un rôle important dans la détoxification des composés endogènes ou des xénobiotiques potentiellement toxiques. Le glutathion réduit (GSH) peut facilement s'oxyder en glutathion disulfide (GSSG) en présence de radicaux libres, ce qui permet la neutralisation de ces radicaux et donc de prévenir un stress oxydant. La détermination du ratio des deux formes (GSH et GSSG) constitue un paramètre important dans la caractérisation du statut oxydatif cellulaire. Le GSH et le GSSG sont déterminés dans deux échantillons biologiques différents grâce à la méthode HPLC (High Performance Liquid Chromatography) par détection fluorimétrique (détecteur RF-10AxL) adapté de R. Kand'ar et al., (Kand'ar et al., 2007). Le principe de cette méthode repose sur la mesure de la fluorescence résultante de la dérivation des deux formes par OPA (Orthophthalaldehyde), lorsque les longueurs d'excitation et d'émission sont fixées respectivement 350 et 420nm.

b. Protocole

Le glutathion est analysé par HPLC de modèle Shimadzu LC-20AD (Kyoto, Japan) après précipitation des protéines par ajout d'acide métaphosphorique (HPO_3 10%). Afin d'éviter l'oxydation du GSH pendant la préparation des échantillons, un blocage des groupements thiols a été effectué par le *N*-Ethylmaleimide (NEM). Le protocole expérimental est décrit dans la Figure II-13 ci-dessous. Pour quantifier les deux formes de glutathion (GSH et GSSG), deux gammes ont été réalisées. La préparation des solutions de standards a été soumise aux mêmes conditions que les échantillons. La phase mobile est constituée d'un mélange de Méthanol et d'Hydrogénophosphate (Na_2HPO_4 25mM) dans les proportions 15% et 85% en volume à pH6..

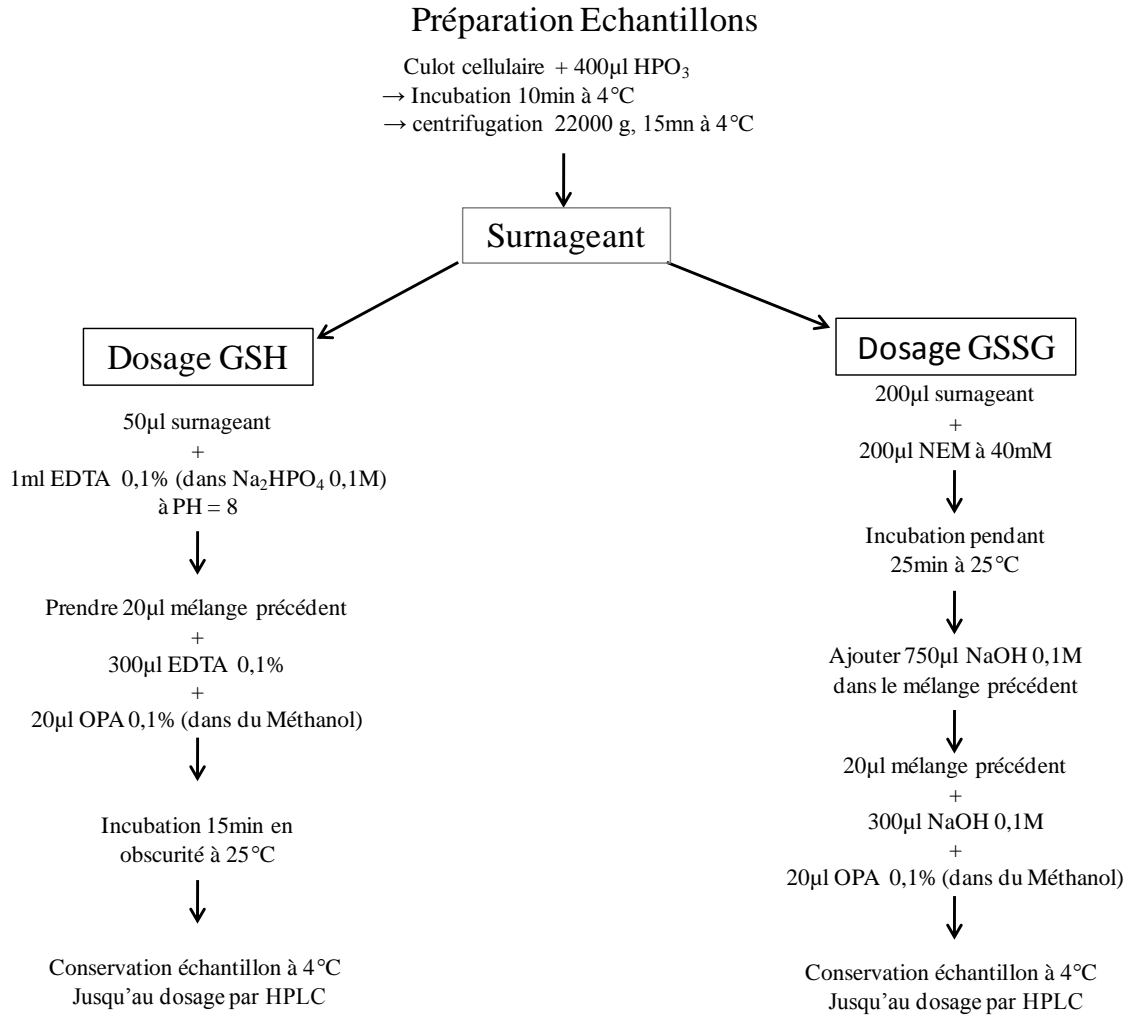


Figure II-13 : protocole de dosage du glutathion (GSH et GSSG)

II.4.3. Réponse inflammatoire

Pour cette étude nous avons choisi de quantifier l'expression génique et de doser la sécrétion de quatre cytokines (*TNF-α*, *IL-1β*, *IL-6*, *IL-8*).

II.4.3.1. Expression génique des cytokines

L'expression génique des cytokines a été réalisée suivant le protocole du kit TaqMan® Gene Expression Cells-to-CT™ (Ambion 2007, US), décrit dans le paragraphe III.1.1. consacré à l'expression des gènes de l'activation métaboliques. Les codes des amorces *TNF-α*, *IL-1β*, *IL-6*, *IL-8* sont respectivement Hs99999043_m1, Hs00174097_m1, Hs00174131_m1, et Hs00174103_m1.

II.4.3.2. Dosage ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) des cytokines

Le principe de ce dosage ELISA sandwich, implique la reconnaissance de la cytokine d'intérêt par un anticorps spécifique dit de capture fixé sur une matrice, en l'occurrence une microplaque de 96 puits. Ce complexe anticorps-cytokine est ensuite reconnu par un anticorps dit de détection, biotinylé, également spécifique de la cytokine recherchée. La peroxydase du raifort couplée à l'avidine se fixe sur la biotine (complexe biotine/avidine) va permettre de quantifier la cytokine à l'aide d'un réactif chromogène, le Tétraméthyl Benzidine Dihydrochloride (TMB), dont l'oxydation catalysée par la peroxydase donne une coloration bleue (Figure II-14).

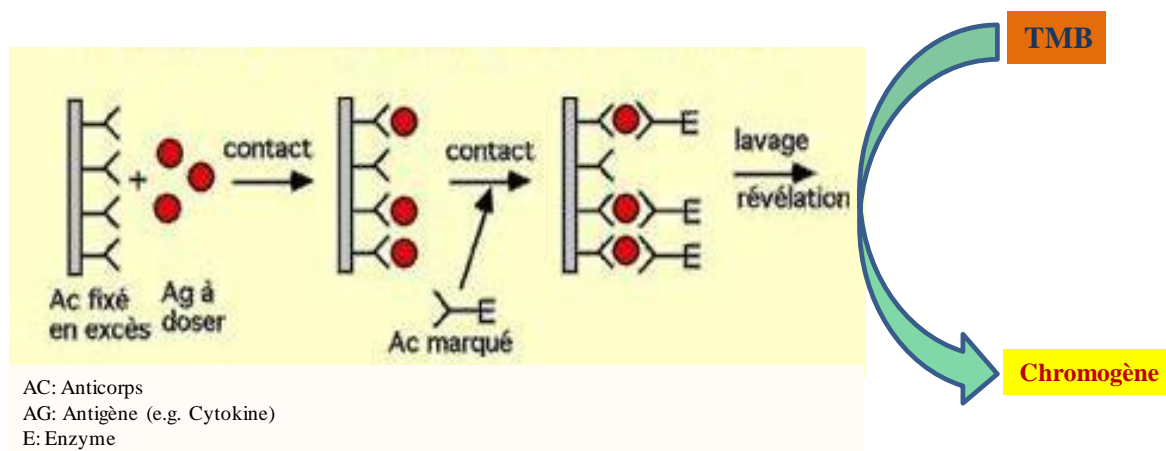


Figure II-14 : Principe de dosage ELISA

La sécrétion protéique des cytokines est dosée dans le surnageant de culture cellulaire. Le dosage immunoenzymatique est réalisé suivant le protocole fourni avec les kits (Quantikine® R&D SYSTEMS, Mineapolis, USA). Parallèlement une gamme étalon de chaque cytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8) est réalisée et l'absorbance est mesurée à 450 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque (MRX 5000, Dynatech Laboratoires).

II.4.4. Dosage des protéines totales

Le dosage des protéines totales (culot cellulaire, surnageant cellulaire ou protéines nucléaires) repose sur la réaction du biuret (i.e. réduction mono-électronique du Cuivre (II) complexé aux protéines). L'acide Bicinchonique, qui est un sel de sodium stable en milieu aqueux, forme un complexe violet avec le Cuivre (I). Cette coloration est à la fois stable et dose-dépendante vis-à-vis d'une large gamme de concentrations protéiques (Bicinchoninic acid kit, Sigma-Aldrich). Cette méthode est une amélioration de celle de Lowry, en cela que,

d'une part, les interactions des réactifs du dosage avec les détergents non ioniques et les tampons salins sont fortement réduites, et d'autre part, en raison d'une plus grande sensibilité et de plus faibles variations selon les protéines dosées (Smith et al., 1985).

II.4.5. Analyses Statistiques

Les variables aléatoires quantitatives continues (LDH, BrdU, DHm, MDA, GSH, GSSG, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8) sont décrites par leurs moyennes et leurs écart-types. Les valeurs des variables aléatoires de chaque groupe (contrôles négatifs, contrôles positifs, concentrations croissantes de l'aérosol) sont comparées à celles du groupe témoin grâce au test non paramétrique U de Mann-Whitney par le traitement des données est réalisé avec le logiciel d'analyses statistiques SPSS pour Windows, v.12.0.1 Nov. 2003 (SPSS France, Paris, France).

Chapitre III :
Résultats et discussion

Chapitre III : Résultats et discussion

Ce chapitre s'articule en deux parties : après avoir exposé les conditions dans lesquelles les prélèvements de particules ont été menés, nous nous intéresserons à la caractérisation physico-chimique de ces échantillons, en ayant recours à différentes méthodes d'analyses complémentaires. Dans une deuxième partie, nous aborderons les résultats de l'étude toxicologique. Celle-ci porte sur l'impact *in vitro* des échantillons collectés sur une lignée cellulaire épithéliale bronchique humaine (BEAS-2B). Nous avons ainsi étudié la capacité des aérosols à induire une réponse cytotoxique et la biotransformation subie par la fraction organique adsorbée à la surface des aérosols *via* l'induction de l'expression génique des enzymes du métabolisme des xénobiotiques (*Cytochrome P450*, *CYP 1A1*, *1B1*, *2F1* ; *NADPH Quinone Oxydo-reductase-1*, *NQO1*). L'attention a ensuite été portée sur la capacité de nos particules à induire aussi bien un stress oxydant, par la détermination de la peroxydation lipidique *via* le Malondialdéhyde (MDA) et la détermination du statut du glutathion (GSSG/GSH), et de la réponse inflammatoire, par l'étude de l'induction génique et la sécrétion des cytokines inflammatoires (*TNF- α* , *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-8*).

III. Campagne de prélèvement et caractérisation physico-chimique des aérosols

La campagne de prélèvement des particules s'est déroulée sur trois sites :

- Fann ou P₁ (14°41' 47" N; 17° 27' 57" W) : site urbain
- Faidherbe ou P₂ (14°40' 31" N; 17° 26' 15" W) : site urbain
- Rural, Ngaparou ou R (14° 27' 53" N; 17° 30' 36" W) : site rural

Rappelons que le choix des deux sites urbains s'est basé sur la forte circulation automobile avec une différence dans le type de véhicules : A Fann (P₁) la majorité du trafic est faite de véhicules de transport en commun (« cars rapides »), alors qu'à Faidherbe (P₂) ils sont absents et le trafic est presque totalement assuré par les véhicules particuliers. Cet échantillonnage a été mené de fin juillet à mi octobre 2009, période correspondante à la saison pluvieuse au Sénégal. Cette période est caractérisée par la remontée des masses d'air équatoriales (« la mousson ») sous l'impulsion de l'anticyclone de « Sainte Hélène », repoussant ainsi les vents du Nord chargés de poussière désertique. Les rétro trajectoires présentées sur la **Figure III.1** indiquent des vents dominants E et W pour le site rural (R, **Figure III.1-A**) et l'W/SW-SE pour les sites urbains (P₁ et P₂, **Figure III.1-B et C**). Il apparaît que ces trois sites sont sous influences des masses d'air océaniques et continentales. Ces données météorologiques concordent avec celles de l'Agence Nationale de la Météorologie du Sénégal, présentées sous forme de moyennes mensuelles dans le **Tableau III.1**, avec des vitesses de vent faibles

(faible dispersion des aérosols), des températures de 28°C en moyenne et l'humidité relative variant entre 77 et 86%.

Les prélèvements de particules, effectués par impaction en cascade à haut débit, ont permis de collecter 406 mg, 756 mg et 1063 mg respectivement les sites Rural (Ngaparou, R), Fann (P₁) et Faidherbe (P₂). Les concentrations de PM_{2,5} dans l'atmosphère qui en résultent sont de 16,9 µg/m³ pour le site rural (R), 75,1 µg/m³ pour Fann (P₁) et 105,4 µg/m³ pour Faidherbe (P₂). Ces valeurs sont comparables aux résultats de l'étude réalisée au Kenya avec 10,7µg/m³ au niveau d'un site rural et 98,1 µg/m³ en milieu urbain sous influence automobile (Kinney et al., 2011). Les concentrations urbaines sont donc supérieures aux limites journalières issues de la Directive Européenne et des recommandations de l'OMS de 25 µg/m³ pour les PM_{2,5} (European Parliament and Council of European Union, 2008 ; WHO, 2006) bien que la période de prélèvement soit limitée sur trois mois. Ces observations sont à mettre en rapport avec le trafic automobile, très dense et vétuste.

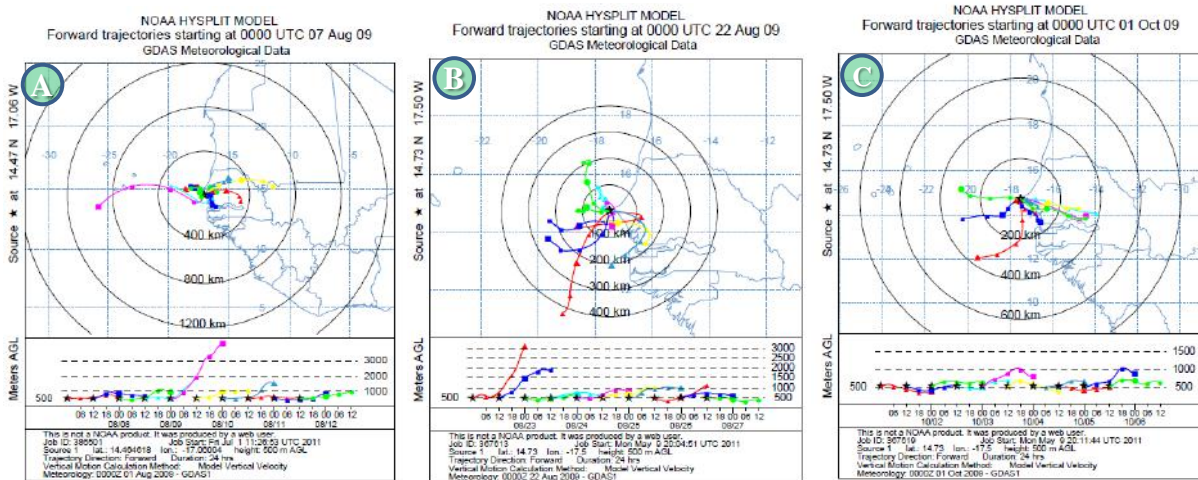


Figure III-1 : Exemple de rétro-trajectoires à Dakar prises les 01 Aout 2009 (A), le 22 Aout 2009 (B) et le 01 octobre 2009 (C) respectivement pour le site rural (A) et les sites urbain (B et C).

Tableau III-1 : Paramètres météorologiques de Dakar (moyennes mensuelles)

Année 2009				
Paramètres	Juillet	Aout	Septembre	Octobre
Température (°C)	28,2	27,9	28	28,9
Direction vent	NW	NW	N	N
Vitesse vent (m/s)	3,7	3,1	3,3	3,6
Humidité relative (%)	77	86	84	78
Précipitations (mm)	71,9	283,7	165,3	33,6

(Source : Agence Nationale de la Météorologie du Sénégal, 2009)

I.1. Granulométrie des particules

Il faut rappeler que l'échantillonnage a été réalisé par un impacteur en cascade dont le dernier étage présente un diamètre de coupure de 0,33 μm . Il apparaît donc que les particules les plus fines ne sont pas retenues par ce système. Cependant ce dispositif présente des avantages certains puisque des quantités suffisantes de particules ont été collectées, sans avoir recours à l'emploi d'un filtre. Les résultats de l'analyse par Microscopie Electronique à Balayage couplée à une sonde d'analyse X (MEB-EDX) sont présentés sous forme de fréquences cumulées et de fréquences relatives (**Figure III-2**). Les fréquences cumulées des trois échantillons de particules correspondent à 60 %, 82 %, et 74 % de $\text{PM}_{2,5}$ respectivement pour les sites Rural (R), Fann (P_1) et Faidherbe (P_2). Il apparaît un profil granulométrique similaire pour les 3 échantillons. Cependant il faut noter que la gamme de taille inférieure est comprise entre 0,5 et 1 μm de diamètre, donc la technique MEB ne montre pas la présence de particules de diamètre inférieur à 0,5 μm , malgré le fait que le dispositif de prélèvement soit configuré pour collecter des particules de diamètre égal 0,33 μm . Ces résultats pourraient s'expliquer par une agglomération de nos particules. Cette hypothèse est confirmée par les résultats de l'analyse par granulométrie laser (**Figure III-3**). Rappelons que préalablement à l'application de cette technique, les particules de l'échantillon sont mises en suspension dans l'eau ultra-pure, puis dispersées sous ultrasons. Cette procédure est appliquée de manière à séparer les particules qui pourraient être assemblées entre elles lors de la collecte de l'échantillon. Les résultats obtenus par cette technique, présentent des fréquences cumulées pour les trois échantillons de 96%, 95% et 97% de $\text{PM}_{2,5}$ respectivement pour le Rural (R),

Fann (P₁) et Faïdherbe (P₂). Les représentations des fréquences relatives des trois échantillons, obtenues par granulométrie laser possèdent une proportion importante de particules de taille inférieure à 0,5 µm avec 15%, 16% et 22% respectivement pour R, P₁ et P₂. Ces données granulométriques sont en accord avec celles obtenues dans d'autres études où la technique d'échantillonnage par impaction a été utilisée : à Abidjan en Côte d'Ivoire (Kouassi et al., 2010) et à Dunkerque en France (Cazier et al., 2011).

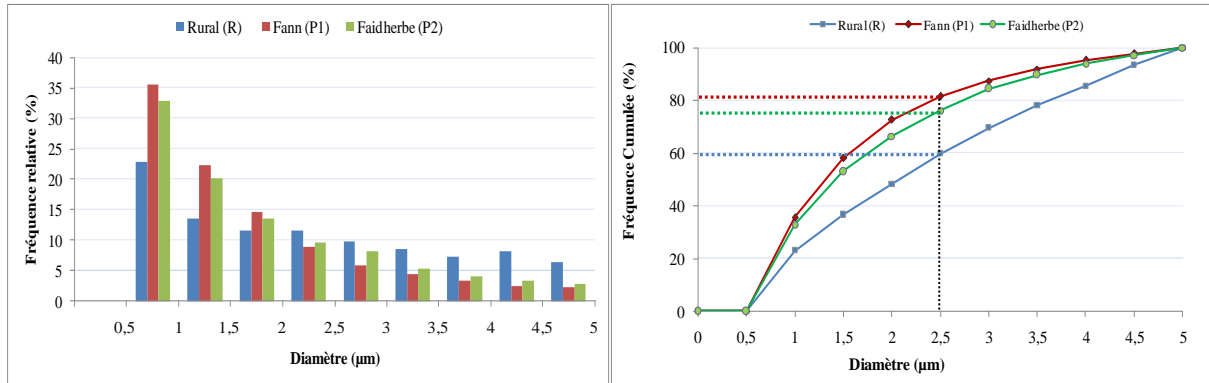


Figure III-2: Distribution granulométrique par MEB de l'échantillon sous forme de fréquences relative et cumulée.

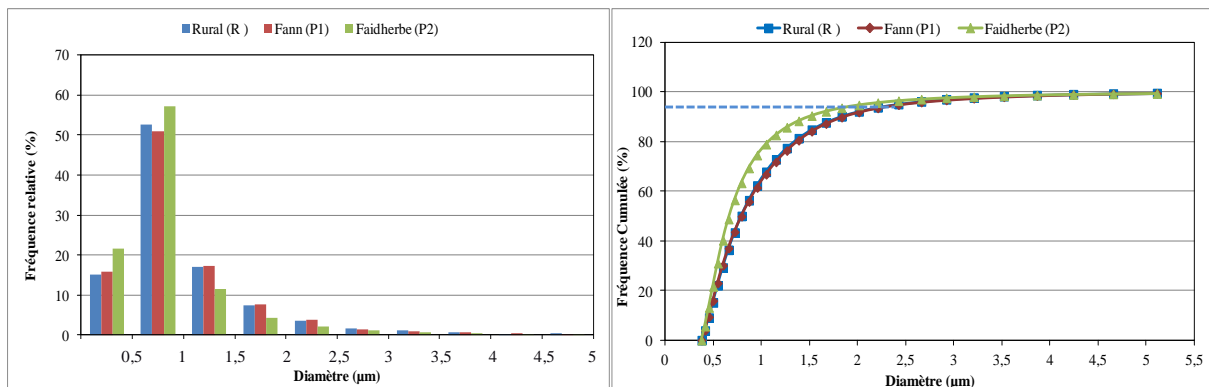


Figure III-3 : Distribution granulométrique par granulométrie laser de l'échantillon sous forme de fréquence relative et cumulée.

I.2. Surface spécifique

La détermination des surfaces spécifiques des trois échantillons de particules par adsorption d'azote à basse température a donné 13 m²/g, 13 m²/g et 8 m²/g respectivement pour les sites Rural (R), Fann (P₁) et Faïdherbe (P₂). Dans d'autres études, des valeurs d'aires spécifiques allant de 1 à 9 m²/g ont été obtenues : étude de PM_{2,5} collectées à Dunkerque (1 m²/g) (Billet et al., 2007), PM_{2,5} collectées dans le cadre du projet AFSSET sous influence rural (5 m²/g), urbaine (5,5 m²/g) et industrielle (6 m²/g). Par ailleurs dans l'étude menée à

Abidjan les surfaces spécifiques sont 2 ; 9 et 4 m²/g respectivement pour les sites rural, urbain et industriel (Kouassi et al., 2010). Il apparaît donc que les valeurs d'aires spécifiques de nos particules sont plus importantes et de ce fait peuvent accroître leur capacité à adsorber des composés organiques et donc exacerber leur toxicité.

I.3. Composition chimique des aérosols

I.3.1. Analyse individuelle des particules par MEB-EDX

L'analyse par MEB-EDX a permis d'avoir accès non seulement à la morphologie et à la taille des particules mais aussi à la composition en éléments présents en teneur significative dans chaque particule prise séparément.

Comme précisé dans le chapitre II, l'analyse individuelle de la composition d'environ 1000 particules par échantillon a été réalisée. Il est préalablement rappelé ici que l'ensemble des données de composition chimique de chaque particule a été soumis à une Classification Ascendante Hiérarchique (CAH), en utilisant le logiciel IDAS, développé à l'Université d'Anvers (Bondarenko et al., 1996). Ce traitement statistique permet de classer et regrouper les particules de composition chimique proche, aboutissant ainsi à la connaissance des types de particules (ou clusters) composant l'échantillon, ainsi que de leur abondance (ex : Si(98) correspond à une proportion massique de Si égale à 98%). Afin de désigner ces types de particules, nous avons retenu des critères de classification, qui s'appuient sur l'approche de Ebert et collaborateurs (Ebert et al., 2000) présentés sur le **Tableau III-2**.

L'analyse individuelle des particules a révélé une présence majoritaire d'éléments comme Si, Al, Ca, Fe, Na, S, Ti, Mg et Cl. Le traitement statistique de ces données indique qu'entre 8 et 12 clusters ont été identifiés par échantillons. Une part importante de particules Si-Al, correspondantes aux aluminosilicates, a été retrouvée dans chacun des trois aérosols (**Tableau III.3**) : type Si(51) Al(28) Mg(8) Ca(5) Fe (4) ; Si(63) Al(37) ; Si(62) Al(35) ; Si(56) Al(30) Ca(7) Fe(5). Ces particules présentent une abondance variable d'un site à un autre avec 58,4%, 20% et 15,8% respectivement pour le milieu rural (R), Fann (P₁) et Faidherbe (P₂). Des particules Si-riche ont été observées dans les trois échantillons avec des proportions variant entre 10 et 16% sur les trois échantillons. Ces types de particules présentent des formes irrégulières (**Figure III-5**) et sont d'origine naturelle donc, terrigène. Leurs formes irrégulières écartent toute hypothèse sur un processus de combustion dans la formation de ces particules et donc une origine anthropique (Ebert et al. 2000).

Tableau III-2 : Critères de composition chimique utilisés pour la définition des types de particules par analyse EDX

Type de particules	Classification*
Elément – riche**	$\geq 75\%$
Si-Al	$Si \geq 50\%$; $Al \geq 25\%$
Si-Al (Ca)	$Si + Al \geq 50\%$ et $Ca \geq 10\%$
Si-Al (Na-Cl)	$Si + Al \geq 50\%$ et $Na+Cl \geq 10\%$
Si-Ca	$Si \geq 50\%$; $Ca \geq 25\%$
Si-Ca (Al,S)	$Si + Ca \geq 50\%$ et $Al \geq 10\%$; $S \geq 10\%$
Si-Mg (Al)	$Si + Mg \geq 50\%$ et $Al \approx K \geq 10\%$
Ca-S	$Ca + S \geq 80\%$ et Ca ou $S \geq 25\%$
Ca-Si	$Ca \geq 50\%$; $Si \geq 25\%$
Na-Cl (Si -Al)	$Na + Cl \geq 50\%$ et $Si + Al \geq 25\%$
Fe-Si (Al)	$Fe + Si \geq 50\%$ et $Al \geq 10\%$
Fe-Si (Ca)	$Fe + Si \geq 50\%$ et $Ca \geq 10\%$

* valeur en % : proportion massique de l'élément considéré par rapport à la somme des teneurs des éléments détectés dans la particule

** ex : riche en Fe ; riche en Si ; riche en Ca.

Les échantillons présentent aussi des particules de composition renfermant Si et Al mais également des agglomérats Na-Cl et Si-Al, type Si-Al (Na-Cl) ou Na-Cl (Si-Al) notamment dans les particules du site rural (R) et de Fann (P₁). On pourrait parler de particules mixtes résultantes de la coagulation entre les microgouttelettes marines et les particules terrigènes, riches en Si et Al (Andreae et al., 1986). Toutefois la proportion de ces particules est inférieure à 5%. On note cependant que l'analyse individuelle n'a pas révélé une présence de particules Na-Cl seules malgré l'influence du milieu marin sur les trois sites comme le présente les rétro-trajectoires des masses d'air (**Figure III-1**). En effet il a été montré les faibles vitesses de vent (3 m/s en moyenne) ne favorisent pas l'agitation de l'océan et donc la formation de particules marines (Ledoux et al., 2006).

Des particules contenant majoritairement du Ca ont été retrouvées dans les échantillons, types Ca-riche, Ca-Si et Ca-S. Les deux premiers types semblent confirmer l'origine naturelle des aérosols. Par contre les particules Ca-S comprenant les types Ca(52) S(48) ; Ca(80) S(5) ; Ca(53) S(47) et Ca(54) S(46), correspondent aux particules de gypse (CaSO₄, 2H₂O). Le gypse peut être d'origine naturelle, soit en tant que particules primaires, ou peut provenir de phénomènes de conversion suite aux réactions de particules riches en Ca et d'espèces soufrées (particules secondaires). En milieu urbain, le gypse pourrait avoir une origine anthropique en raison des réactions des particules riches en Ca avec le SO₂ d'origine

industrielles ou du trafic automobile (Van Malderen et al., 1996). Les proportions de ces particules de gypse sont de l'ordre de 6%, 8% et 3% respectivement pour R, P₁ et P₂.

Les particules Fe-riche ont été observées sur les échantillons urbains, de même que les particules de type Fe-Si. Ces dernières sont souvent associées aux éléments Al et Ca formant des types Fe-Si(Al) et Fe-Si(Ca). Ces particules présentent des formes irrégulières et seraient d'origine naturelle. Les proportions Fe-riche et Fe-Si en milieu urbain sont de 10% et 36% respectivement pour P₁ et P₂ contre environ 4% en milieu rural (R). Ceci laisse penser une contribution des activités anthropiques pour l'émission de ces particules. En effet cette part élevée dans l'échantillon urbain notamment dans P₂, pourrait s'expliquer en partie, par la mise en suspension de particules liées à l'usure de plaquette de frein (Salma and Maenhaut, 2006) et par les nombreuses activités métalliques qui se trouvent à proximité de ce site.

En résumé, l'analyse individuelle des particules par MEB-EDX a permis de montrer que les trois échantillons renfermaient des aluminosilicates traduisant une contribution terrigène, des particules résultantes de phénomènes de coagulation entre le sel marin et des d'aluminosilicates. Des particules de gypses (CaSO₄, 2H₂O) ont également été retrouvées et il ne peut pas être exclu que leur origine soit non seulement naturelle mais aussi anthropique notamment par les réactions des particules riches en Ca (Ca-riche) avec l'oxyde de soufre (SO₂) émis par la combustion de l'énergie fossile. Les proportions importantes de particules de Fer et de suies âgées en milieu urbain (**Figure III-5**) laissent supposer une contribution des activités anthropiques à l'émission de ces particules.

Tableau III-3: Types de particules identifiés dans les particules collectées sur les différents sites de Dakar : données d'analyse individuelle par MEB-EDX.

- Echantillon collecté en milieu rural (R)

Cluster	%	Na	Mg	Al	Si	S	Cl	Ca	Ti	Fe
1	16,3				Si(98)					
2	16,2		Mg(8)	Al(28)	Si(51)			Ca(5)		Fe(4)
3	7,0			Al(10)	Si(33)	S(13)		Ca(42)		
4	42,2			Al(37)	Si(63)					
5	5,6					S(48)		Ca(52)		
6	3,8			Al(10)	Si(27)				Ti(6)	Fe(53)
7	5,0					S(5)		Ca(80)	Ti(14)	
8	4,0	Na(32)		Al(37)	Si(21)		Cl(7)			

- Echantillon collecté en milieu urbain : Fann P₁

Cluster	%	Na	Mg	Al	Si	S	Cl	Ca	Ti	Fe
1	13,6				Si(94)					
2	5,9									Fe(95)
3	17,6							Ca(97)		
4	20,0			Al(35)	Si(62)					
5	3,9				Si(62)			Ca(38)		
6	8,7			Al(5)	Si(35)			Ca(51)		Fe(4)
7	8,7					S(47)		Ca(53)		
8	3,4	Na(55)		Al(8)	Si(21)	S(5)	Cl(7)	Ca(5)		
9	2,0				Si(22)			Ca(78)		
10	9,4			Al(30)	Si(46)			Ca(19)		
11	2,4		Mg(29)	Al(14)	Si(47)			Ca(6)		Fe(4)
12	4,6			Al(19)	Si(28)					Fe(38)

- Echantillon collecté en milieu urbain : Faidherbe P₂

Cluster	%	Na	Mg	Al	Si	S	Cl	Ca	Ti	Fe
1	12,2				Si(60)			Ca(40)		
2	12,4			Al(7)	Si(26)	S(5)		Ca(51)		Fe(9)
3	21,6							Ca(98)		
4	15,8			Al(30)	Si(56)			Ca(7)		Fe(5)
5	7,3									Fe(92)
6	17,1				Si(44)			Ca(14)		Fe(27)
7	10,0				Si(99)					
8	3,7					S(46)		Ca(54)		

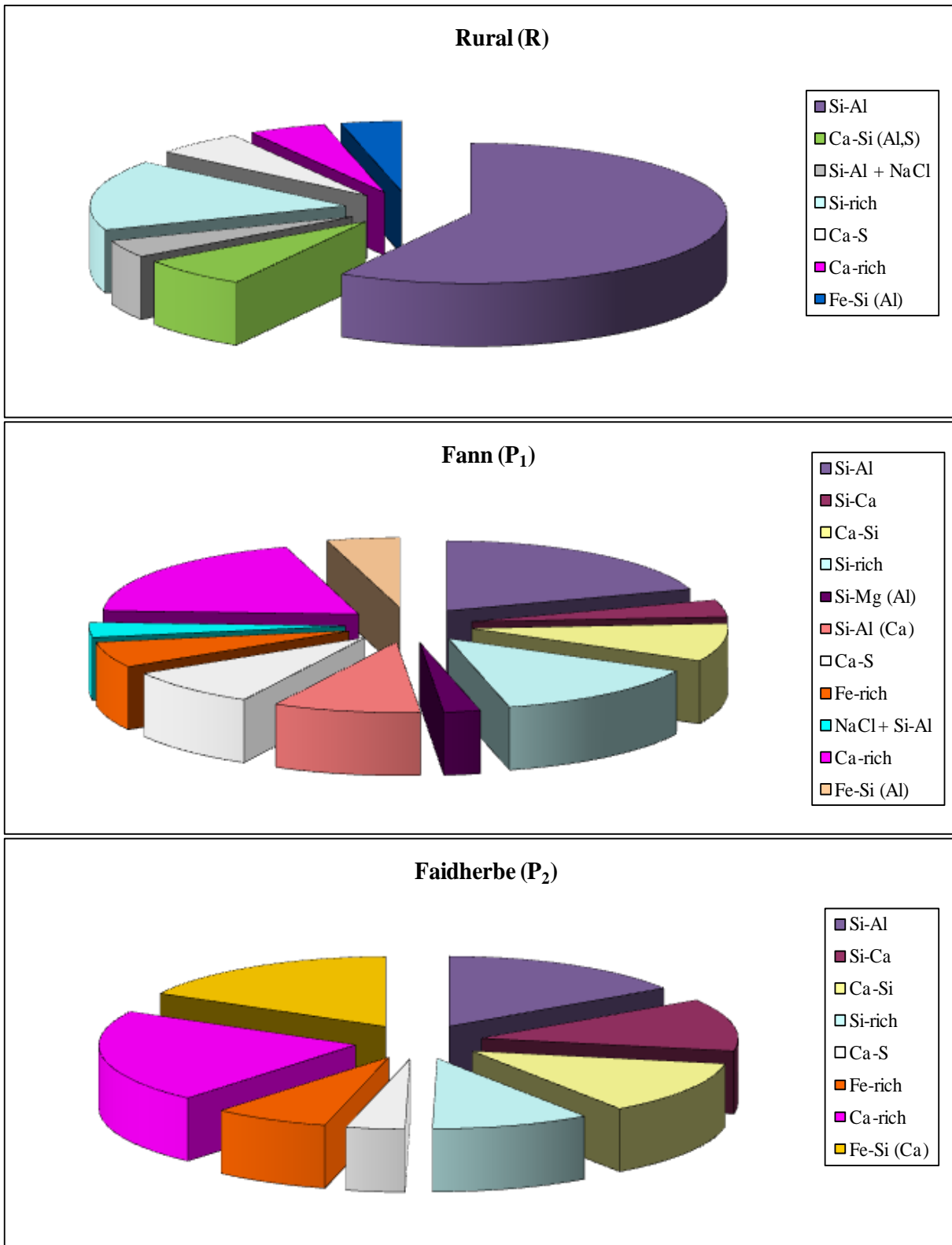


Figure III-4 : Proportion et composition chimique majoritaire au sein des types de particules prélevées à Dakar : zone rurale (R) et zone urbaine (P₁ et P₂).

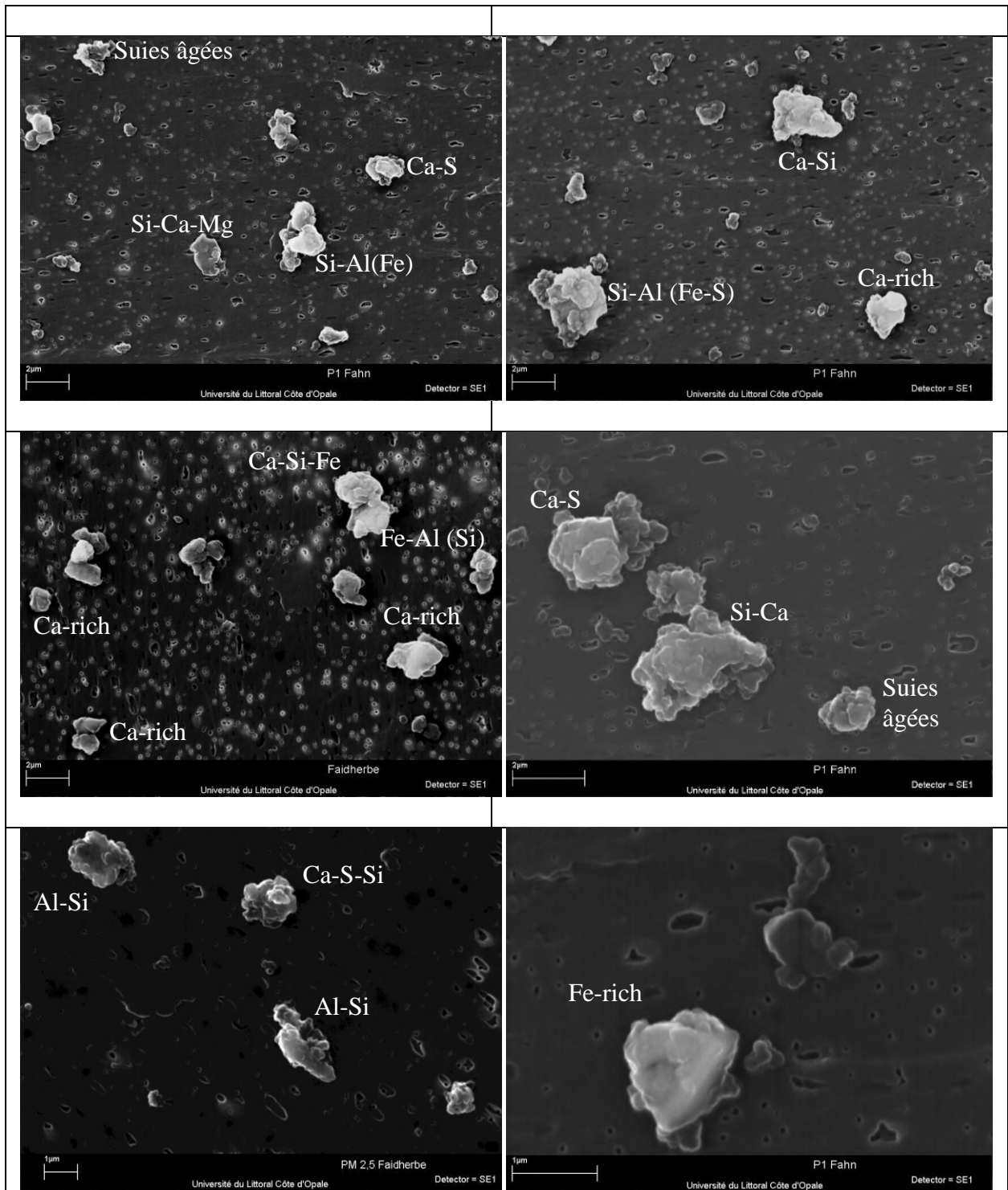


Figure III-5 : Images MEB-EDX de particules collectées sur les sites urbains (Dakar)

I.3.2. Analyse de la fraction inorganique des particules

Les analyses par spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif (ICP-MS) ont été entreprises de façon à déterminer les teneurs globales en métaux présents dans les particules. En parallèle, les teneurs en ions hydrosolubles ont été déterminées par chromatographie ionique (CI). L'ensemble de ces résultats est rassemblé dans le **Tableau III-4**. Une représentation de la répartition de ces espèces inorganiques est proposée sur la **Figure III-6**.

Quel que soit le site considéré, les particules présentent des éléments majoritaires comme Al, Fe et dans une moindre proportion Ti, éléments ayant en partie une origine naturelle, à savoir terrigène.

Par ailleurs, une variété de métaux parmi lesquels Fe, Sr, Mn, Zn, Ni, Cr, Cu, Pb, V,... ont été détectés. Il ressort que le fer est le métal le plus abondant parmi ceux énoncés ci-dessus. La **Figure III-6** montre une proportion plus élevée en métaux dans les aérosols urbains (35,5% et 49,2% respectivement pour P₁ et P₂) que dans les aérosols du site rural (R = 17,8%). Une discussion plus précise sur l'origine de ces métaux sera donnée plus loin, en s'appuyant sur la détermination des facteurs d'enrichissement.

L'analyse des ions par chromatographie ionique dans les trois aérosols a révélé une prédominance Ca²⁺, Na⁺, Cl⁻, SO₄²⁻, NO₃⁻ (**Tableau III-4**). Les plus fortes teneurs en ions sont généralement observées dans les aérosols urbains (P₁ et P₂), exception faite des ions NO₃⁻ dont les teneurs les plus faibles sont obtenues dans l'échantillon P₂. L'influence marine a été notée avec la présence de teneurs élevées d'ions Na⁺ et Cl⁻. La détermination des ratios molaires Cl⁻/Na⁺ pour les 3 aérosols montre des proportions relativement homogènes avec 0,564, 0,590, 0,532 respectivement pour R, P₁ et P₂. Ce rapport Cl⁻/Na⁺ est inférieur à celui de l'eau de mer égal environ à 1 (Khan et al., 2010). Ceci indique un déficit de Cl⁻ dans les trois aérosols. Ce phénomène pourrait s'expliquer par la tendance des aérosols marins à réagir rapidement avec les acides sulfurique et nitrique eux même issus de la présence d'oxydes de soufre et d'oxydes d'azote dans l'atmosphère. Il se produit le phénomène bien connu de perte de chlorures. Ces réactions sont possibles lorsque l'humidité relative est comprise entre 50-100% (Finlayson-Pitts and Pitts, 2000). Ceci corrobore avec les données de l'Agence Nationale de la Météorologie du Sénégal, présentées sur le **Tableau III-1**. Les concentrations en ions SO₄²⁻ obtenues dans les aérosols urbains sont environ deux fois supérieures à celle du site rural (*i.e.* P₁ = 1,920 µg/m³, P₂ = 1,25 µg/m³; R = 0,782 µg/m³). Ces résultats sont comparables à celle de l'étude réalisée par Weinstein et al (2010) à Conakry (Guinée Conakry) avec 1,470 µg/m³ dans les PM_{2,5} (Weinstein et al., 2010). Néanmoins les ions SO₄²⁻

tout comme les ions K^+ , présentent différentes origines, anthropique ou naturelle (marine). En s'appuyant sur l'approche de Wang et Shooter (2001), nous avons pu déterminer les proportions de ces ions n'ayant pas une origine marine (Wang and Shooter, 2001):

$$C_{nss-SO_4^{2-}} = C_{SO_4^{2-}} - 0,2455 C_{Na^+}$$

$$C_{nss-K^+} = C_{K^+} - 0,0355 C_{Na^+}$$

$$C_{nss-SO_4^{2-}} : SO_4^{2-} \text{ non marin}$$

$$C_{nss-K^+} : K^+ \text{ non marin}$$

nss : non sea salt (en français : non marin)

Les résultats de ce calcul permettent d'estimer que 44,4%, 71,3% et 59,4% de SO_4^{2-} et 32,9%, 61,4% et 65,8% de K^+ ne proviendraient pas de la mer respectivement pour R, P₁ et P₂. En effet le sulfate proviendrait de la combustion de l'énergie fossile notamment des véhicules consommant du carburant diesel (Cheng et al., 2010). La concentration de cet ion est plus élevée à Fann (P₁) où la majorité du trafic est assurée par les véhicules de transport en commun appelés « car rapides », utilisant majoritairement le carburant diesel. Ces données montrant que les sulfates ont majoritairement une origine non marine au niveau des sites urbains, apparaissent en bon accord avec la proposition que ceux-ci proviennent de phénomènes de conversion, conduisant notamment aux particules de gypse $CaSO_4 \cdot 2H_2O$. Quant à l'origine du potassium, elle pourrait s'expliquer par des émissions issues de la combustion de la biomasse, notamment avec l'utilisation du charbon de bois dans la cuisine en milieu urbain (Mkoma et al. 2009).

La détermination du facteur d'enrichissement (FE) permet de préciser l'origine des éléments inorganiques. Généralement l'Aluminium (Al) est utilisé comme élément de référence en raison de l'absence de sources anthropiques significatives de cet élément. En ce qui concerne notre site d'étude (Dakar), des sources potentielles de Al existent car, outre l'usine de cimenterie présente à Dakar, l'exploitation de phosphate d'alumine est proche de l'agglomération. Dans de telles situations, il peut être judicieux d'utiliser comme référence l'élément Titane (Ti) qui est d'ailleurs recommandé dans des études réalisées dans les régions soumises aux poussières du Sahara (Eltayeb et al., 2001; Kouassi et al., 2010). Les données de la composition en éléments du sol ont été obtenues à partir des études faites sur la croûte terrestre de l'Afrique de l'Ouest Attoh and Morgan, 2004 et Kikouama et al., 2009. Le rapport d'enrichissement a été calculé à partir de la relation :

$$FE = \frac{[E]_{PM} / [Ti]_{PM}}{[E]_{sol} / [Ti]_{sol}}$$

FE : Facteur d'Enrichissement

PM : Particulate matter

[E]_{PM} : Teneur de l'élément dans les particules

[E]_{sol} : Teneur de l'élément dans le sol

[Ti]_{PM} : Teneur de Titane dans les particules

[Ti]_{sol} : Teneur de Titane dans le sol

Lorsque le rapport des teneurs dans l'atmosphère est égal à celui des teneurs au niveau du sol (FE=1), il peut être admis que l'élément étudié présente majoritairement une origine terrigène. En revanche, quand la valeur de FE > 1 la contribution anthropique à la mise en suspension de l'élément étudié est notée. Il est admis que lorsque les valeurs de FE dépassent 10, l'influence anthropique est très significative (Senlin et al., 2008).

La **Figure III-7** représente les valeurs du Facteur d'enrichissement de différents éléments et ceci pour les trois échantillons de PM_{2,5}. Avec des valeurs comprises entre 1 et 5, les éléments Fe, Al, Mn, Co, V, Cr et Ni présentent majoritairement une origine naturelle. Toutefois, le facteur d'enrichissement de Al est supérieur à 10 dans l'échantillon rural. Ceci pourrait s'expliquer par une croûte terrestre de cette zone riche en phosphate d'alumine dont l'exploitation de ce phosphate située à environ 20 km du site rural contribuerait grandement à la mise en suspension de cet élément.

Les facteurs d'enrichissement de Ba, Pb, Zn, Cu, Ce, La, supérieur à 10 indique l'origine anthropique de ces éléments. Notons que pour Zn et Pb, le FE est plus élevé pour les échantillons urbains. Les sources potentielles du Zn, Pb et Cu en milieu urbain, sont variées. En effet, outre le trafic automobile, ces éléments peuvent également être émis par la combustion de l'énergie fossile, l'abrasion des freins, le port de Dakar et les nombreuses activités métalliques très présentes, près du site de Faidherbe en particulier. Ces émissions diverses contribueraient leur à présence dans l'atmosphère (Salma and Maenhaut, 2006; Kim Oanh et al., 2010). D'autre part le recyclage des batteries de voitures à Dakar a longtemps constitué une source de Pb dans l'atmosphère à Dakar (Camara et al., 2010).

Tableau III-4: Composition en métaux (ICP-MS) et en ions hydrosolubles (chromatographie ionique) dans les aérosols collectés à Dakar

Métaux	Rural (R)		Fann (P ₁)		Faidherbe (P ₂)	
	µg/mg	µg/m ³	µg/mg	µg/m ³	µg/mg	µg/m ³
Fe	23,3	0,393	40,4	3,03	43,4	4,57
Al	54,4	0,918	37,2	2,78	26,2	2,76
Ti	1,3	0,022	2,2	0,168	2,4	0,256
Sr	0,295	0,005	0,359	0,027	0,452	0,048
Mn	0,219	0,004	0,355	0,027	0,339	0,036
Ba	0,245	0,004	0,353	0,026	0,384	0,040
Zn	0,095	0,002	0,317	0,024	0,513	0,054
Pb	0,026	4.10 ⁻⁴	0,093	0,007	0,183	0,019
Cu	0,031	0,001	0,064	0,005	0,055	0,006
Ce	0,043	0,001	0,035	0,003	0,034	0,004
V	0,012	2.10 ⁻⁴	0,025	0,002	0,033	0,004
Cr	< LQ	< LQ	0,024	0,002	0,033	0,003
La	0,020	3.10 ⁻⁴	0,021	0,002	0,019	0,002
Ni	< LQ	< LQ	0,019	0,001	0,023	0,002
Total	132,1	2,23	103,3	7,74	93,1	9,80

Ions	Rural (R)		Fann (P ₁)		Faidherbe (P ₂)	
	µg/mg	µg/m ³	µg/mg	µg/m ³	µg/mg	µg/m ³
Cl ⁻	91,34	1,54	27,28	2,04	16,33	1,72
SO ₄ ²⁻	46,32	0,782	25,63	1,92	11,86	1,25
NO ₃ ⁻	38,80	0,655	21,17	1,59	3,28	0,346
F ⁻	< LQ	< LQ	0,593	0,044	1,35	0,142
Na ⁺	104,9	1,77	29,9	2,24	19,6	2,07
K ⁺	5,5	0,094	2,7	0,206	2,0	0,215
Mg ²⁺	8,0	0,135	4,7	0,352	2,1	0,225
Ca ²⁺	74,6	1,26	36,0	2,70	19,7	2,08
Total	369,5	6,2	148,1	11,1	76,4	8,0

< LQ : inférieur à la limite de quantification

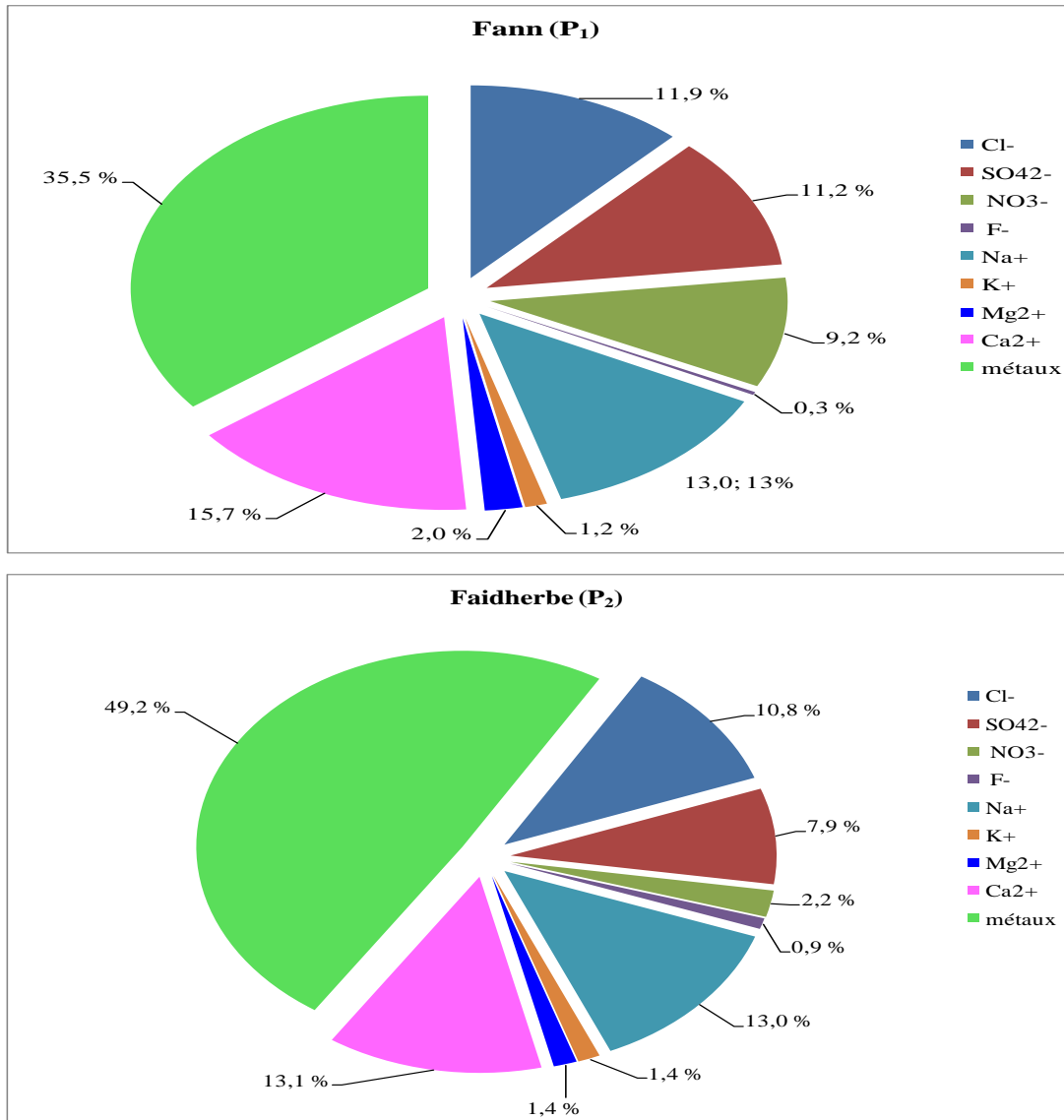


Figure III-6 : Répartition des métaux et des ions majeurs dans les PM_{2,5} collectées à Dakar

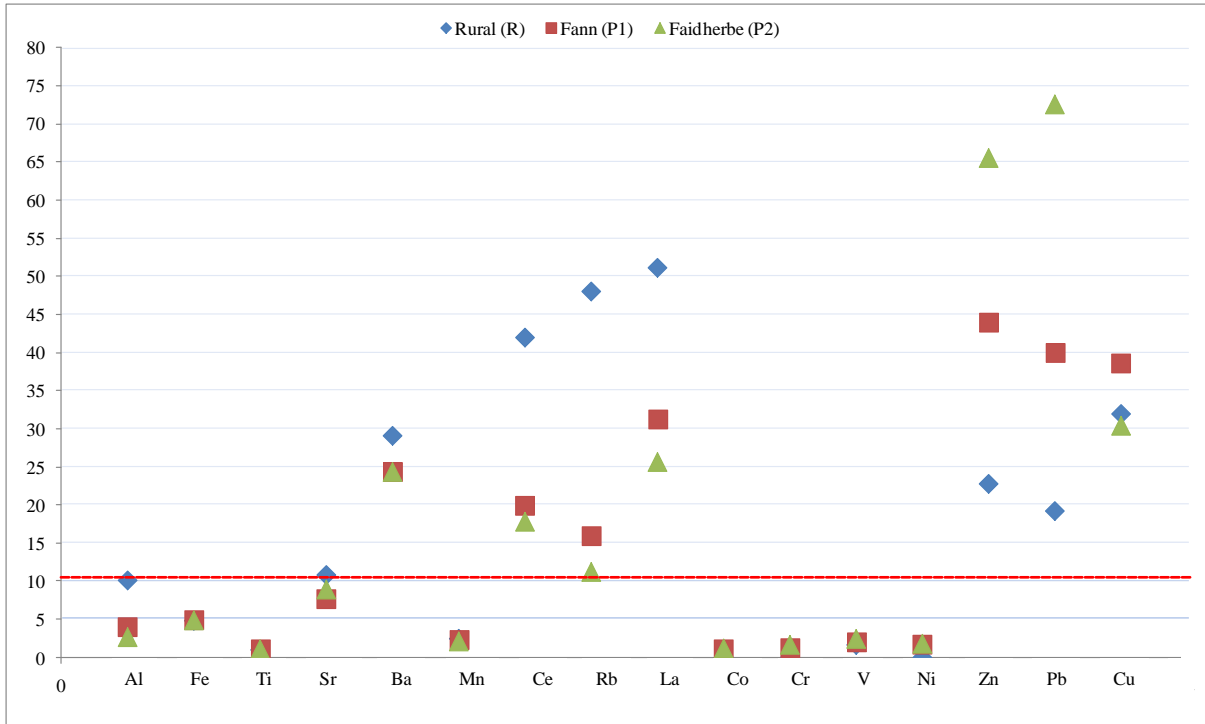


Figure III-7 : Facteur d'enrichissement calculé pour chaque élément en utilisant l'élément titane (Ti) comme référence

I.3.3. Analyse de la fraction organique des aérosols

L'analyse de la fraction organique des aérosols, par GC-MS, a révélé la présence de Composés Organiques Volatils (COV), d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) et de Paraffines (**Tableau III-5 et Figure III-8**) sur les trois échantillons.

Les teneurs en COV sont élevées sur les trois aérosols (*i.e.* R = 24,1 ng/m³ ; P₁ = 37,4 ng/m³ et P₂ = 43,3 ng/m³) avec un léger gradient allant de P₂ > P₁ > R. Ces concentrations importantes sont surtout dues aux teneurs élevées du Xylène (o, m, p, xylène) qui représentent plus de 75% de la concentration totale obtenue. En milieu rural les COV proviendraient principalement de la combustion de la biomasse notamment au brulage des herbes pendant la préparation des champs alors qu'en milieu urbain le trafic constitue la principale source d'émission en particulier les véhicules qui consomment du carburant diesel (Liu et al., 2008).

Les paraffines sont constituées de 19 composés essentiellement des n-alcane allant de C₁₅ à C₃₃. Les teneurs sont beaucoup plus élevées dans les échantillons urbains (P₁ et P₂) et présentent un profil similaire. Leurs concentrations sont très faibles en milieu rural comme on peut le remarquer sur la **Figure III-8**. L'abondance de ces composés est observée dans la section centrale des profils allant de C₂₀-C₂₉ avec des maxima obtenus entre C₂₃-C₂₅ pour P₁ et C₂₁-C₂₅ pour P₂. Ce qui suggère une contribution des véhicules à l'émission de ces composés (Schnelle-Kreis et al., 2005; Li et al., 2010).

Les concentrations plus importantes en HAP ont été également détectées dans les aérosols urbains (*i.e.* $P_1 = 2,81 \text{ ng/m}^3$ et $P_2 = 2,73 \text{ ng/m}^3$). Les teneurs sont plus élevées que celles obtenues dans l'étude réalisée à Dunkerque par Cazier et collaborateurs (Cazier et al., 2011) en milieu urbain ($0,764 \text{ ng/m}^3$) et industrielle ($1,109 \text{ ng/m}^3$). Parmi les HAP retrouvés, certains sont connus pour leurs effets toxiques potentiels, comme le Benzo[a]Pyrène (Janistcki et al., 2009; Pedersen et al., 2009). Nous avons voulu déterminer l'influence des véhicules utilisant du carburant diesel dans l'émission des HAP en s'appuyant sur les rapports suivants empruntés à certaines études réalisées (Ravindra et al., 2006; Cazier et al., 2011) :

(1): Fluoranthène / Fluoranthène + Pyrène

(2): B[a]P / B[a]P+ Chrysène

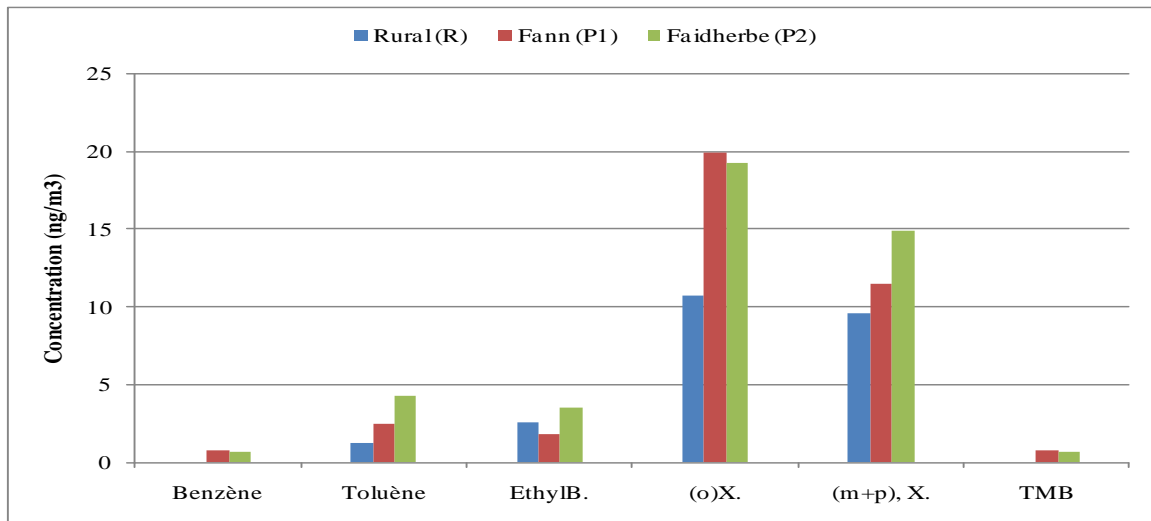
Lorsque les émissions diesels sont majoritaires les deux rapports (1) et (2) donnent respectivement 0,61 et 0,5 (Cazier et al. 2011). Les résultats obtenus pour nos échantillons urbains donnent pour le rapport (1), 0,45 et 0,37 respectivement pour P_1 et P_2 et pour le rapport (2) 0,54 et 0,48 pour P_1 et P_2 . On observe de ce fait des valeurs qui sont proches de celles de la contribution des véhicules diesel notamment dans l'échantillon P_1 . L'observation du profil des HAP (**Figure III-8**) montre que les composés légers sont plus présents à Faidherbe (P_2) alors que les lourds sont plus présents dans l'échantillon de Fann (P_1). Ceci concorde avec les caractéristiques des deux sites de prélèvement. En effet à Faidherbe on ne pourrait exclure les émissions liés au dépôt d'hydrocarbures notamment de sa proximité avec le port de Dakar alors que à Fann (P_1) la majorité du trafic automobile assurée par les véhicules de transport en commun, utilisant majoritairement du carburant diesel contribuerait grandement aux émissions de HAP lourds. Ceci a été confirmé par les études réalisées par Tarek et collaborateurs en Egypte et Ravindra et collaborateurs en Belgique (Aboul-Kassim and Simoneit, 1995; Ravindra et al., 2006; Kotianová et al., 2008).

Tableau III-5 : Composés organiques Volatils (COV), Paraffines et Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) adsorbés à la surface des aérosols, détectés GC-MS

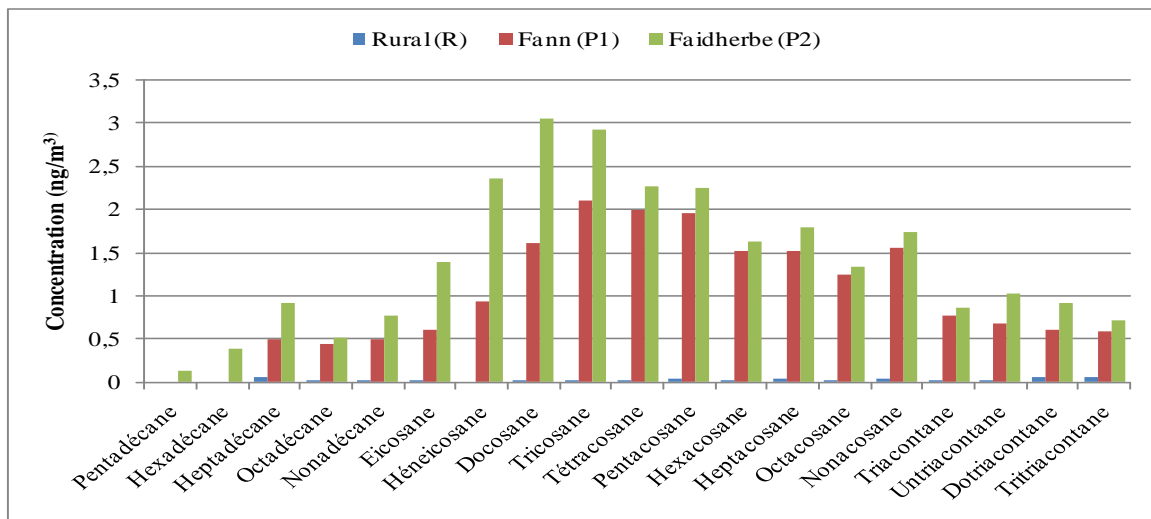
	Rural (R)		Fann (P ₁)		Faidherbe (P ₂)	
	µg/g	ng/m ³	µg/g	ng/m ³	µg/g	ng/m ³
COV						
Benzène	< LQ	< LQ	10,3	0,769	6,3	0,664
Toluène	73,4	1,239	33,3	2,492	40,6	4,27
Ethylbenzène (EthylB.)	152,6	2,575	24,1	1,807	33,0	3,47
O.Xylène (O,X.)	638,4	10,8	266,6	20,0	183,6	19,3
(m+p), Xylène (m+p X)	566,1	9,6	153,9	11,5	141,4	14,9
Triméthylbenzène (TMB)	< LQ	< LQ	10,4	0,782	6,5	0,687
Total COV	1430,4	24,1	498,7	37,4	411,4	43,3
Paraffines						
Pentadécane	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	1,26	0,132
Hexadécane	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	3,64	0,383
Heptadécane	3,47	0,059	6,52	0,488	8,70	0,915
Octadécane	1,31	0,022	5,86	0,439	4,81	0,506
Nonadécane	1,12	0,019	6,54	0,490	7,37	0,775
Eicosane	0,41	0,007	8,11	0,608	13,21	1,39
Héneicosane	< LQ	< LQ	12,5	0,933	22,43	2,36
Docosane	0,06	0,001	21,5	1,61	29,08	3,06
Tricosane	0,06	0,001	28,2	2,11	27,78	2,92
Tétracosane	1,19	0,020	26,6	1,99	21,63	2,28
Pentacosane	2,34	0,039	26,1	1,96	21,38	2,25
Hexacosane	1,09	0,018	20,2	1,51	15,45	1,63
Heptacosane	1,84	0,031	20,2	1,51	17,03	1,79
Octacosane	0,88	0,015	16,7	1,25	12,66	1,33
Nonacosane	2,11	0,036	20,8	1,56	16,57	1,74
Triacontane	1,20	0,020	10,2	0,766	8,26	0,869
Untriacontane	0,65	0,011	8,96	0,671	9,72	1,02
Dotriacontane	3,16	0,053	8,18	0,613	8,79	0,924
Tritriacontane	3,37	0,057	7,79	0,583	6,82	0,717
Total Paraffines	24,3	0,409	254,9	19,1	256,6	27,0
HAP						
Naphtalène	< LQ	< LQ	0,749	0,056	< LQ	< LQ
Phenanthrène	< LQ	< LQ	1,53	0,114	2,4	0,250
Fluoranthène	< LQ	< LQ	1,76	0,132	2,5	0,266
Pyrène	< LQ	< LQ	2,18	0,163	4,4	0,458
Benzo[a]Anthracène	< LQ	< LQ	3,49	0,261	< LQ	< LQ
Chrysène	< LQ	< LQ	2,94	0,220	3,28	0,345
Benzo[b]Fluoranthène	< LQ	< LQ	6,75	0,505	2,70	0,284
Benzo[k]Fluoranthène	< LQ	< LQ	2,61	0,196	1,22	0,128
Benzo[a]Pyrène	< LQ	< LQ	3,53	0,264	3,0	0,315
Indeno[1,2,3-c,d]Pyrène	< LQ	< LQ	5,83	0,436	2,99	0,314
Benzo[g,h,i]Pérylène	< LQ	< LQ	6,15	0,461	3,55	0,374
Total HAP	< LQ	< LQ	37,5	2,81	26,0	2,73

< LQ : inférieur à la limite de quantification

- **Composés Organiques Volatils (COV)**



- **Paraffines**



- **Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP)**

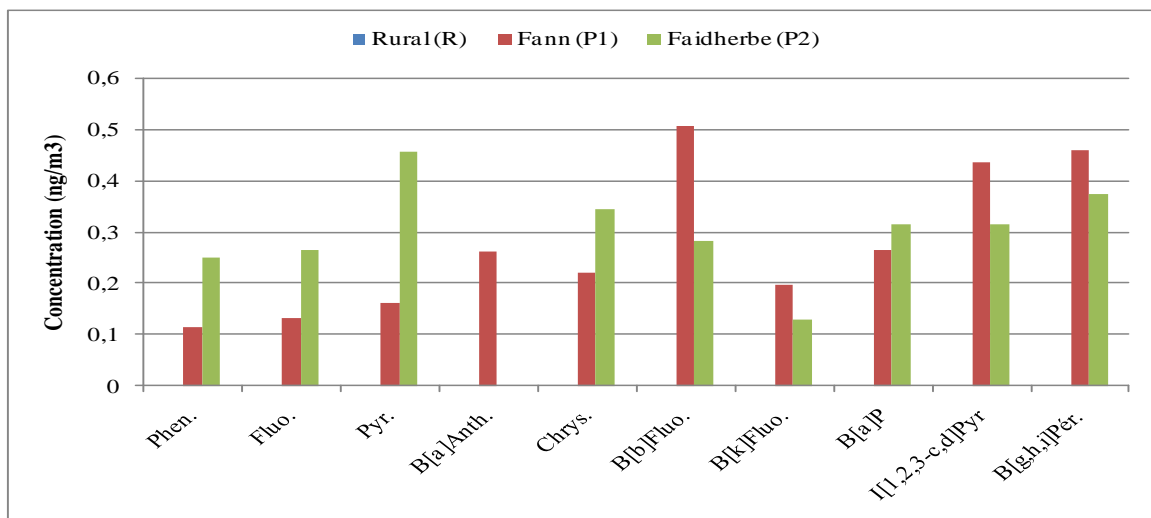


Figure III-8 : Profils des composés organiques adsorbés à la surface des particules collectées à Dakar

I.4. Conclusion sur les caractéristiques physico-chimiques des aérosols de Dakar

Les aérosols qui ont servi à notre étude ont été collectés de fin juillet à mi octobre sur 3 sites : deux sites urbains de la ville de Dakar, sous influence du trafic automobile dense (Fann ou P₁ et Faidherbe ou P₂) et un site témoin rural (R). Les prélèvements ont été effectués par un impacteur en cascade à haut débit.

L'analyse granulométrie a montré la performance du système de prélèvement par impacteur en cascade avec en moyenne 96% de PM_{2,5} de taille comprise entre 0,3 et 2,5µm, donc des particules susceptibles de pénétrer profondément dans les voies respiratoires.

Par la détermination de leurs caractéristiques chimiques, il a été montré que les échantillons correspondaient à des mélanges complexes et hétérogènes de composés dans lesquels ont été identifiées :

- des influences terrigènes, notamment au travers de la présence de Si, Al, Ti et Fe;
- des influences marines, au regard des teneurs en Na⁺ et ions Cl⁻ ;
- des influences anthropiques, avec la présence plus importante dans les échantillons urbains de métaux comme Fe, Cr, Cu, Pb, Zn ; d'espèces ioniques issues de la conversion de gaz – particules (NO₃⁻, SO₄²⁻) et de composés organiques (COV, Paraffines et HAP).

Il est apparu que chacun des échantillons présentait des spécificités qui les distinguent l'un de l'autre. Les échantillons collectés en milieu urbain (P₁ et P₂) présentent des enrichissements significatifs en Cr, Cu, Pb et Zn, ce qui se justifie par une contribution anthropique à l'émission de ces éléments notamment par le trafic automobile. La présence de des suies carbonées dans les échantillons confirme cet apport des activités anthropiques. Il a été noté des teneurs totales en métaux plus élevées dans l'échantillon P₂ que dans P₁. Cette tendance est également observée pour les COV et les paraffines. En revanche les HAP sont plus abondants dans P₁. Les activités métalliques présentes à proximité du site P₂ et sa proximité avec le port justifieraient les teneurs plus élevées en métaux. Par contre les véhicules de transport en commun majoritairement présents au site P₁ et utilisant le diesel expliqueraient la tendance des teneurs en HAP.

L'échantillon collecté en zone rurale, constituant un témoin dans cette étude, renferme une part élevée de particules terrigènes, comme les aluminosilicates.

La connaissance de ces caractéristiques physico-chimiques constitue un critère essentiel dans l'étude de la toxicité *in vitro* des particules.

IV. Etude toxicologique

II.1. Etude de la cytotoxicité globale

Les résultats de l'incorporation de la BrdU présentés sur la **Figure III-9** montrent une variation de celle-ci dans les cellules exposées aux fractions particulaires des différents aérosols. Une diminution significative a été observée après 72h d'incubation à partir des concentrations 24, 12 et 6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ respectivement pour les cellules exposées aux particules du site rural (R), Fann (P₁) et de Faidherbe (P₂). De même une diminution de l'activité de la DHm dans les cellules exposées aux aérosols du site rural (R) à la concentration 48 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ après 72h d'incubation est observée comme le montre la **Figure III-10**. Pour les cellules exposées aux particules urbaines (Fann, P₁ et Faidherbe, P₂), des diminutions significatives de la DHm ont été observées après 48h d'exposition respectivement aux concentrations 24 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ pour P₁ et 3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ pour P₂. Ces résultats montrent la capacité des aérosols à altérer la division cellulaire et le métabolisme mitochondrial.

L'observation des résultats de l'activité de la LDH extracellulaire présentés sur la **Figure III-11** n'a montré aucune augmentation significative dans les cellules exposées aux particules du site rural (R). En revanche des augmentations significatives de la LDH extracellulaire ont été constatées dans les cellules exposées aux particules urbaines dès la concentration 3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ respectivement après 24h d'incubation pour les cellules exposées aux particules de Fann (P₁) et 72h pour les cellules exposées aux particules de Faidherbe (P₂). Ce qui traduit une perturbation de l'intégrité et/ou de la perméabilité membranaire notamment dans les cellules exposées aux particules urbaines présentant des teneurs plus élevées en composés chimiques (inorganiques et organiques).

La relation dose/réponse déterminée à partir de l'étude de la cytotoxicité globale nous a permis de choisir deux concentrations (C₁ = 3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ et C₂ = 12 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) pour l'étude des mécanismes physiopathologiques induits par l'exposition des cellules aux aérosols (activation métabolique, stress oxydant et inflammation).

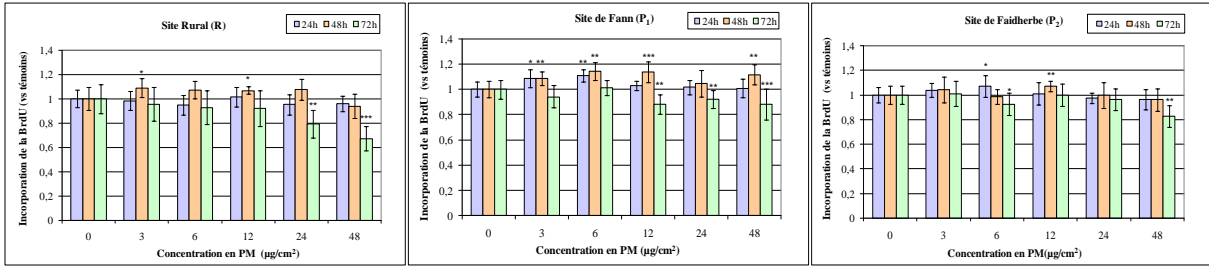


Figure III-9 : Incorporation de la 5-bromo-2-désoxyUridine (BrdU), normalisée par rapport au témoin, dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 24, 48 ou 72 h à des concentrations croissantes de particules collectées sur les trois sites (3, 6, 12, 24 ou 48 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Les résultats sont décrits par les moyennes et les écarts-types de 8 valeurs. (Mann-Whitney U-test; vs témoins; *= $p<0,05$; ** = $p<0,01$; * = $p<0,001$)**

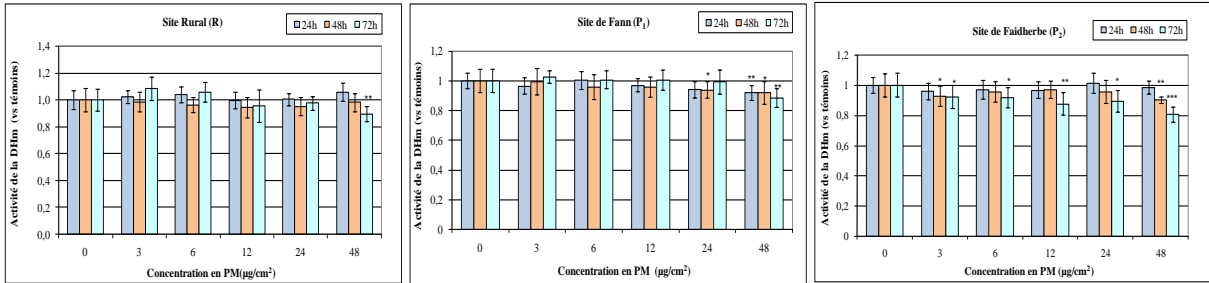


Figure III-10 : Activité de la DésHydrogénase mitochondriale (DHm), normalisée par rapport au témoin, dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 24, 48 ou 72 h à des concentrations croissantes de particules collectées sur les trois sites (3, 6, 12, 24 ou 48 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Les résultats sont décrits par les moyennes et les écarts-types de 8 valeurs. (Mann-Whitney U-test; vs témoins; *= $p<0,05$; ** = $p<0,01$; * = $p<0,001$)**

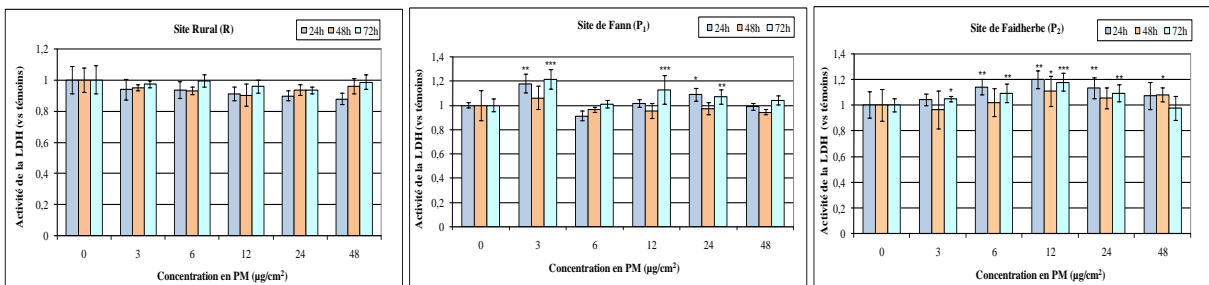


Figure III-11 : Activité de la Lactate Déshydrogénase (LDH) extracellulaire, normalisée par rapport au témoin, dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 24, 48 ou 72 h à des concentrations croissantes de particules collectées sur les trois sites (3, 6, 12, 24 ou 48 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Les résultats sont décrits par les moyennes et les écarts-types de 8 valeurs. (Mann-Whitney U-test; vs témoins; *= $p<0,05$; ** = $p<0,01$; * = $p<0,001$)**

II.2. Activation métabolique de la fraction organique des aérosols

L'analyse physico-chimique des échantillons d'aérosols a révélé la présence de nombreux composés organiques notamment de COV, de paraffines et d'HAP adsorbés à la surface de nos particules. Afin d'élucider l'implication de cette fraction organique dans la toxicité intrinsèque de l'aérosol, l'activation métabolique des COV et des HAP a été étudiée via la détermination de l'expression génique des *CYP1A1*, *1B1* et *2F1*, de la *NQO1* par la méthode de la RT-qPCR. Les particules de titane (TiO_2) ont été utilisées comme témoin négatif particulaire alors que le B[a]P, benzène et toluène ont servi de témoins organiques.

L'exposition des cellules BEAS-2B aux différents aérosols a entraîné une induction significative de l'expression du *CYP1A1* dans les cellules exposées aux particules urbaines (P_1 et P_2) comme on peut l'observer dans la **Figure III-12**. Cette expression est dose dépendante avec les plus fortes réponses observées dans les cellules exposées à la concentration maximale ($C_2 = 12\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de PM. Pour les cellules exposées aux particules du site Rural une induction significative du *CYP1A1* n'a été observée qu'à la concentration maximale de PM ($C_2 = 12\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Nous avons observé par ailleurs une expression plus importante dans cellules exposées aux aérosols urbains que celles exposées aux particules du site témoin. Aucune induction n'a été cependant notée pour les cellules exposées au témoin négatif particulaire (TiO_2) et aux témoins organiques, sauf pour le B[a]P où une induction significative a été rapportée après 24h d'incubation.

Une induction significative de l'expression du *CYP1B1* a été observée dans les cellules exposées aux trois aérosols, aux deux concentrations ($C_1 = 3\mu\text{g}/\text{cm}^2$ et $C_2 = 12\mu\text{g}/\text{cm}^2$), le plus souvent après 24 et 48h d'incubation (**Figure III-13**). Toutefois, cette expression est plus importante dans les cellules exposées aux PM urbains à la concentration maximale d'exposition après 48h d'incubation. Nous n'avons pas observé d'induction significative de l'expression du *CYP1B1* après 72h d'incubation sauf dans les cellules exposées aux aérosols de Fann (P_1) à la concentration maximale. En outre, aucune variation significative de la teneur en ARNm du *CYP1B1* dans les cellules exposées aux témoins organiques. Le *CYP1A1* est la principale enzyme impliquée dans la biotransformation des HAP et accessoirement le *CYP1B1* (Shimada and Fujii-Kuriyama, 2004; Uppstad et al., 2010), d'où l'expression plus importante *CYP1A1*. L'expression génique de ces enzymes plus importante dans les cellules exposées aux aérosols urbains, permet de mettre en relation ces résultats avec les caractéristiques chimiques des aérosols urbains contenant plus HAP que dans l'aérosol Rural. L'absence d'expression significative dans les cellules exposées aux témoins organiques pourrait être attribuée à la faible biodisponibilité de ces composés liée à

leur volatilisation notamment des COV à la température de l'incubateur (37°C). Le rôle de vecteur physique des particules atmosphériques permet en revanche d'accroître à la fois la pénétration et la rétention de ces composés organiques dans les cellules pulmonaires et peut favoriser leur activation métabolique (Garçon et al., 2001, 2004). Par ailleurs l'expression de ces enzymes dans l'aérosol Rural où ces composés n'ont pas été détectés, pourrait se justifier par la présence d'autres composés dérivés des HAP (dioxines, furanes, PCB...). Ces derniers, qui pourraient provenir de la combustion de la biomasse à proximité de ce site, n'ont pas été quantifiés lors de notre recherche et sont de puissants agonistes du récepteur AhR induisant ainsi le *CYP1A1* (Billet et al., 2008; Andrysík et al., 2011).

Une faible expression significative de la *NQO1* a été observée notamment dans les cellules exposées aux particules P₁ à la concentration C₁ après 48h d'incubation et aux particules P₂ à la concentration C₂ après 24 et 48h d'incubation (**Figure III-14**). La *NQO1* est une enzyme non inductible, contrairement au *CYP1A1* et *IB1*, qui intervient dans la détoxification des dérivés quinoniques résultants de la métabolisation des composés organiques comme le benzène et le B[a]P.

Aucune expression du *CYP2F1* n'a été observée dans les cellules exposées aux différents aérosols particuliers malgré la présence de COV dans les échantillons.

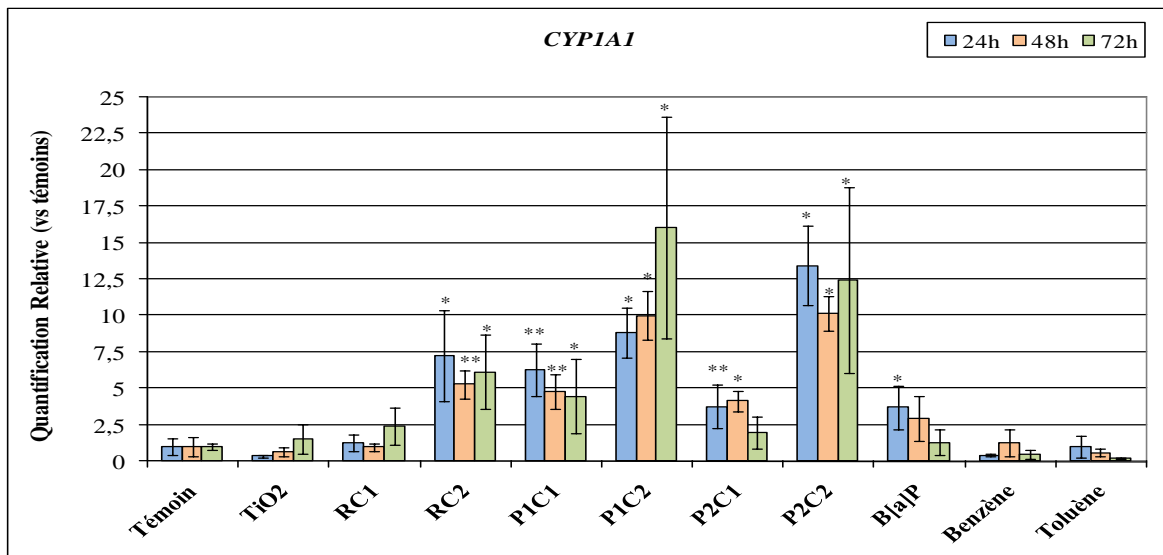


Figure III-12 : Expression génique du *Cytochrome P450 1A1* (*CYP1A1* ; vs témoins) dans les cellules BEAS-2B après 24, 48 ou 72h d'exposition au TiO₂ (C₂ = 12µg/cm²), aux fractions particulières des aérosols des sites rural (R) et urbains [Fann (P₁) et Faidherbe (P₂)] (C₁ = 3µg/cm² et C₂ = 12µg/cm²) au Benzo[a]Pyrène (B[a]P, 1µM), au Benzène (7µM), et au Toluène (7µM). Les résultats sont décrits par les moyennes et les écarts-types de 8 répliquats pour les témoins non exposés et de 4 répliquats pour les cellules exposées, ont été calculés par la méthode C_t. L'*ARN18S* a été utilisé comme gène de référence. (Mann-Whitney U-test; vs témoins; * = p<0,05; ** = p<0,01)

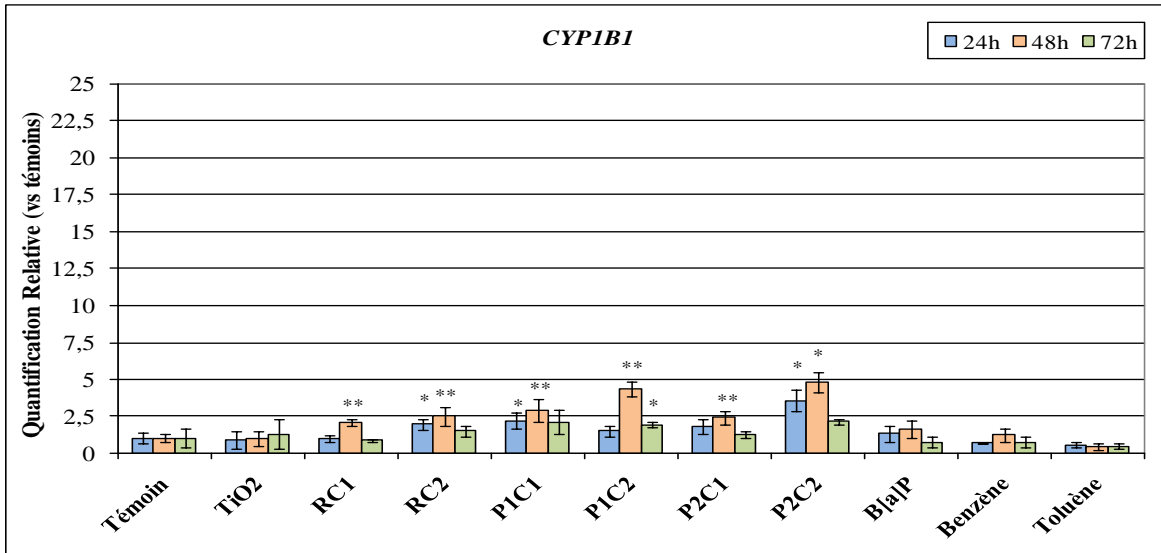


Figure III-13 : Expression génique du *CYtochrome P450 1B1* (*CYP1B1* ; vs témoins) dans les cellules BEAS-2B après 24, 48 ou 72h d'exposition au TiO_2 ($C_2 = 12\mu\text{g}/\text{cm}^2$), aux fractions particulières des aérosols des sites rural (R) et urbains [Fann (P_1) et Faidherbe (P_2)] ($C_1 = 3\mu\text{g}/\text{cm}^2$ et $C_2 = 12\mu\text{g}/\text{cm}^2$) au Benzo[a]Pyrène (B[a]P, $1\mu\text{M}$), au Benzène ($7\mu\text{M}$), et au Toluène ($7\mu\text{M}$). Les résultats sont décrits par les moyennes et les écarts-types de 8 répliquats pour les témoins non exposés et de 4 répliquats pour les cellules exposées, ont été calculés par la méthode C_t . L'*ARN18S* a été utilisé comme gène de référence. (Mann-Whitney U-test; vs témoins; *= $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$)

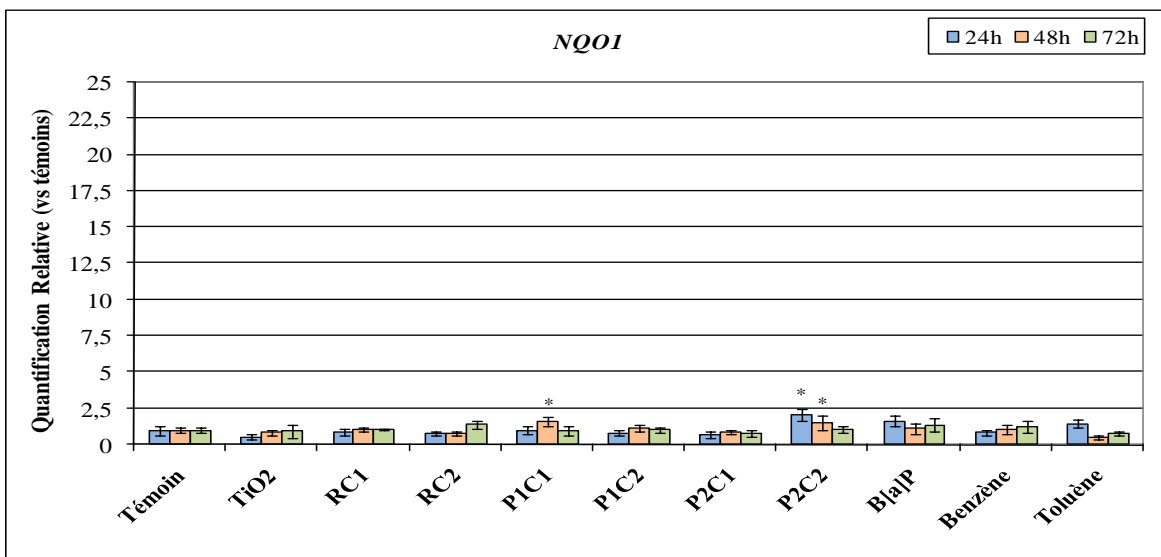


Figure III-14 : Expression génique du *NADPH Quinone Oxydo-reductase-1* (*NQO1* ; vs témoins) dans les cellules BEAS-2B après 24, 48 ou 72h d'exposition au TiO_2 ($C_2 = 12\mu\text{g}/\text{cm}^2$), aux fractions particulières des aérosols des sites rural (R) et urbains [Fann (P_1) et Faidherbe (P_2)] ($C_1 = 3\mu\text{g}/\text{cm}^2$ et $C_2 = 12\mu\text{g}/\text{cm}^2$) au Benzo[a]Pyrène (B[a]P, $1\mu\text{M}$), au Benzène ($7\mu\text{M}$), et au Toluène ($7\mu\text{M}$). Les résultats sont décrits par les moyennes et les écarts-types de 8 répliquats pour les témoins non exposés et de 4 répliquats pour les cellules exposées, ont été calculés par la méthode C_t . L'*ARN18S* a été utilisé comme gène de référence. (Mann-Whitney U-test; vs témoins; *= $p < 0,05$)

II.3. Stress oxydant

L'évaluation du stress oxydant dans les cellules BEAS-2B exposées aux fractions particulières des aérosols collectés a été déterminée grâce à deux méthodes complémentaires : la peroxydation lipidique par la détermination de la concentration cellulaire de Malondialdéhyde (MDA) et le statut du glutathion par le ratio glutathion disulfure (GSSG)/ glutathion réduit (GSH).

La **Figure III-15** montre la concentration de MDA dans les cellules BEAS-2B exposées aux trois aérosols (R, P₁ et P₂). On observe donc une variation des teneurs de MDA avec une augmentation significative observée que dans les cellules exposées aux particules urbaines prélevées à Fann (P₁) à la concentration maximale, après 24h d'incubation. Ce qui indique une peroxydation des acides gras membranaires. La détermination du ratio GSSG/GSH (**Figure III-16**) n'a pas permis d'observer d'augmentation significative dans les cellules BEAS-2B exposées aux trois échantillons d'aérosols par rapport aux témoins négatifs, contrairement à l'étude réalisée par Kouassi et collègues (2010) lors d'une exposition à court terme de cellules A549 aux PM_{2,5} urbains, industrielles et ruraux collectés dans la région d'Abidjan (Côte d'Ivoire). Ces résultats sont surprenants au regard des compositions chimiques de nos aérosols urbains en particulier, riches en éléments inducteurs potentiels d'un stress oxydant. Il a été décrit que les particules atmosphériques sont capables d'induire le stress oxydant directement via les métaux de transition ou indirectement via l'inflammation résultant de l'inhalation des PM, mais aussi par la formation de quinones réactives issues du métabolisme des HAP (Garçon et al., 2006; Øvrevik et al., 2010; Oh et al., 2011). Des teneurs élevées en ERO peuvent entraîner une modification du statut redox par une production de réactions en cascades pouvant conduire à l'apoptose (Dagher et al., 2007; Totlandsdal et al., 2010). Il a été également montré que l'exposition des organismes aérobies aux espèces pro-oxydantes pourrait entraîner l'activation de systèmes efficaces de défense antioxydants enzymatiques et non-enzymatiques dans les cellules. On peut donc penser que ces systèmes de défense anti-oxydante ont interagi avec l'excès de production d'ERO, limitant ainsi les dommages oxydatifs observables (Sun et al., 2008; Lonkar and Dedon, 2011; Ziech et al., 2011).

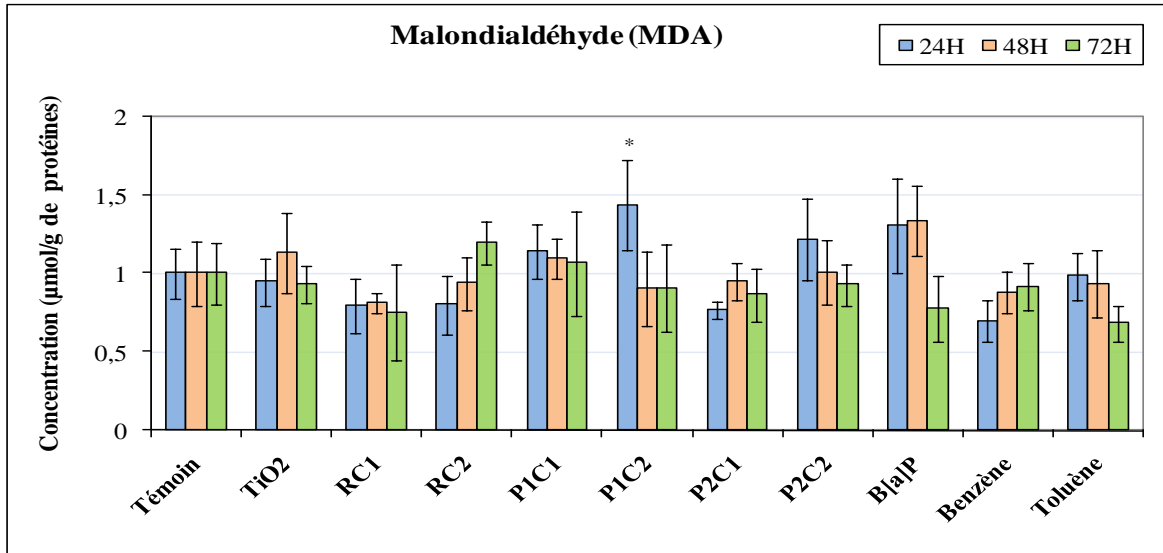


Figure III-15 : Taux de Malondialdéhyde (MDA) dans les cellules BEAS-2B après 24, 48 ou 72h d'exposition au TiO₂ (C₂ = 12µg/cm²), aux fractions particulières des aérosols des sites rural (R) et urbains [Fann (P₁) et Faidherbe (P₂)] (C₁ = 3µg/cm² et C₂ = 12µg/cm²) au Benzo[a]Pyrène (B[a]P, 1µM), au Benzène (7µM), et au Toluène (7µM). Les résultats sont décrits par les moyennes et les écarts-types de 8 répliquats pour les témoins non exposés et de 4 répliquats pour les cellules exposées. (Mann-Whitney U-test; vs témoins; *= p<0,05)

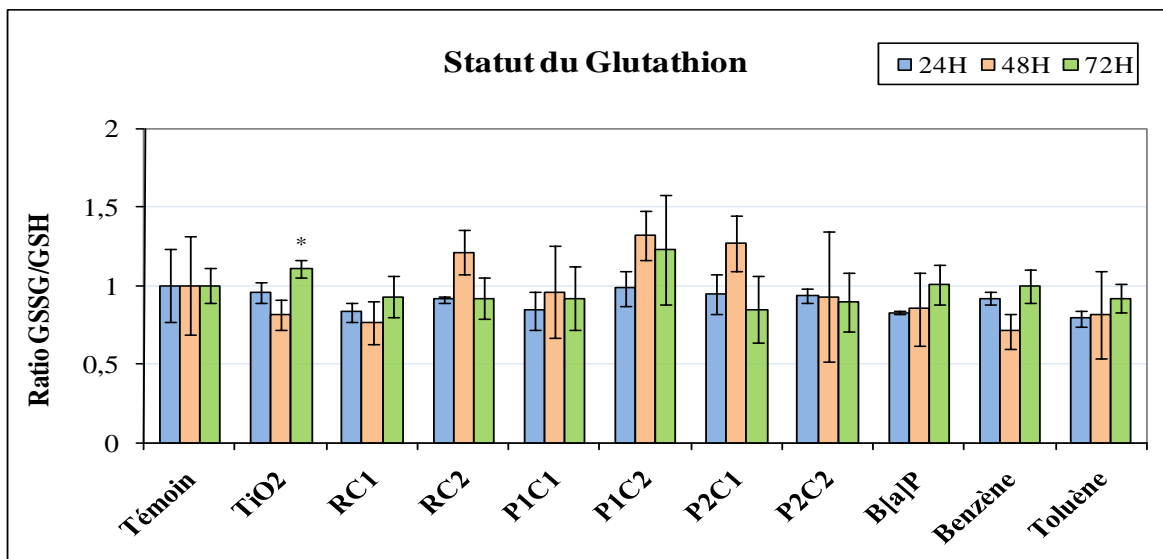


Figure III-16 : Ratio GSSG/GSH (vs témoins) dans les cellules BEAS-2B après 24, 48 ou 72h d'exposition au TiO₂ (C₂ = 12µg/cm²), aux fractions particulières des aérosols des sites rural (R) et urbains [Fann (P₁) et Faidherbe (P₂)] (C₁ = 3µg/cm² et C₂ = 12µg/cm²) au Benzo[a]Pyrène (B[a]P, 1µM), au Benzène (7µM), et au Toluène (7µM). Les résultats sont décrits par les moyennes et les écarts-types de 8 répliquats pour les témoins non exposés et de 4 répliquats pour les cellules exposées. (Mann-Whitney U-test; vs témoins; *= p<0,05)

II.4. Réponse inflammatoire

Le processus de réponse inflammatoire a été évalué via l'induction de l'expression génique et de la sécrétion protéique des cytokines inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8) dans les cellules BEAS-2B après 24, 48 ou 72h d'exposition au TiO₂ (C₂ = 12 μ g/cm²), aux fractions particulières des aérosols des sites rural (R) et urbains [Fann (P₁) et Faidherbe (P₂)] (C₁ = 3 μ g/cm² et C₂ = 12 μ g/cm²), au Benzo[a]Pyrène (B[a]P, 1 μ M) au Benzène (7 μ M), et au Toluène (7 μ M).

Les résultats présentés sur le **Tableau III-6** montrent l'expression des gènes des ARNm des cytokines inflammatoires. Une induction significative dose-dépendante de l'expression d'IL-1 β , IL-6 et IL-8 a été observée dans les cellules BEAS-2B exposées aux trois aérosols (R, P₁ et P₂) par rapport aux témoins non exposés après 24, 48 et 72h. Cette expression est plus importante dans les cellules exposées aux aérosols urbains (P₁ et P₂). Aucune induction de l'expression du gène TNF- α n'a été observée. En revanche **la Figure III-17**, montre une augmentation significative de la sécrétion protéique de TNF- α dans le surnageant des cellules BEAS-2B exposées aux trois échantillons particuliers d'une part, mais également dans celui des cellules exposées au TiO₂ et aux témoins organiques (B[a]P, Benzène et Toluène) d'autre part. De même, on a observé une augmentation significative dose-dépendante de la sécrétion de IL-6 et IL-8 respectivement, dans le surnageant des cellules exposées aux différents aérosols particuliers après 24, 48 et 72h d'incubation (**Figures III-19 et III-20**). Cette expression protéique est plus importante dans les cellules exposées aux particules urbaines. Par contre, aucune sécrétion significative n'a été observée dans les cellules exposées au TiO₂, tout comme chez les témoins organiques (B[a]P, Benzène et Toluène). Nous n'avons également pas observé d'augmentation significative de la concentration en protéines de IL-1 β dans le surnageant des cellules BEAS-2B, mis à part au niveau du surnageant des cellules exposées aux B[a]P après 48h d'incubation (**Figure III-18**).

Ces résultats montrent la capacité des aérosols à induire une réaction inflammatoire. En effet il a été montré que de nombreux gènes impliqués dans la réponse cellulaire sont régulés par le facteur de transcription NF- κ B. Ce facteur contrôle la transcription des gènes de la réponse inflammatoire tels que les gènes de cytokines et chimiokines (Takizawa et al., 1999; Shukla et al., 2000; Dagher et al., 2007). L'activation de ce facteur de transcription peut se faire via le Stress oxydant via les ERO, ou par la formation de quinones réactives issues du métabolisme des HAP (Takizawa et al., 1999; Shukla et al., 2000; Dagher et al., 2007). L'expression plus importante notée dans les cellules exposées aux particules urbaines (P₁ et P₂) pourrait donc s'expliquer par la présence plus importante d'éléments inorganiques et de

Chapitre III : Résultats et discussion

composés organiques adsorbés à leur surface que pour l'aérosol rural (R). Des concentrations plus importantes d'IL-6 ont été obtenues dans les cellules exposées aux différents aérosols en comparaison de TNF- α , IL-1 β et dans une moindre mesure IL-8. Cela se justifierait par l'action positive exercée par TNF- α et IL-1 β sur IL-6 qui, en retour a un rétro contrôle négatif sur ces derniers (Revillard, 1994).

Tableau III-6 : Expression génique des cytokines inflammatoires Interleukine-1 beta (IL-1 β), Interleukine 6 (IL-6) et Interleukine 8 (IL-8) dans les cellules BEAS-2B après 24, 48 ou 72h d'exposition au TiO₂ (C₂ = 12 μ g/cm²), aux fractions particulières des aérosols des sites rural (R) et urbains [Fann (P₁) et Faidherbe (P₂)] (C₁ = 3 μ g/cm² et C₂ = 12 μ g/cm²), au Benzo[a]Pyrène (B[a]P, 1 μ M), au Benzène (7 μ M) et au Toluène (7 μ M). Les résultats sont décrits par les moyennes et les écarts-types de 8 répliquats pour les témoins non exposés et de 4 répliquats pour les cellules exposées, ont été calculés par la méthode C_t. L'ARN18S a été utilisé comme gène de référence. (Mann-Whitney U-test; vs témoins; *= p<0,05; **= p<0,01)

	Témoin	TiO ₂	RC1	RC2	P1C1	P1C2	P2C1	P2C2	B[a]P	Benzène	Toluène	
IL-1 β	24h	1,00 ± 0,29	1,98 * ± 0,32	3,74 * ± 0,86	6,53 * ± 1,10	3,01 * ± 0,58	7,18 * ± 1,14	6,14 * ± 0,86	7,78 * ± 0,79	1,58 * ± 0,41	1,51 * ± 0,36	2,07 * ± 0,12
	48h	1,00 ± 0,29	0,84 ± 0,17	1,02 * ± 0,15	2,74 ** ± 0,55	2,13 ** ± 0,50	4,38 * ± 0,87	1,79 ± 0,50	5,26 ** ± 1,15	1,03 ± 0,37	0,52 ± 0,13	0,86 ± 0,27
	72h	1,00 ± 0,20	0,92 ± 0,30	0,59 ± 0,17	1,82 * ± 0,59	3,48 * ± 0,41	5,31 * ± 1,16	1,61 * ± 0,26	5,23 * ± 1,50	0,89 ± 0,26	0,89 ± 0,26	4,69 * ± 0,69
IL-6	24h	1,00 ± 0,30	1,74 ± 0,57	4,39 * ± 2,24	16,3 * ± 3,38	7,11 * ± 1,72	16,2 * ± 2,62	16,8 * ± 1,45	16,7 * ± 2,50	0,64 ± 0,22	0,49 ± 0,18	0,75 ± 0,22
	48h	1,00 ± 0,20	1,03 ± 0,24	4,83 ** ± 0,39	13,0 * ± 1,03	5,96 * ± 1,34	16,6 ** ± 3,73	8,69 * ± 1,87	18,2 ** ± 1,62	1,08 ± 0,30	0,60 ± 0,15	0,97 ± 0,23
	72h	1,00 ± 0,34	1,86 * ± 0,38	2,62 * ± 0,60	11,8 ** ± 2,70	10,5 ** ± 2,28	63,0 ** ± 9,63	8,75 * ± 2,17	21,5 * ± 2,96	0,66 ± 0,35	0,76 ± 0,22	3,98 * ± 0,68
IL-8	24h	1,00 ± 0,31	1,20 ± 0,33	6,35 ** ± 1,67	9,24 ** ± 0,83	8,71 ** ± 1,84	19,3 ** ± 3,99	16,4 ** ± 3,84	23,2 * ± 4,82	0,32 ± 0,12	0,29 ± 0,12	0,31 ± 0,11
	48h	1,00 ± 0,32	1,11 ± 0,21	6,98 ** ± 0,65	22,5 ** ± 1,83	9,42 * ± 2,37	40,6 ** ± 7,20	12,0 * ± 1,90	20,2 ** ± 4,56	1,34 ± 0,12	0,91 ± 0,30	0,82 ± 0,23
	72h	1,00 ± 0,22	1,26 ± 0,12	2,99 * ± 0,77	20,0 * ± 3,79	9,15 * ± 1,92	29,6 * ± 3,84	15,3 * ± 4,04	29,2 * ± 4,34	0,55 ± 0,13	1,05 ± 0,39	4,40 * ± 1,12

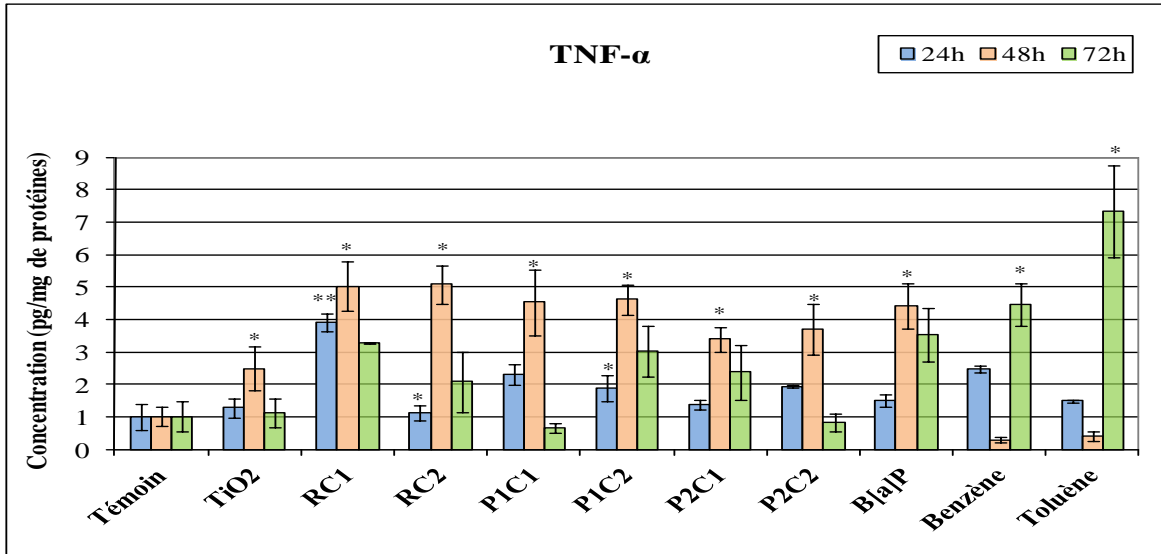


Figure III-17 : Sécrétion protéique du *Tumor Necrosis Factor-alpha* (*TNF-α*; vs témoins) dans les cellules BEAS-2B après 24, 48 ou 72h d'exposition au TiO₂ (C₂ = 12μg/cm²), aux fractions particulières des aérosols des sites rural (R) et urbains [Fann (P₁) et Faidherbe (P₂)] (C₁ = 3μg/cm² et C₂ = 12μg/cm²), au Benzo[a]Pyrène (B[a]P, 1μM), au Benzène (7μM) et au Toluène (7μM). Les résultats sont décrits par les moyennes et les écarts-types de 8 répliquats pour les témoins non exposés et de 4 répliquats pour les cellules exposées (Mann-Whitney U-test; vs témoins; *= p<0,05; **= p<0,01)

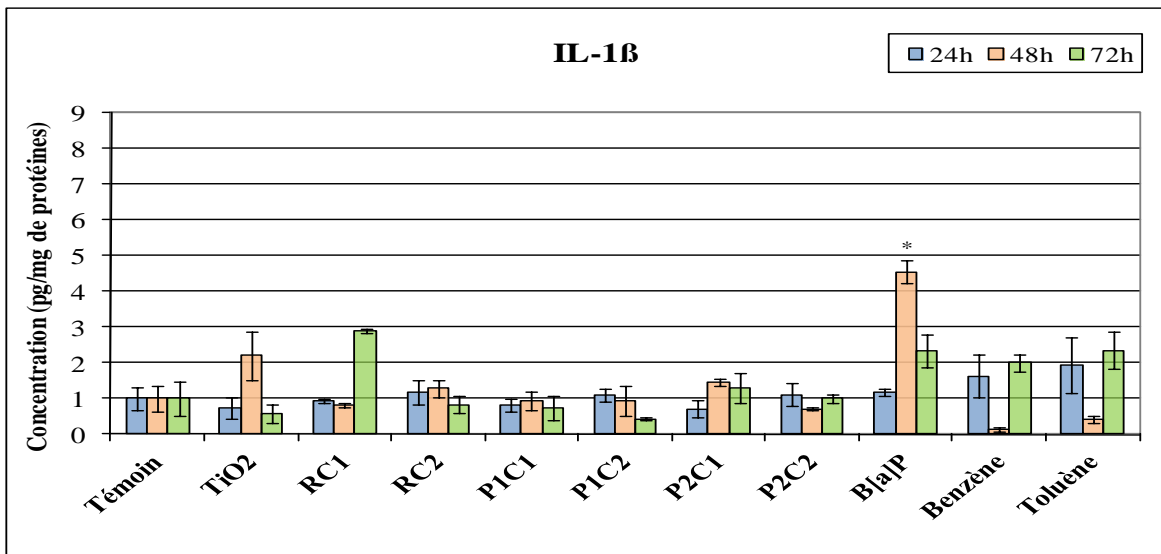


Figure III-18: Sécrétion protéique de l'*Interleukine-1 beta* (*IL-1β*; vs témoins) dans les cellules BEAS-2B après 24, 48 ou 72h d'exposition au TiO₂ (C₂ = 12μg/cm²), aux fractions particulières des aérosols des sites rural (R) et urbains [Fann (P₁) et Faidherbe (P₂)] (C₁ = 3μg/cm² et C₂ = 12μg/cm²), au Benzo[a]Pyrène (B[a]P, 1μM), au Benzène (7μM) et au Toluène (7μM). Les résultats sont décrits par les moyennes et les écarts-types de 8 répliquats pour les témoins non exposés et de 4 répliquats pour les cellules exposées (Mann-Whitney U-test; vs témoins; *= p<0,05)

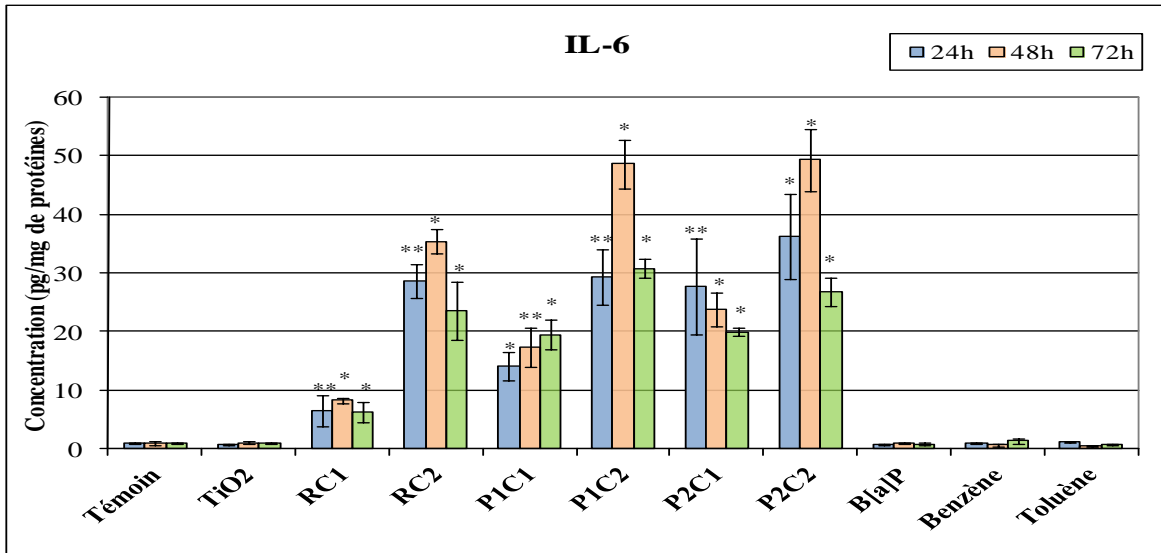


Figure III-19 : Sécrétion protéique de l'*Interleukine-6* (*IL-6*; vs témoins) dans les cellules BEAS-2B après 24, 48 ou 72h d'exposition au TiO_2 ($C_2 = 12\mu\text{g}/\text{cm}^2$), aux fractions particulières des aérosols des sites rural (R) et urbains [Fann (P_1) et Faidherbe (P_2)] ($C_1 = 3\mu\text{g}/\text{cm}^2$ et $C_2 = 12\mu\text{g}/\text{cm}^2$), au Benzo[a]Pyrène (B[a]P, $1\mu\text{M}$), au Benzène ($7\mu\text{M}$) et au Toluène ($7\mu\text{M}$). Les résultats sont décrits par les moyennes et les écarts-types de 8 répliquats pour les témoins non exposés et de 4 répliquats pour les cellules exposées (Mann-Whitney U-test; vs témoins; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$)

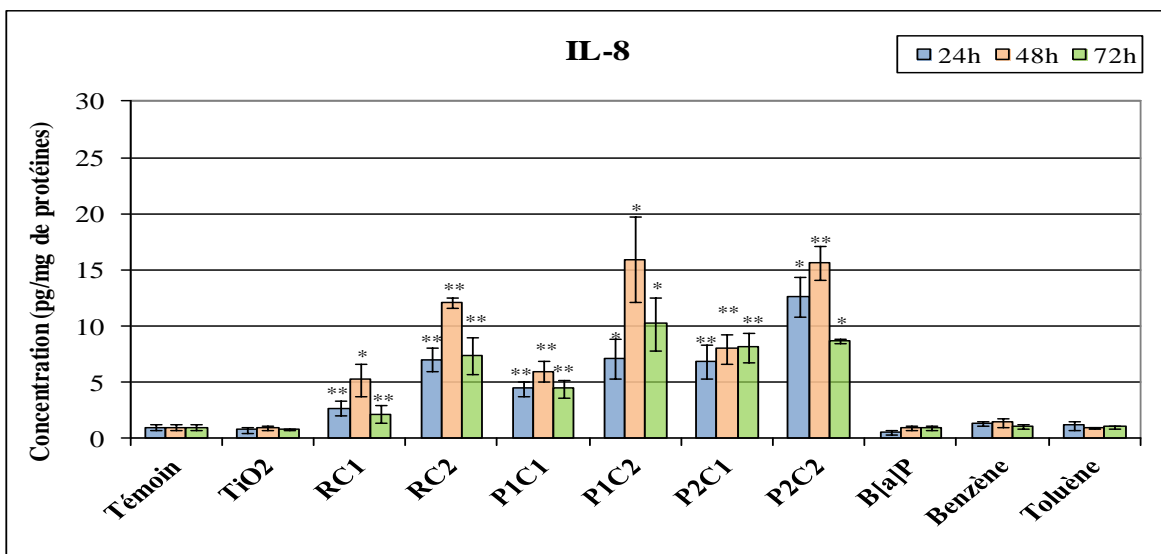


Figure III-20 : Sécrétion protéique de l'*Interleukine-8* (*IL-8*; vs témoins) dans les cellules BEAS-2B après 24, 48 ou 72h d'exposition au TiO_2 ($C_2 = 12\mu\text{g}/\text{cm}^2$), aux fractions particulières des aérosols des sites rural (R) et urbains [Fann (P_1) et Faidherbe (P_2)] ($C_1 = 3\mu\text{g}/\text{cm}^2$ et $C_2 = 12\mu\text{g}/\text{cm}^2$), au Benzo[a]Pyrène (B[a]P, $1\mu\text{M}$), au Benzène ($7\mu\text{M}$) et au Toluène ($7\mu\text{M}$). Les résultats sont décrits par les moyennes et les écarts-types de 8 répliquats pour les témoins non exposés et de 4 répliquats pour les cellules exposées (Mann-Whitney U-test; vs témoins; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$)

II.5. Discussion générale

L'augmentation massive des émissions de polluants particuliers due à la croissance économique et industrielle des derniers siècles dans des pays développés et actuellement dans les pays en voie de développement, a fait de la qualité de l'air une des préoccupations mondiales de santé publique. Le Programme des Nations unies pour l'Environnement a montré que 90% des émissions de polluants en milieu urbain dans les pays en développement, notamment en Afrique Sub-Saharienne (ASS), proviennent du trafic automobile (PNUE, 2011). Dans cette région du monde où la croissance démographique est la plus élevée au monde (United Nations, 2010), les données pertinentes quant à la pollution de l'air sont encore très insuffisantes. Il y a donc un besoin urgent des gouvernements africains, des administrateurs de santé et des scientifiques de mettre en place un cadre de dialogue commun pour que des efforts concertés soient menés afin d'assurer un air propre aux populations. Ce travail s'inscrit dans cette démarche en proposant de rechercher les mécanismes d'action sous-jacents impliqués dans la toxicité pulmonaire de la fraction particulaire d'aérosols d'origine anthropique prélevés à Dakar, capitale du Sénégal.

Les aérosols étudiés ont été collectés sur 3 sites : deux sites urbains de la ville de Dakar, sous influence du trafic automobile dense (Fann ou P₁ et Faidherbe ou P₂) et un site témoin rural (R). Les prélèvements ont été effectués par un impacteur en cascade haut débit. L'analyse granulométrie a montré la performance du système de prélèvement avec en moyenne 96% de PM_{2,5} de taille comprise entre 0,3 et 2,5µm donc des particules susceptibles de pénétrer profondément dans les voies respiratoires. La détermination de leurs caractéristiques chimiques a montré que les échantillons correspondaient à des mélanges complexes et hétérogènes de composés dans lesquels ont été identifiées des influences terrigènes, notamment au travers de la présence de Si, Al, Ti et Fe, des influences marines, au regard des teneurs en Na et ions Cl⁻, des influences anthropiques, avec la présence importante de métaux comme Fe, Cr, Cu, Pb, Zn, d'espèces ioniques issues de la conversion gaz – particules (NO₃⁻, SO₄²⁻) et de composés organiques (COV, Paraffines et HAP).

Il est apparu que chacun des échantillons présentait des spécificités qui les distinguent les un des autres. Les échantillons collectés en milieu urbain (P₁ et P₂) présentent des enrichissements significatifs en Cr, Cu, Pb et Zn. Ce qui se justifie par une contribution anthropique à l'émission de ces éléments notamment par le trafic automobile. La présence de des suies carbonées dans les échantillons confirme cet apport des activités anthropiques. Il a été noté des teneurs totales en métaux plus élevés dans l'échantillon P₂ (9,8 µg/m³) que dans P₁ (7,74 µg/m³). Cette tendance est également observée pour les paraffines et dans une

moindre mesure pour les COV. En revanche les HAP sont plus présents dans P₁ (2,80 ng/m³ pour P₁ contre 2,73 ng/m³ pour P₂). Les activités métalliques présentes à proximité du site P₂ et sa proximité avec le port justifieraient les teneurs plus élevées en métaux, par contre les véhicules de transport en commun majoritairement présents au site P₁ et utilisant le diesel expliqueraient la tendance des teneurs en HAP. L'échantillon collecté en zone rurale, constituant un témoin dans cette étude, renferme une part élevée de particules terrigènes, comme les aluminosilicates.

Nous nous sommes également intéressés à l'impact *in vitro* de nos aérosols sur une lignée cellulaire épithéliale pulmonaire humaine (BEAS-2B). En dépit de la relation aujourd'hui clairement établie par les études épidémiologiques entre l'exposition aux aérosols et l'apparition des pathologies pulmonaires et cardiovasculaires, des incertitudes subsistent encore quant aux mécanismes physiopathologiques responsables de ces maladies. Les études toxicologiques ont joué un rôle important au cours des dernières années dans la compréhension des effets biologiques des particules atmosphériques. Ces études réalisées en condition contrôlée *in vivo* ou *in vitro*, permettent d'établir une relation dose/effet très difficile à mettre en évidence dans les études épidémiologiques. Elles visent également à déterminer des seuils au-dessous desquels les effets biologiques ne s'observent pas. Elles informent sur le rôle des composants spécifiques dans les réponses biologiques et permettent d'étudier les associations de polluants. Enfin, elles sont nécessaires pour comprendre les mécanismes d'action qui sont potentiellement responsables des réponses physiopathologiques chez les individus exposés. Les études toxicologiques présentent des limites, dans la mesure où il n'est pas possible de reconstituer en laboratoire la complexité de l'environnement humain. Cependant elles restent un des maillons essentiels dans l'ensemble des éléments qui doit conduire à l'évaluation des risques.

Dans cette étude, l'évaluation de la cytotoxicité globale des aérosols a été réalisée grâce à des méthodes complémentaires reposant sur l'analyse de trois marqueurs d'effet : l'incorporation de la BrdU, l'activité de la DHm et l'activité de la LDH extracellulaire. Nous pouvons constater que l'incorporation de la BrdU et l'activité de la DHm diminuent significativement dans les cellules BEAS-2B exposées aux PM à partir des concentrations supérieures ou égales à 3 µg/cm² pour les aérosols particuliers urbains [Fann ou P₁ et Faidherbe ou P₂] et à 24 µg/cm² pour les aérosols particuliers ruraux (R), indépendamment du temps d'incubation. Ces résultats montrent la capacité des aérosols à altérer la division cellulaire et le métabolisme mitochondrial. En outre, nous avons montré que seule l'exposition des cellules aux aérosols particuliers urbains a entraîné une augmentation

significative de l'activité de la LDH extracellulaire à partir de $3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, ce qui traduit la perturbation de l'intégrité membranaire. Il est important de noter que des variations ont été observées dans la réponse cytotoxique des cellules en fonction du type d'aérosol et donc de leur source d'émission. En effet la diminution de la BrdU, de la DHm et l'augmentation de la LDH extracellulaire sont plus marquées dans les cellules exposées aux aérosols urbains que dans les cellules exposées aux particules rurales. Des études ont montré que la réponse cytotoxique dépendrait non seulement de la fraction inorganique de l'aérosol mais aussi de la fraction organique adsorbée à la surface des particules (Billet et al., 2007; Fuentes-Mattei et al., 2010). Notons que les aérosols collectés constituent un mélange complexe d'éléments chimiques, présents à des doses variables, comme le montre les résultats de la caractérisation physico-chimique, rendant difficile la quantification de la part de toxicité attribuable aux différentes fractions. Il a été décrit qu'au sein d'un tel mélange de composés il existerait des interactions, notamment de la fraction inorganique et organique, pouvant produire des effets synergiques ou antagonistes (Vakharia et al., 2001; Garçon et al., 2004).

En prenant en considération la composition chimique de nos aérosols particuliers, notamment sa fraction organique, nous nous sommes intéressés à l'activation métabolique par les cellules BEAS-2B des COV et HAP adsorbés, via la détermination de l'expression génique des *CYP 1A1*, *1B1*, *2F1* et de la *NQO1*. Dans ce volet de notre travail les particules de dioxyde de titane (TiO_2) ont été utilisées comme témoin négatif particulaire n'induisant pas significativement les voies de l'activation métabolique et le B[a]P, benzène et toluène comme des témoins organiques activant les voies métaboliques. En effet des études ont montré l'importance du *CYP2F1* dans la métabolisation du Benzène et ses dérivés alkylés (Lewis et al., 2003; Billet et al., 2007). Le B[a]P quant à lui est considéré comme une substance de référence potentiellement toxique, représentative des HAP, métabolisé par les *CYP 1A1* et *1B1*. Des teneurs relativement importantes d'HAP ont été mesurées dans les aérosols urbains ($P_1 = 2,81 \text{ ng}/\text{m}^3$ et $P_2 = 2,73 \text{ ng}/\text{m}^3$) alors que dans l'aérosol rural (R), elles sont en dessous de la limite de quantification. Les résultats de notre étude ont montré la capacité des trois échantillons d'aérosols particuliers à induire une forte expression génique dose-dépendante et/ou dépendante du temps des *CYP1A1*, *1B1*. Nous n'avons pas observé une induction significative de l'expression de ces deux enzymes dans les cellules exposées aux témoins organiques, sauf pour le B[a]P après 24h d'incubation. Le rôle de vecteur physique des particules atmosphériques permet d'accroître à la fois la pénétration et la rétention de ces composés organiques dans les cellules pulmonaires et pouvant favoriser leur activation métabolique (Billet et al., 2007). Une expression significative de la *NQO1* a été observée dans

les cellules exposées aux particules P₁ à la faible concentration après 48h et aux particules P₂ à la concentration maximale 24 et 48h après l'exposition. L'expression des ARNm de ces enzymes est plus importante dans les cellules exposées aux particules urbaines (P₁ et P₂), présentant des teneurs plus élevées en composés organiques, que dans celles exposées aux particules rurales (R). Ces résultats corroborent ceux des études réalisées par d'autres auteurs (Saint-Georges et al., 2008; Abbas et al., 2009; Totlandsdal et al., 2010). Par ailleurs l'expression de ces enzymes dans l'aérosol rural où ces composés n'ont pas été détectés, pourrait se justifier par la présence d'autres composés dérivés des HAP (dioxines, furanes, PCB...). Ces derniers, qui pourraient provenir de la combustion de la biomasse à proximité de ce site, n'ont pas fait l'objet de notre recherche et sont de puissants agonistes du récepteur AhR, induisant ainsi le *CYP1A1* (Billet et al., 2008; Andryśík et al., 2011). De façon surprenante, nous n'avons pas observé l'induction de l'expression génique du *CYP2F1* malgré la présence de COV adsorbés à la surface de nos particules (R = 24,1 ng/m³, P₁ = 37,4 ng/m³ et P₂ = 43,3 ng/m³). Les mêmes observations ont été faites lors de études antérieures réalisées dans notre laboratoire sur cultures primaires de macrophages alvéolaires humains (Saint-Georges et al., 2008). Des éléments de réponse peuvent toutefois être apportés à ce résultat notamment par la faible biodisponibilité de ces composés, facilement volatils d'une part, mais aussi par le fait que les BEAS-2B n'expriment pas bien cette enzyme d'autre part.

Nous nous sommes intéressés à l'hypothèse du stress oxydant initié par la production excessive d'Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) qui affecte les cellules exposées. Les cellules de l'épithélium pulmonaire, de par leur position dans l'appareil respiratoire, sont vulnérables aux ERO tant exogènes mais aussi endogènes. Le stress oxydant peut donc jouer un rôle central dans l'apparition de pathologies respiratoires (Oh et al., 2011; Rossner Jr. et al., 2011). La composition chimique des particules collectées notamment en métaux de transition (e.g. Fe, Cu, Zn) et en composés organiques montre qu'elles sont susceptibles d'entraîner une production d'ERO. Il a été décrit que les particules atmosphériques étaient capables d'induire le stress oxydant directement via les métaux de transition ou indirectement via l'inflammation résultant de l'inhalation des PM, mais aussi par la formation de quinones réactives issues du métabolisme des HAP (Garçon et al., 2006; Øvrevik et al., 2010; Oh et al., 2011). Des teneurs élevées d'ERO peuvent entraîner une modification du statut redox par une production de réactions en cascades pouvant conduire à l'apoptose (Dagher et al., 2007; Totlandsdal et al., 2010). Les résultats de notre étude ont montré que, contrairement à l'étude réalisée par Kouassi et ses collaborateurs (2010), dans le cas d'une exposition à court-terme des cellules A549, aucune augmentation significative de la peroxydation lipidique (via le

MDA) n'a été observée, exception faite des cellules exposées aux particules P₁ à la concentration maximale. De même, les résultats du statut du glutathion suivent la même tendance. On pourrait donc penser à l'action des systèmes antioxydants dans la limitation des dommages oxydatifs observables. En effet, l'exposition des organismes aérobies aux espèces pro-oxydantes peut entraîner une activation de systèmes efficaces de défense antioxydants enzymatiques et non-enzymatiques dans les cellules (Sun et al., 2008; Lonkar and Dedon, 2011; Ziech et al., 2011). L'absence d'augmentation significative de MDA pourrait s'expliquer aussi par le fait que cette voie de peroxydation lipidique catalysée par la cyclo-oxygénase n'est pas favorisée. En effet si la voie catalysée par la lipoxigénase est favorisée, celle-ci va aboutir aux leucotriènes, ces derniers vont induire l'expression des cytokines inflammatoires.

Dans cette étude nous avons également montré la relation dose-dépendante et/ou dépendante du temps de l'expression génique IL-1 β , IL-6 et IL-8 et de la sécrétion de médiateurs inflammatoires (TNF- α , IL-6 et IL-8) dans les cellules BEAS-2B exposées aux trois aérosols particuliers après 24, 48 et 72h d'incubation. L'absence de TNF- α dans l'expression génique peut s'expliquer par le fait qu'il existe un délai entre l'expression et la sécrétion protéique. TNF- α est la première cytokine exprimée et son expression est généralement observée dans les six premières heures. Il a été montré que de nombreux gènes de cytokines et chimiokines impliquées dans la réponse inflammatoire sont régulés par le facteur de transcription NF- κ B. Des études ont montré que les particules diesels et les PM_{2,5} pouvaient activer le NF- κ B dans les cellules épithéliales bronchiques pulmonaires humaines *in vitro* et la présence de composés organiques contribuait fortement à cette réponse (Takizawa et al., 1999; Shukla et al., 2000; Dagher et al., 2007). Par ailleurs, l'activation de NF- κ B par les particules diesel est inhibée en présence d'antioxydants mettant ainsi en évidence une étape sensible aux ERO dans l'activation de ce facteur de transcription (Bonvallot et al., 2001). Les études récentes ont montré l'implication de certains métaux (e.g. Fe, Al, Pb, Mn, Zn), et l'activation métabolique des HAP adsorbés à la surface des aérosols, dans l'initiation des réactions radicalaires (Garçon et al., 2006; Baulig et al., 2009; Øvrevik et al., 2010). En accord avec les résultats de la caractérisation physico-chimique des trois échantillons d'aérosols particuliers, on observe une expression génique et/ou une sécrétion protéique plus importante dans les cellules exposées aux particules urbaines (P₁ et P₂), en particulier pour les cytokines IL-6 et IL-8. Nous avons observé dans nos résultats que la sécrétion protéique de IL-6 est plus importante que celle de IL-1 β , TNF- α et dans une

moindre mesure de IL-8. Ce qui pourrait se justifier par l'action positive exercée par IL-1 β et TNF- α sur IL-6 qui en retour inhibe leur expression (Revillard, 1994).

Il faut cependant noter que les preuves apportées par les différentes études sur ces réactions cellulaires restent insuffisantes, quant à la part attribuable aux différentes substances chimiques composant les particules. Le consensus entre les différents acteurs scientifiques est loin d'être établi sur les composants les plus déterminants dans les réactions inflammatoires. Néanmoins, nous avons pu montrer la capacité de nos trois aérosols particuliers à induire un processus inflammatoire via la sécrétion des cytokines inflammatoire TNF- α , IL-1 β , IL-6 et IL-8.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Notre projet de recherche avait pour objectif d'étudier la toxicité pulmonaire de la fraction particulaire de trois aérosols atmosphériques, collectés sur deux sites en milieu urbain à Dakar au Sénégal (Fann ou P₁ et Faidherbe ou P₂) et sur un site rural (R).

Ce travail de recherche en toxicologie *in vitro*, l'un des premiers menés au Sénégal, a consisté à réaliser dans un premier temps une caractérisation physico-chimique de ces aérosols, notamment par la détermination de la granulométrie des aérosols, de leur surface spécifique, de leur composition en éléments inorganiques (métaux et ions) et en composés organiques adsorbés à la surface des particules (COV, Paraffines et HAP). *Ce volet nous a permis de montrer que nos aérosols étaient constitués majoritairement de particules fines (96 % de PM_{2,5}), et présentaient un ensemble hétérogène de composés inorganiques et organiques, avec des teneurs plus élevées dans les particules urbaines que dans les particules d'origine rurale évoquant ainsi une contribution anthropique.*

Dans un second temps l'étude de toxicité des aérosols a été abordée par l'évaluation la cytotoxicité globale grâce à trois méthodes complémentaires (incorporation de la BrdU, activité de la DHm, activité de la LDH extracellulaire) sur un modèle de cellules épithéliales pulmonaires humaines (BEAS-2B). *Nous avons ainsi montré la capacité de nos aérosols particulaires à provoquer une altération de la division et du métabolisme cellulaire ainsi que des perturbations de la perméabilité membranaire.*

Au regard des teneurs importantes en composés organiques adsorbés à la surface des particules, nous avons déterminé l'implication de cette fraction dans la toxicité par l'étude de leur activation en métabolites plus réactifs. *La forte expression génique des CYP1A1, 1B1 et dans une moindre mesure de la NQO1 montre la capacité de nos aérosols à induire d'une part une activation des HAP mais aussi d'induire un processus de détoxification. L'activation des COV n'a pu être mise en évidence par en raison de l'absence d'expression du CYP2F1 dans les cellules BEAS-2B.*

Nous n'avons en revanche pas montré de capacité de nos aérosols à induire un stress oxydant lors de l'étude de la peroxydation lipidique (MDA) et du statut du glutathion (GSSG/GSH), en revanche nous avons observé un processus de réponse inflammatoire marqué par l'expression et la sécrétion des cytokines TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8.

Conclusion et perspectives

Par ailleurs nous avons observé des différences dans la réponse cellulaire à l'exposition aux aérosols avec des effets plus marqués dans les cellules exposées aux aérosols particuliers urbains (P₁ et P₂) qui présentent des caractéristiques chimiques plus importantes.

Afin de compléter ce travail quant au rôle spécifique de l'activation de la fraction organique adsorbée à la surface des particules dans la toxicité de nos aérosols, il serait important de rechercher certains métabolites issus de la biotransformation de certains COV et HAP par les enzymes du métabolisme des xénobiotiques.

La capacité de nos aérosols à induire un stress oxydant et une réponse inflammatoire pourrait être approfondie par la détermination de l'activation du facteur de transcription NF- κ B, connu pour son implication dans la régulation de ces deux mécanismes.

Il faudrait aussi rechercher l'activation des enzymes impliquées dans les mécanismes de défense antioxydants

Il serait nécessaire de poursuivre les investigations dans l'évaluation du potentiel génotoxique des aérosols en appliquant plusieurs tests complémentaires (tests d'Ames, test des comètes, etc...). Ce volet du travail pourrait être complété par la recherche de mécanismes qui interviennent dans la régulation transcriptionnelle notamment via l'étude des modifications épigénétiques telles que l'acétylation et la méthylation des histones.

Pour réaliser cette étude une campagne de prélèvement a été mise en place de juillet à octobre 2009, période correspondante à la saison pluvieuse au Sénégal. Il serait envisageable d'étendre ces prélèvements sur toute l'année afin de prendre en considération les variations saisonnières sur la composition physico-chimique des particules et par conséquent sur leurs effets toxiques.

Nous estimons en fin que ce travail pionnier, pourrait contribuer à la mise en place d'une base de données sur la pollution atmosphérique et constituera une étape importante pour l'amélioration de la qualité de l'air en Afrique Sub-Saharienne en générale et au Sénégal en particulier.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbas, I., Saint-Georges, F., Billet, S., Verdin, A., Mulliez, P., Shirali, P., Garçon, G., 2009. Air pollution particulate matter (PM_{2.5})-induced gene expression of volatile organic compound and/or polycyclic aromatic hydrocarbon-metabolizing enzymes in an in vitro coculture lung model. *Toxicol. in Vitro* 23, 37-46.
- Akerman, M.E., Chan, W.C.W., Laakkonen, P., Bhatia, S.N., Ruoslahti, E., 2002. Nanocrystal targeting in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 99, 12617-12621.
- Alfaro-Moreno, E., Torres, V., Miranda, J., Martínez, L., García-Cuellar, C., Nawrot, T.S., Vanaudenaerde, B., Hoet, P., Ramírez-López, P., Rosas, I., Nemery, B., Osornio-Vargas, A.R., 2009. Induction of IL-6 and inhibition of IL-8 secretion in the human airway cell line Calu-3 by urban particulate matter collected with a modified method of PM sampling. *Environ. Res* 109, 528-535.
- Amann C.A. et Sieglä D.C., 1982. Diesel particulates-what they are and why. *Aerosol Sci.Technol.*, 1 : 73-101
- Andreae, M.O., Charlson, R.J., Bruynseels,, F., Storms, H., Van Grieken, R., Maenhaut, W., 1986. Internal mixture of sea salt, silicates, excess sulfate in marine aerosols. *Deep Sea Research Part B. Oceanographic Literature Review* 33, 1002.
- Andreeva, A.V., Kutuzov, M.A., Voyno-Yasenetskaya, T.A., 2007. Regulation of surfactant secretion in alveolar type II cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol* 293, L259-271.
- Andrysík, Z., Vondráček, J., Marvanová, S., Ciganek, M., Neca, J., Pencíková, K., Mahadevan, B., Topinka, J., Baird, W.M., Kozubík, A., Machala, M., 2011. Activation of the aryl hydrocarbon receptor is the major toxic mode of action of an organic extract of a reference urban dust particulate matter mixture: The role of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* In Press, Uncorrected Proof.
- APEG. (1999) Source apportionment of airborne particulate matter in the United Kingdom (ed. R. M. Harrison et al .). The First Report of the Airborne Particles Expert Group, Department of Environment, Transport and the Regions, London.
- Araujo, J.A., 2010. Particulate air pollution, systemic oxidative stress, inflammation, and atherosclerosis. *Air Qual Atmos Health* 4, 79-93.
- Araujo, J.A., Nel, A.E., 2009. Particulate matter and atherosclerosis: role of particle size, composition and oxidative stress. *Part Fibre Toxicol* 6, 24.
- Aristizábal, B.H., Gonzalez, C.M., Morales, L., Abalos, M., Abad, E., 2011. Polychlorinated dibenzo-p-dioxin and dibenzofuran in urban air of an Andean city. *Chemosphere* 85, 170-178.
- Atkinson, R., Arey, J., 1994. Atmospheric chemistry of gas-phase polycyclic aromatic hydrocarbons: formation of atmospheric mutagens. *Environ. Health Perspect* 102 Suppl 4, 117-126.

Bibliographie

Attoh, K., Morgan, J., 2004. Geochemistry of high-pressure granulites from the Pan-African Dahomeyide orogen, West Africa: constraints on the origin and composition of the lower crust. *Journal of African Earth Sciences* 39, 201-208.

Aymoz, G., 2005. Etude de la fraction carbonée de l'aérosol atmosphérique à Chamonix et St Jean de Maurienne : évolutions saisonnières, sources et caractéristiques chimiques. 290 p. Sciences de la Terre et de l'Univers. Grenoble.

Baer-Dubowska, W., 1999. Alternative pathways of polycyclic aromatic hydrocarbons activation: the formation of polar DNA adducts. *Acta Biochim. Pol* 46, 263-274.

Baeza, A., Marano, F., 2007. [Air pollution and respiratory diseases: a central role for oxidative stress]. *Med. Sci (Paris)* 23, 497-501.

Baeza-Squiban, A., Bonvallot, V., Boland, S., Marano, F., 1999. Diesel Exhaust Particles Increase NF-kappaB DNA Binding Activity and c-FOS Proto-oncogene Expression in Human Bronchial Epithelial Cells. *Toxicol In Vitro* 13, 817-822.

Bai, Y., Suzuki, A.K., Sagai, M., 2001. The cytotoxic effects of diesel exhaust particles on human pulmonary artery endothelial cells in vitro: role of active oxygen species. *Free Radic. Biol. Med* 30, 555-562.

Banque Mondiale., 2003. Banque Mondiale:Initiative sur la qualité de l'air des villes d'Afrique sub-saharienne, Rapport d'avancement 1998-2002. Document de travail N°11

Barlow, P.G., Brown, D.M., Donaldson, K., MacCallum, J., Stone, V., 2008. Reduced alveolar macrophage migration induced by acute ambient particle (PM₁₀) exposure. *Cell Biol. Toxicol* 24, 243-252.

Bauer, A.K., Faiola, B., Abernethy, D.J., Marchan, R., Pluta, L.J., Wong, V.A., Roberts, K., Jaiswal, A.K., Gonzalez, F.J., Butterworth, B.E., Borghoff, S., Parkinson, H., Everitt, J., Recio, L., 2003. Genetic susceptibility to benzene-induced toxicity: role of NADPH: quinone oxidoreductase-1. *Cancer Res* 63, 929-935.

Bauer, A.K., Faiola, B., Abernethy, D.J., Marchan, R., Pluta, L.J., Wong, V.A., Gonzalez, F.J., Butterworth, B.E., Borghoff, S.J., Everitt, J.I., Recio, L., 2003. Male mice deficient in microsomal epoxide hydrolase are not susceptible to benzene-induced toxicity. *Toxicol. Sci* 72, 201-209.

Baulig A., 2004a. Rôle des particules fines PM_{2,5} dans l'induction des pathologies respiratoires d'origine inflammatoire. Comparaison avec les particules de Diesel.

Baulig A., 2004b. Rôle des particules fines PM_{2,5} dans l'induction des pathologies
United Nations, Department of Economic and Social Affairs, 2010. World Urbanization Prospects: The 2009 Revision. United Nations, New York.

Baulig, A., Poirault, J.-J., Ausset, P., Schins, R., Shi, T., Baralle, D., Dorlhene, P., Meyer, M., Lefevre, R., Baeza-Squiban, A., Marano, F., 2004. Physicochemical characteristics and biological activities of seasonal atmospheric particulate matter sampling in two locations of Paris. *Environ. Sci. Technol* 38, 5985-5992.

Bibliographie

- Baulig, A., Singh, S., Marchand, A., Schins, R., Barouki, R., Garlatti, M., Marano, F., Baeza-Squiban, A., 2009. Role of Paris PM_{2.5} components in the pro-inflammatory response induced in airway epithelial cells. *Toxicology* 261, 126-135.
- Beauford, W., Barber, J., Barringer, A.R., 1977. Release of particles containing metals from vegetation into the atmosphere. *Science* 195, 571-573.
- 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. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 203, 45-52.
- Bernauer, U., Heinrich-Hirsch, B., Tönnies, M., Peter-Matthias, W., Gundert-Remy, U., 2006. Characterisation of the xenobiotic-metabolizing Cytochrome P450 expression pattern in human lung tissue by immunochemical and activity determination. *Toxicol. Lett* 164, 278-288.
- Bevilacqua, M.P., Nelson, R.M., Mannori, G., Cecconi, O., 1994. Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease. *Annu. Rev. Med* 45, 361-378.
- Billet, S., Garçon, G., Dagher, Z., Verdin, A., Ledoux, F., Cazier, F., Courcot, D., Aboukais, A., Shirali, P., 2007. Ambient particulate matter (PM_{2.5}): Physicochemical characterization and metabolic activation of the organic fraction in human lung epithelial cells (A549). *Environ. Res* 105, 212-223.
- Billet, S., Abbas, I., Le Goff, J., Verdin, A., Andre, V., Lafargue, P.E., Hachimi, A., Cazier, F., Sichel, F., Shirali, P., Garçon, G. (2008). Genotoxic potential of polycyclic aromatic hydrocarbons-coated onto airborne particulate matter (PM_{2.5}) in human lung epithelial A549 cells. *Cancer Lett.* 270, 144-155.
- Bliefert C., De Boeck R. P., 2008. *Chimie de l'environnement: Air, eau, sols*, 2^{ième} édition française déchets, 496 p.
- Bolton, J.L., Trush, M.A., Penning, T.M., Dryhurst, G., Monks, T.J., 2000. Role of quinones in toxicology. *Chem. Res. Toxicol* 13, 135-160.
- Bondarenko, I., Treiger, B., Van Grieken, R., Van Espen, P., 1996. IDAS: a Windows based software package for cluster analysis. *Spectrochim. Acta, Part B* 51, 441-456.
- Bonvallet, V., Baeza-Squiban, A., Baulig, A., Brulant, S., Boland, S., Muzeau, F., Barouki, R., Marano, F., 2001a. Organic compounds from diesel exhaust particles elicit a proinflammatory response in human airway epithelial cells and induce cytochrome p450 1A1 expression. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol* 25, 515-521.
- Bonvallet, V., Baeza-Squiban, A., Baulig, A., Brulant, S., Boland, S., Muzeau, F., Barouki, R., Marano, F., 2001b. Organic compounds from diesel exhaust particles elicit a proinflammatory response in human airway epithelial cells and induce cytochrome p450 1A1 expression. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol* 25, 515-521.
- Borm, P.J.A., Kelly, F., Künzli, N., Schins, R.P.F., Donaldson, K., 2007. Oxidant generation by particulate matter: from biologically effective dose to a promising, novel metric. *Occup Environ. Med* 64, 73-74.

Bibliographie

- Broeckaert, F., Bernard, A., 2000. Clara cell secretory protein (CC16): characteristics and perspectives as lung peripheral biomarker. *Clin. Exp. Allergy* 30, 469-475.
- Bowman FM., Odum JR., Seinfeld JH. et Pandis SN., 1997. Mathematical model for gas-particle partitioning of secondary organic aerosols. *Atmos. Environ* 31 (23) : 3921-3931.
- Brook, R.D., Franklin, B., Cascio, W., Hong, Y., Howard, G., Lipsett, M., Luepker, R., Mittleman, M., Samet, J., Smith, S.C., Jr, Tager, I., 2004. Air pollution and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association. *Circulation* 109, 2655-2671.
- Brown, D.M., Donaldson, K., Borm, P.J., Schins, R.P., Dehnhardt, M., Gilmour, P., Jimenez, L.A., Stone, V., 2004. Calcium and ROS-mediated activation of transcription factors and TNF-alpha cytokine gene expression in macrophages exposed to ultrafine particles. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol* 286, L344-353.
- Brown, D.M., Donaldson, K., Stone, V., 2004. Effects of PM₁₀ in human peripheral blood monocytes and J774 macrophages. *Respir. Res* 5, 29.
- Brown, D.M., Wilson, M.R., MacNee, W., Stone, V., Donaldson, K., 2001. Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 175, 191-199.
- Brown, J.S., Zeman, K.L., Bennett, W.D., 2002. Ultrafine particle deposition and clearance in the healthy and obstructed lung. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 166, 1240-1247.
- Brunekreef, B., Holgate, S.T., 2002. Air pollution and health. *The Lancet* 360, 1233-1242.
- Burgess, A.W., Metcalf, D., 1980. The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *Blood* 56, 947-958.
- Buschini, A., Cassoni, F., Anceschi, E., Pasini, L., Poli, P., Rossi, C., 2001. Urban airborne particulate: genotoxicity evaluation of different size fractions by mutagenesis tests on microorganisms and comet assay. *Chemosphere* 44, 1723-1736.
- Cachier H., Buat-Menard P., Fontugne M. et Rancher J., 1985. Source terms and source strengths of the carbonaceous aerosol in the tropics. *J. Atmos. Chem* 3 (4) : 469-489.
- Calderón-Garcidueñas, L., Azzarelli, B., Acuna, H., Garcia, R., Gambling, T.M., Osnaya, N., Monroy, S., DEL Tizapantzi, M.R., Carson, J.L., Villarreal-Calderon, A., Rewcastle, B., 2002. Air pollution and brain damage. *Toxicol. Pathol* 30, 373-389.
- Camara, B., Absa, L., Faye, P.M., Ndior Cabral, M., Fall, M., Toure, A., Ndiaye, M., Sene Mbaye, M., Diouf, A., 2010. P165 - Récupération du plomb de batteries et saturnisme à Dakar, Sénégal. *Archives de Pédiatrie* 17, 91.
- Castell, J.V., Donato, M.T., Gómez-Lechón, M.J., 2005. Metabolism and bioactivation of toxicants in the lung. The in vitro cellular approach. *Exp. Toxicol. Pathol* 57 Suppl 1, 189-204.

Bibliographie

- Cazier, F., Dewaele, D., Delbende, A., Nouali, H., Garçon, G., Verdin, A., Courcot, D., Bouhsina, S., Shirali, P., 2011. Sampling analysis and characterization of particles in the atmosphere of rural, urban and industrial areas. *Procedia Environmental Sciences* 4, 218-227.
- Chalupa, D.C., Morrow, P.E., Oberdörster, G., Utell, M.J., Frampton, M.W., 2004. Ultrafine particle deposition in subjects with asthma. *Environ. Health Perspect* 112, 879-882.
- Chang, H., Chang, L.W., Cheng, Y.-H., Tsai, W.-T., Tsai, M.-X., Lin, P., 2006. Preferential induction of CYP1A1 and CYP1B1 in CCSP-positive cells. *Toxicol. Sci* 89, 205-213.
- Chen, Q., Carroll, H.P., Gadina, M., 2006. The newest interleukins: recent additions to the ever-growing cytokine family. *Vitam. Horm* 74, 207-228.
- Cheng, Y., Lee, S.C., Ho, K.F., Chow, J.C., Watson, J.G., Louie, P.K.K., Cao, J.J., Hai, X., 2010. Chemically-speciated on-road PM_{2.5} motor vehicle emission factors in Hong Kong. *Sci. Total Environ* 408, 1621-1627.
- Cho, H.-Y., Reddy, S.P., Kleeberger, S.R., 2006. Nrf2 defends the lung from oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal* 8, 76-87.
- Churg, A., Brauer, M., 2000. Ambient atmospheric particles in the airways of human lungs. *Ultrastruct Pathol* 24, 353-361.
- Churg, A., Brauer, M., del Carmen Avila-Casado, M., Fortoul, T.I., Wright, J.L., 2003. Chronic exposure to high levels of particulate air pollution and small airway remodeling. *Environ. Health Perspect* 111, 714-718.
- Claus Bliefert., 2008. *Chimie de l'environnement (Air, eau, sol, déchets)*, 2^e édition française 13, 223-225.
- Cohen, A.J., Ross Anderson, H., Ostro, B., Pandey, K.D., Krzyzanowski, M., Künzli, N., Gutschmidt, K., Pope, A., Romieu, I., Samet, J.M., Smith, K., 2005. The global burden of disease due to outdoor air pollution. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* 68, 1301-1307.
- Crawford, E.L., Weaver, D.A., DeMuth, J.P., Jackson, C.M., Khuder, S.A., Frampton, M.W., Utell, M.J., Thilly, W.G., Willey, J.C., 1998. Measurement of cytochrome P450 2A6 and 2E1 gene expression in primary human bronchial epithelial cells. *Carcinogenesis* 19, 1867-1871.
- Dagher, Z., Garçon, G., Billet, S., Verdin, A., Ledoux, F., Courcot, D., Aboukais, A., Shirali, P., 2007. Role of nuclear factor-kappa B activation in the adverse effects induced by air pollution particulate matter (PM_{2.5}) in human epithelial lung cells (L132) in culture. *J. Appl. Toxicol* 27, 284-290.
- Dagher, Z., Garçon, G., Billet, S., Gosset, P., Ledoux, F., Courcot, D., Aboukais, A., Shirali, P., 2006. Activation of different pathways of apoptosis by air pollution particulate matter (PM_{2.5}) in human epithelial lung cells (L132) in culture. *Toxicology* 225, 12-24.
- Darwish, W., Ikenaka, Y., Eldaly, E., Ishizuka, M., 2010. Mutagenic activation and detoxification of benzo[a]pyrene in vitro by hepatic cytochrome P450 1A1 and phase II enzymes in three meat-producing animals. *Food Chem. Toxicol* 48, 2526-2531.

Bibliographie

Decker, T., Stockinger, S., Karaghiosoff, M., Müller, M., Kovarik, P., 2002. IFNs and STATs in innate immunity to microorganisms. *J. Clin. Invest* 109, 1271-1277.

de Kok, T.M.C.M., Drieste, H.A.L., Hogervorst, J.G.F., Briedé, J.J., 2006. Toxicological assessment of ambient and traffic-related particulate matter: A review of recent studies. *Mutat. Res., Rev. Mutat. Res* 613, 103-122.

de Zwart, L.L., Meerman, J.H., Commandeur, J.N., Vermeulen, N.P., 1999. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radic. Biol. Med* 26, 202-226.

Department of Health., 1995. Committee on the medical effects of air pollution. Non-biological particles and health.

Denison, M.S., Whitlock, J.P., Jr, 1995. Xenobiotic-inducible transcription of cytochrome P450 genes. *J. Biol. Chem* 270, 18175-18178.

Dinarello, C.A., 2002. The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin. Exp. Rheumatol* 20, S1-13.

Ding, X., Kaminsky, L.S., 2003. Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* 43, 149-173.

Diouf, A., Garçon, G., Thiaw, C., Diop, Y., Fall, M., Ndiaye, B., Siby, T., Hannotiaux, M.H., Zerimech, F., Ba, D., Haguenoer, J.M., Shirali, P., 2003. Environmental lead exposure and its relationship to traffic density among Senegalese children: a pilot study. *Hum Exp Toxicol* 22, 559-564.

Diouf, A., Garçon, G., Diop, Y., Ndiaye, B., Thiaw, C., Fall, M., Kane-Barry, O., Ba, D., Haguenoer, J.M., Shirali, P., 2006. Environmental lead exposure and its relationship to traffic density among Senegalese children: A cross-sectional study. *Hum Exp Toxicol* 25, 637-644.

DEEC: Direction de l'Environnement et des Etablissements Classés (www.denv.gouv.sn, consulté en décembre 2010).

Dockery, D.W., Pope, C.A., 3rd, Xu, X., Spengler, J.D., Ware, J.H., Fay, M.E., Ferris, B.G., Jr, Speizer, F.E., 1993. An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. *N. Engl. J. Med* 329, 1753-1759.

Dominici, F., McDermott, A., Daniels, M., Zeger, S.L., Samet, J.M., 2005. Revised analyses of the National Morbidity, Mortality, and Air Pollution Study: mortality among residents of 90 cities. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* 68, 1071-1092.

Donaldson, K., Li, X.Y., MacNee, W., 1998. Ultrafine (nanometre) particle mediated lung injury. *J. Aerosol Sci* 29, 553-560.

Bibliographie

- Dye, J.A., Lehmann, J.R., McGee, J.K., Winsett, D.W., Ledbetter, A.D., Everitt, J.I., Ghio, A.J., Costa, D.L., 2001. Acute pulmonary toxicity of particulate matter filter extracts in rats: coherence with epidemiologic studies in Utah Valley residents. *Environ. Health Perspect* 109 Suppl 3, 395-403.
- Eaton, D.L., Bammler, T.K., 1999. Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicol. Sci* 49, 156-164.
- Ebert, M., Weinbruch, S., Hoffmann, P., Ortner, H.M., 2000. CHEMICAL CHARACTERIZATION OF NORTH SEA AEROSOL PARTICLES. *J. Aerosol Sci.* 31, 613-632.
- Elder, A., Oberdörster, G., 2006. Translocation and effects of ultrafine particles outside of the lung. *Clin. Occup. Environ. Med* 5, 785-796.
- Eltayeb, M.A.H., Injuk, J., Maenhaut, W., Van Grieken, R.E., 2001. Elemental composition of mineral aerosol generated from Sudan Sahara sand. *J. Atmos. Chem.* 40, 247-273.
- Favier A., 2003. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *l'actualité chimique*, 108-115.
- Finlayson-Pitts, B.J., Pitts, J.N., Jr, 1997. Tropospheric air pollution: ozone, airborne toxics, polycyclic aromatic hydrocarbons, and particles. *Science* 276, 1045-1052.
- Finlayson-Pitts, B.J., Pitts, J., 2000. Analytical Methods and Typical Atmospheric Concentrations for Gases and Particles, in: *Chemistry of the Upper and Lower Atmosphere*. Academic Press, San Diego, pp. 547-656.
- Forman, H.J., Fukuto, J.M., Miller, T., Zhang, H., Rinna, A., Levy, S., 2008. The chemistry of cell signaling by reactive oxygen and nitrogen species and 4-hydroxynonenal. *Arch. Biochem. Biophys* 477, 183-195.
- Forman, H.J., Torres, M., 2002. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 166, S4-8.
- Foster, J.R., 2001. The functions of cytokines and their uses in toxicology. *Int. J. Exp. Pathol* 82, 171-192.
- Fourn, L., Fayomi, E.B., 2006. [Air pollution in urban area in Cotonou and Lokossa, Benin]. *Bull. Soc. Pathol. Exot* 99, 264-268.
- Frampton, M.W., Ghio, A.J., Samet, J.M., Carson, J.L., Carter, J.D., Devlin, R.B., 1999. Effects of aqueous extracts of PM(10) filters from the Utah valley on human airway epithelial cells. *Am. J. Physiol* 277, L960-967.
- Fuentes-Mattei, E., Rivera, E., Gioda, A., Sanchez-Rivera, D., Roman-Velazquez, F.R., Jimenez-Velez, B.D., 2010. Use of human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) to study immunological markers resulting from exposure to PM2.5 organic extract from Puerto Rico. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 243, 381-389.

Bibliographie

- Garçon, G., Dagher, Z., Zerimech, F., Ledoux, F., Courcot, D., Aboukais, A., Puskaric, E., Shirali, P., 2006. Dunkerque City air pollution particulate matter-induced cytotoxicity, oxidative stress and inflammation in human epithelial lung cells (L132) in culture. *Toxicol. in Vitro* 20, 519-528.
- Garçon, G., Gosset, P., Zerimech, F., Grave-Descampiaux, B., Shirali, P., 2004. Effect of Fe₂O₃ on the capacity of benzo(a)pyrene to induce polycyclic aromatic hydrocarbon-metabolizing enzymes in the respiratory tract of Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Lett* 150, 179-189.
- Garçon, G., Zerimech, F., Hannotiaux, M.-H., Gosset, P., Martin, A., Marez, T., Shirali, P., 2001. Antioxidant defense disruption by polycyclic aromatic hydrocarbons-coated onto Fe₂O₃ particles in human lung cells (A549). *Toxicology* 166, 129-137.
- Ghio, A.J., Devlin, R.B., 2001. Inflammatory lung injury after bronchial instillation of air pollution particles. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 164, 704-708.
- Ghio, A.J., 2004. Biological effects of Utah Valley ambient air particles in humans: a review. *J. Aerosol Med* 17, 157-164.
- Ghio, A.J., Hall, A., Bassett, M.A., Cascio, W.E., Devlin, R.B., 2003. Exposure to concentrated ambient air particles alters hematologic indices in humans. *Inhal. Toxicol* 15, 1465-1478.
- Gilmour, P.S., Ziesenis, A., Morrison, E.R., Vickers, M.A., Drost, E.M., Ford, I., Karg, E., Mossa, C., Schroepel, A., Ferron, G.A., Heyder, J., Greaves, M., MacNee, W., Donaldson, K., 2004. Pulmonary and systemic effects of short-term inhalation exposure to ultrafine carbon black particles. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 195, 35-44.
- Gold, D.R., Litonjua, A., Schwartz, J., Lovett, E., Larson, A., Nearing, B., Allen, G., Verrier, M., Cherry, R., Verrier, R., 2000. Ambient pollution and heart rate variability. *Circulation* 101, 1267-1273.
- Goulaouic S., 2009. Effet des particules fines atmosphériques sur la sécrétion des cytokines pro-inflammatoire par les cellules THP-1 et mesure des marqueurs du stress oxydant. Université Paul Verlain de Metz.
- Gruys, E., Toussaint, M.J.M., Niewold, T.A., Koopmans, S.J., 2005. Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhejiang Univ Sci B* 6, 1045-1056.
- Guengerich, F.P., Johnson, W.W., Ueng, Y.F., Yamazaki, H., Shimada, T., 1996. Involvement of cytochrome P450, glutathione S-transferase, and epoxide hydrolase in the metabolism of aflatoxin B1 and relevance to risk of human liver cancer. *Environ. Health Perspect* 104 Suppl 3, 557-562.
- Guilianelli, C., Baeza-Squiban, A., Lapart, E., Marano, F., 1996. Cultured airway epithelium responses to mineral particles: role of the oxidative stress. *Toxicol. Lett* 88, 39-44.

Bibliographie

Gundacker, C., Gencik, M., Hengstschläger, M., 2010. The relevance of the individual genetic background for the toxicokinetics of two significant neurodevelopmental toxicants: mercury and lead. *Mutat. Res* 705, 130-140.

Guo, Y., Jia, Y., Pan, X., Liu, L., Wichmann, H.-E., 2009. The association between fine particulate air pollution and hospital emergency room visits for cardiovascular diseases in Beijing, China. *Sci. Total Environ* 407, 4826-4830.

Haag M., Frossard N. et Pons F., 2001. Cytochromes P450 et glutathion S-transférases pulmonaires: des liens possibles avec l'inflammation et l'asthme? *Rev. Fr. Allergol. Immunol. Clin* 41 : 579-586.

Hamilton, J.A., 2008. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol* 8, 533-544.

Harrison R.M. et Allen A.G., 1990. Measurements of atmospheric HNO₃, HCl and associated species on a small network in eastern England. *Atmos. Environ* 24A : 369-376.

Harrison R.M. et Kitto A.N., 1992. Estimation of the rate constant for the reaction of acid sulphate aerosol with NH₃ gas from atmospheric measurements. *J. Atmos. Chem* 15 : 133-143.

Harrison R.M. et Msibi I.M. (1994) Validation of techniques for fast response measurement of HNO₃ and NH₃ and determination of the [NH₃] [HNO₃] concentration product. *Atmos. Environ* 28 : 247-255.

Harrison, R.M., Smith, D.J.T., Kibble, A.J., 2004. What is responsible for the carcinogenicity of PM_{2.5}? *Occup. Environ. Med* 61, 799-805.

Harrison R.M., Smith D.J.T., Piou C.A. et Castro L.M., 1997. Comparative receptor modelling study of airborne particulate pollutants in Birmingham (United Kingdom), Coimbra (Portugal) and Lahore (Pakistan). *Atmos. Environ* 31 (20) : 3309-3321.

Harrison, R.M., Yin, J., 2000. Particulate matter in the atmosphere: which particle properties are important for its effects on health? *The Science of The Total Environment* 249, 85-101

Hayes, J.D., Pulford, D.J., 1995. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol* 30, 445-600.

Hayes, J.D., Strange, R.C., 1995. Potential contribution of the glutathione S-transferase supergene family to resistance to oxidative stress. *Free Radic. Res* 22, 193-207.

Heinrich, P.C., Castell, J.V., Andus, T., 1990. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem. J* 265, 621-636.

Henderson, R.F., Sabourin, P.J., Bechtold, W.E., Griffith, W.C., Medinsky, M.A., Birnbaum, L.S., Lucier, G.W., 1989. The effect of dose, dose rate, route of administration, and species on tissue and blood levels of benzene metabolites. *Environ. Health Perspect* 82, 9-17.

Bibliographie

- Herrera, G.A., Alexander, C.B., DeMoraes, H.P., 1983. Ultrastructural subtypes of pulmonary adenocarcinoma. A correlation with patient survival. *Chest* 84, 581-586.
- Hetland, R.B., Schwarze, P.E., Johansen, B.V., Myran, T., Uthus, N., Refsnes, M., 2001. Silica-induced cytokine release from A549 cells: importance of surface area versus size. *Hum. Exp. Toxicol* 20, 46-55.
- Higuchi, Y., 2003. Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress. *Biochem. Pharmacol* 66, 1527-1535.
- Hoffmann, B., Moebus, S., Möhlenkamp, S., Stang, A., Lehmann, N., Dragano, N., Schmermund, A., Memmesheimer, M., Mann, K., Erbel, R., Jöckel, K.-H., 2007. Residential exposure to traffic is associated with coronary atherosclerosis. *Circulation* 116, 489-496.
- Holgate, S.T., Devlin, R.B., Wilson, S.J., Frew, A.J., 2003. Health effects of acute exposure to air pollution. Part II: Healthy subjects exposed to concentrated ambient particles. *Res Rep Health Eff Inst* 31-50; discussion 51-67.
- Huang, N.-H., Wang, Q., Xu, D.-Q., 2008. Immunological effect of PM_{2.5} on cytokine production in female Wistar rats. *Biomed. Environ. Sci* 21, 63-68.
- Hukkanen, J., Hakkola, J., Anttila, S., Piipari, R., Karjalainen, A., Pelkonen, O., Raunio, H., 1997. Detection of mRNA encoding xenobiotic-metabolizing cytochrome P450s in human bronchoalveolar macrophages and peripheral blood lymphocytes. *Mol. Carcinog* 20, 224-230.
- Hukkanen, J., Lassila, A., Päivärinta, K., Valanne, S., Sampo, S., Hakkola, J., Pelkonen, O., Raunio, H., 2000. Induction and regulation of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450s in the human A549 lung adenocarcinoma cell line. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol* 22, 360-366.
- Hukkanen, J., Pelkonen, O., Hakkola, J., Raunio, H., 2002. Expression and regulation of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 (CYP) enzymes in human lung. *Crit. Rev. Toxicol* 32, 391-411.
- Hussein Were, F., Njue, W., Murungi, J., Wanjau, R., 2008. Use of human nails as bio-indicators of heavy metals environmental exposure among school age children in Kenya. *Sci. Total Environ* 393, 376-384.
- Ianistcki, M., Dallarosa, J., Sauer, C., Teixeira, C.E., da Silva, J., 2009. Genotoxic effect of polycyclic aromatic hydrocarbons in the metropolitan area of Porto Alegre, Brazil, evaluated by *Helix aspersa* (Müller, 1774). *Environ. Pollut* 157, 2037-2042.
- Imrich, A., Ning, Y., Lawrence, J., Coull, B., Gitin, E., Knutson, M., Kobzik, L., 2007. Alveolar macrophage cytokine response to air pollution particles: oxidant mechanisms. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 218, 256-264.
- Jaiswal, A.K., Bell, D.W., Radjendirane, V., Testa, J.R., 1999. Localization of human NQO1 gene to chromosome 16q22 and NQO2-6p25 and associated polymorphisms. *Pharmacogenetics* 9, 413-418.

Bibliographie

- Janssen, N.A.H., Hoek, G., Simic-Lawson, M., Fischer, P., Bree, L. van, Brink, H.T., Keuken, M., Atkinson, R., Anderson, H.R., Brunekreef, B., Cassee, F.R., 2011. Black carbon as an Additional Indicator of the Adverse Health Effects of Airborne Particles Compared to PM₁₀ and PM_{2.5}. *Environ. Health Perspect.*
- Jaurand, M.C., Marano, F., Wallaërt, B., Gosset, P., and Haddad-Romet, S., 1995. Toxicité respiratoire in vitro. in *Toxicologie cellulaire in vitro - Méthodes et applications*, de M. Adolphe, Guillouzo, A., et Marano, F. (Eds) 9: pp.237-283.
- Johnston, C.J., Finkelstein, J.N., Oberdörster, G., Reynolds, S.D., Stripp, B.R., 1999. Clara cell secretory protein-deficient mice differ from wild-type mice in inflammatory chemokine expression to oxygen and ozone, but not to endotoxin. *Exp. Lung Res* 25, 7-21.
- Jones, A.M., Harrison, R.M., 2004. The effects of meteorological factors on atmospheric bioaerosol concentrations--a review. *Sci. Total Environ* 326, 151-180.
- Joseph, P., Jaiswal, A.K., 1994. NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 (DT diaphorase) specifically prevents the formation of benzo[a]pyrene quinone-DNA adducts generated by cytochrome P4501A1 and P450 reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 91, 8413-8417.
- Kand'ár, R., Záková, P., Lotková, H., Kucera, O., Cervinková, Z., 2007. Determination of reduced and oxidized glutathione in biological samples using liquid chromatography with fluorimetric detection. *J. Pharm. Biomed. Anal* 43, 1382-1387.
- Khan, M.F., Shirasuna, Y., Hirano, K., Masunaga, S., 2010. Characterization of PM_{2.5}, PM_{2.5-10} and PM > 10 in ambient air, Yokohama, Japan. *Atmos. Res* 96, 159-172.
- Kelly, F.J., 2003. Oxidative stress: its role in air pollution and adverse health effects. *Occup Environ Med* 60, 612-616.
- Kikouama, J.R.O., Konan, K.L., Katty, A., Bonnet, J.P., Baldé, L., Yagoubi, N., 2009. Physicochemical characterization of edible clays and release of trace elements. *Appl. Clay Sci* 43, 135-141.
- Kim Oanh, N.T., Thiansathit, W., Bond, T.C., Subramanian, R., Winijkul, E., Paw-armart, I., 2010. Compositional characterization of PM_{2.5} emitted from in-use diesel vehicles. *Atmos. Environ* 44, 15-22.
- Kinney, P.L., Gichuru, M.G., Volavka-Close, N., Ngo, N., Ndiba, P.K., Law, A., Gachanja, A., Gaita, S.M., Chillrud, S.N., Sclar, E., 2011. Traffic impacts on PM_{2.5} air quality in Nairobi, Kenya. *Environmental Science & Policy* 14, 369-378.
- Knuckles, T.L., Dreher, K.L., 2007. Fine oil combustion particle bioavailable constituents induce molecular profiles of oxidative stress, altered function, and cellular injury in cardiomyocytes. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* 70, 1824-1837.
- Koike, E., Kobayashi, T., 2006. Chemical and biological oxidative effects of carbon black nanoparticles. *Chemosphere* 65, 946-951.

Bibliographie

- Kotianová, P., Puxbaum, H., Bauer, H., Caseiro, A., Marr, I.L., Cík, G., 2008. Temporal patterns of n-alkanes at traffic exposed and suburban sites in Vienna. *Atmos. Environ* 42, 2993-3005.
- 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 (PM_{2.5}) collected in Abidjan, Côte d'Ivoire. *J. Appl. Toxicol* 30, 310-320.
- Künzli, N., Jerrett, M., Mack, W.J., Beckerman, B., LaBree, L., Gilliland, F., Thomas, D., Peters, J., Hodis, H.N., 2005. Ambient air pollution and atherosclerosis in Los Angeles. *Environ. Health Perspect* 113, 201-206.
- Ledoux, F., Courcot, L., Courcot, D., Aboukaïs, A., Puskaric, E., 2006. A summer and winter apportionment of particulate matter at urban and rural areas in northern France. *Atmospheric Research* 82, 633-642.
- Le Floch, M., 2004. Caractérisation physico-chimique et traçage des émissions particulaires métalliques d'une usine d'incinération d'ordures ménagères dans l'air ambiant. Exemple de l'UIOM de Toulon (Var, France). *Géo-sciences de l'environnement. Aix-Marseille III*.
- Li, N., Nel, A.E., 2006. Role of the Nrf2-mediated signaling pathway as a negative regulator of inflammation: implications for the impact of particulate pollutants on asthma. *Antioxid. Redox Signal* 8, 88-98.
- Li, N., Sioutas, C., Cho, A., Schmitz, D., Misra, C., Sempf, J., Wang, M., Oberley, T., Froines, J., Nel, A., 2003. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ. Health Perspect* 111, 455-460.
- Li, N., Xia, T., Nel, A.E., 2008. The role of oxidative stress in ambient particulate matter-induced lung diseases and its implications in the toxicity of engineered nanoparticles. *Free Radic. Biol. Med* 44, 1689-1699.
- Li, W., Peng, Y., Bai, Z., 2010. Distributions and sources of n-alkanes in PM_{2.5} at urban, industrial and coastal sites in Tianjin, China. *Journal of Environmental Sciences* 22, 1551-1557.
- Li, X.Y., Brown, D., Smith, S., MacNee, W., Donaldson, K., 1999. Short-term inflammatory responses following intratracheal instillation of fine and ultrafine carbon black in rats. *Inhal Toxicol* 11, 709-731.
- Li, Y.-J., Takizawa, H., Kawada, T., 2010. Role of oxidative stresses induced by diesel exhaust particles in airway inflammation, allergy and asthma: their potential as a target of chemoprevention. *Inflamm Allergy Drug Targets* 9, 300-305.
- Ling, S.H., van Eeden, S.F., 2009. Particulate matter air pollution exposure: role in the development and exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Int. J. Chron. Obstruct Pulmon. Dis* 4, 233-243.

Bibliographie

- Linnoila, R.I., Jensen, S.M., Steinberg, S.M., Mulshine, J.L., Eggleston, J.C., Gazdar, A.F., 1992. Peripheral airway cell marker expression in non-small cell lung carcinoma. Association with distinct clinicopathologic features. *Am. J. Clin. Pathol* 97, 233-243.
- Liu, H., Zhang, H., Iles, K.E., Rinna, A., Merrill, G., Yodoi, J., Torres, M., Forman, H.J., 2006. The ADP-stimulated NADPH oxidase activates the ASK-1/MKK4/JNK pathway in alveolar macrophages. *Free Radic. Res* 40, 865-874.
- Long, J.F., Waldman, W.J., Kristovich, R., Williams, M., Knight, D., Dutta, P.K., 2005. Comparison of ultrastructural cytotoxic effects of carbon and carbon/iron particulates on human monocyte-derived macrophages. *Environ. Health Perspect* 113, 170-174.
- Lonkar, P., Dedon, P.C., 2011. Reactive species and DNA damage in chronic inflammation: Reconciling chemical mechanisms and biological fates. *Int. J. Cancer* 128, 1999-2009.
- de Lorenzo A. , 1970. The olfactory neuron and the blood-brain barrier In: Taste and smell in vertebrates. Wolstenholme G, Knight J, eds: J and A. Churchill. 151-176
- Lucier, G.W., Portier, C.J., Gallo, M.A., 1993. Receptor mechanisms and dose-response models for the effects of dioxins. *Environ. Health Perspect* 101, 36-44.
- Ma, Y., Chen, R., Pan, G., Xu, X., Song, W., Chen, B., Kan, H., 2011. Fine particulate air pollution and daily mortality in Shenyang, China. *Sci. Total Environ.* 409, 2473-2477.
- Macé, K., Bowman, E.D., Vautravers, P., Shields, P.G., Harris, C.C., Pfeifer, A.M., 1998. Characterisation of xenobiotic-metabolising enzyme expression in human bronchial mucosa and peripheral lung tissues. *Eur. J. Cancer* 34, 914-920.
- Mamane Y., Willis R.D. et Conner T.L, 2000. Evaluation of computer-controlled scanning electronic microscopy applied to an ambient urban aerosol sample. *Aerosol Science Technology*, 34 : 97-107
- Manfredi, S., Federici, C., Picano, E., Botto, N., Rizza, A., Andreassi, M.G., 2007. GSTM1, GSTT1 and CYP1A1 detoxification gene polymorphisms and susceptibility to smoking-related coronary artery disease: a case-only study. *Mutat. Res* 621, 106-112.
- Marenco, A., Gouget, H., Nedelec, P., Pages, J.-P., Karcher, F., 1994. Evidence of a long-term increase in tropospheric ozone from Pic du Midi data series: consequences: positive radiative forcing. *Journal of Geophysical Research* 99, 16,617-16,632.
- Matsumoto, K., Kanmatsuse, K., 2000. Interleukin-18 and interleukin-12 synergize to stimulate the production of vascular permeability factor by T lymphocytes in normal subjects and in patients with minimal-change nephrotic syndrome. *Nephron* 85, 127-133.
- Mehta, M., Chen, L.-C., Gordon, T., Rom, W., Tang, M.-shong, 2008. Particulate matter inhibits DNA repair and enhances mutagenesis. *Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen* 657, 116-121.

Bibliographie

- Mitschik, S., Schierl, R., Nowak, D., Jörres, R.A., 2008. Effects of particulate matter on cytokine production in vitro: a comparative analysis of published studies. *Inhal Toxicol* 20, 399-414.
- Mkoma, S.L., Wang, W., Maenhaut, W., 2009. Seasonal variation of water-soluble inorganic species in the coarse and fine atmospheric aerosols at Dar es Salaam, Tanzania. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 267, 2897-2902.
- Monteiller, C., Tran, L., MacNee, W., Faux, S., Jones, A., Miller, B., Donaldson, K., 2007. The pro-inflammatory effects of low-toxicity low-solubility particles, nanoparticles and fine particles, on epithelial cells in vitro: the role of surface area. *Occup. Environ. Med* 64, 609-615.
- Mukaida, N., 2003. Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol* 284, L566-577.
- Murphy, P.M., Baggiolini, M., Charo, I.F., Hébert, C.A., Horuk, R., Matsushima, K., Miller, L.H., Oppenheim, J.J., Power, C.A., 2000. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol. Rev* 52, 145-176.
- Nebert, D.W., McKinnon, R.A., Puga, A., 1996. Human drug-metabolizing enzyme polymorphisms: effects on risk of toxicity and cancer. *DNA Cell Biol* 15, 273-280.
- 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. *J. Biol. Chem* 279, 23847-23850.
- Nel, A.E., Diaz-Sanchez, D., Li, N., 2001. The role of particulate pollutants in pulmonary inflammation and asthma: evidence for the involvement of organic chemicals and oxidative stress. *Curr. Opin. Pulm. Med* 7, 20-26.
- Nemmar, A., Hoet, P.H.M., Vanquickenborne, B., Dinsdale, D., Thomeer, M., Hoylaerts, M.F., Vanbilloen, H., Mortelmans, L., Nemery, B., 2002. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation* 105, 411-414.
- Nieboer, E., Fletcher, G.G., Thomassen, Y., 1999. Relevance of reactivity determinants to exposure assessment and biological monitoring of the elements. *J. Environ. Monit* 1, 1-14.
- Niedbala, W., Wei, X.-Q., Cai, B., Hueber, A.J., Leung, B.P., McInnes, I.B., Liew, F.Y., 2007. IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells. *Eur. J. Immunol* 37, 3021-3029.
- O'Neill, M.S., Veves, A., Zanobetti, A., Sarnat, J.A., Gold, D.R., Economides, P.A., Horton, E.S., Schwartz, J., 2005. Diabetes enhances vulnerability to particulate air pollution-associated impairment in vascular reactivity and endothelial function. *Circulation* 111, 2913-2920.

Bibliographie

- Oh, S.M., Kim, H.R., Park, Y.J., Lee, S.Y., Chung, K.H., 2011. Organic extracts of urban air pollution particulate matter (PM_{2.5})-induced genotoxicity and oxidative stress in human lung bronchial epithelial cells (BEAS-2B cells). *Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* In Press, Corrected Proof.
- Ostro, B., Broadwin, R., Green, S., Feng, W.-Y., Lipsett, M., 2006. Fine particulate air pollution and mortality in nine California counties: results from CALFINE. *Environ. Health Perspect* 114, 29-33.
- Øvrevik, J., Arlt, V.M., Øya, E., Nagy, E., Møllerup, S., Phillips, D.H., Låg, M., Holme, J.A., 2010. Differential effects of nitro-PAHs and amino-PAHs on cytokine and chemokine responses in human bronchial epithelial BEAS-2B cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 242, 270-280.
- Payne, J.P., Kemp, S.J., Dewar, A., Goldstraw, P., Kendall, M., Chen, L.C., Tetley, T.D., 2004. Effects of airborne World Trade Center dust on cytokine release by primary human lung cells in vitro. *J. Occup. Environ. Med* 46, 420-427.
- Pedersen, M., Wichmann, J., Autrup, H., Dang, D.A., Decordier, I., Hvidberg, M., Bossi, R., Jakobsen, J., Loft, S., Knudsen, L.E., 2009. Increased micronuclei and bulky DNA adducts in cord blood after maternal exposures to traffic-related air pollution. *Environ. Res.* 109, 1012-1020.
- Plopper, C.G., Macklin, J., Nishio, S.J., Hyde, D.M., Buckpitt, A.R., 1992. Relationship of cytochrome P-450 activity to Clara cell cytotoxicity. III. Morphometric comparison of changes in the epithelial populations of terminal bronchioles and lobar bronchi in mice, hamsters, and rats after parenteral administration of naphthalene. *Lab. Invest* 67, 553-565.
- Pope, C.A., 3rd, Burnett, R.T., Thurston, G.D., Thun, M.J., Calle, E.E., Krewski, D., Godleski, J.J., 2004. Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air pollution: epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease. *Circulation* 109, 71-77.
- Prahalad, A.K., Inmon, J., Dailey, L.A., Madden, M.C., Ghio, A.J., Gallagher, J.E., 2001. Air pollution particles mediated oxidative DNA base damage in a cell free system and in human airway epithelial cells in relation to particulate metal content and bioreactivity. *Chem. Res. Toxicol* 14, 879-887.
- Programme des Nations Unies pour l'Environnement (PNUE), 2011. Pollution de l'air urbain : http://www.unep.org/urban_environment/french/Issues/urban_air.asp (consulté le 10/04/2011).
- QUARG., 1996. Airborne Particulate Matter in the United Kingdom: Third Report of the Quality of Urban Air Review Group.
- Ravindra, K., Bencs, L., Wauters, E., de Hoog, J., Deutsch, F., Roekens, E., Bleux, N., Berghmans, P., Van Grieken, R., 2006. Seasonal and site-specific variation in vapour and aerosol phase PAHs over Flanders (Belgium) and their relation with anthropogenic activities. *Atmos. Environ* 40, 771-785.

Bibliographie

- Ravindra, Mittal, A.K., Van Grieken, R., 2001. Health risk assessment of urban suspended particulate matter with special reference to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. *Rev. Environ. Health* 16, 169-189.
- Reddel, R.R., Ke, Y., Gerwin, B.I., McMenamin, M.G., Lechner, J.F., Su, R.T., Brash, D.E., Park, J.-B., Rhim, J.S., Harris, C.C., 1988. Transformation of human bronchial epithelial cells by infection with SV40 or adenovirus-12 SV40 hybrid virus, or transfection via strontium phosphate coprecipitation with a plasmid containing SV40 early region genes. *Cancer Res* 48, 1904-1909.
- Renoux, A., Boulaud, D., 1998. *Les aérosols : physique et métrologie.*, Edition Tec et Doc, Lavoisier, Paris
- Revillard, J.P., 1994. [Therapeutic prospects in autoimmunity]. *Rev. Prat* 44, 93-97.
- Rockne, K.J., Taghon, G.L., Kosson, D.S., 2000. Pore structure of soot deposits from several combustion sources. *Chemosphere* 41, 1125-1135.
- Ross, D., Kepa, J.K., Winski, S.L., Beall, H.D., Anwar, A., Siegel, D., 2000. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms. *Chem. Biol. Interact* 129, 77-97.
- Rossi, A.M., Guarnieri, C., Rovesti, S., Gobba, F., Ghittori, S., Vivoli, G., Barale, R., 1999. Genetic polymorphisms influence variability in benzene metabolism in humans. *Pharmacogenetics* 9, 445-451.
- Rossner Jr., P., Rossnerova, A., Sram, R.J., 2011. Oxidative stress and chromosomal aberrations in an environmentally exposed population. *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen* 707, 34-41.
- Rothman, N., Smith, M.T., Hayes, R.B., Traver, R.D., Hoener, B., Campleman, S., Li, G.L., Dosemeci, M., Linet, M., Zhang, L., Xi, L., Wacholder, S., Lu, W., Meyer, K.B., Titenko-Holland, N., Stewart, J.T., Yin, S., Ross, D., 1997. Benzene poisoning, a risk factor for hematological malignancy, is associated with the NQO1 609C-->T mutation and rapid fractional excretion of chlorzoxazone. *Cancer Res* 57, 2839-2842.
- Roy, A., Sheffield, P., Wong, K., Trasande, L., 2011. The Effects of Outdoor Air Pollutants on the Costs of Pediatric Asthma Hospitalizations in the United States, 1999 to 2007. *Med Care*.
- Saber, A.T., Jacobsen, N.R., Bornholdt, J., Kjaer, S.L., Dybdahl, M., Risom, L., Loft, S., Vogel, U., Wallin, H., 2006. Cytokine expression in mice exposed to diesel exhaust particles by inhalation. Role of tumor necrosis factor. *Part Fibre Toxicol* 3, 4.
- 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.

Bibliographie

Salma, I., Maenhaut, W., 2006. Changes in elemental composition and mass of atmospheric aerosol pollution between 1996 and 2002 in a Central European city. *Environ. Pollut* 143, 479-488.

Schafer, F.Q., Buettner, G.R., 2001. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med* 30, 1191-1212.

Schaumann, F., Borm, P.J.A., Herbrich, A., Knoch, J., Pitz, M., Schins, R.P.F., Luettig, B., Hohlfeld, J.M., Heinrich, J., Krug, N., 2004. Metal-rich ambient particles (particulate matter 2.5) cause airway inflammation in healthy subjects. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 170, 898-903.

Schnelle-Kreis, J., Sklorz, M., Peters, A., Cyrys, J., Zimmermann, R., 2005. Analysis of particle-associated semi-volatile aromatic and aliphatic hydrocarbons in urban particulate matter on a daily basis. *Atmos. Environ* 39, 7702-7714.

Schwartz, J., 2001. Is there harvesting in the association of airborne particles with daily deaths and hospital admissions? *Epidemiology* 12, 55-61.

Schwartz, J., 2011. Long-Term Effects of Particulate Air Pollution on Human Health, in: *Encyclopedia of Environmental Health*. Elsevier, Burlington, pp. 520-527.

Schwarze, P.E., Ovrevik, J., Låg, M., Refsnes, M., Nafstad, P., Hetland, R.B., Dybing, E., 2006. Particulate matter properties and health effects: consistency of epidemiological and toxicological studies. *Hum. Exp. Toxicol* 25, 559-579.

Seinfeld S. et Pandis S., 2006. *Atmospheric Chemistry and Physics - From Air Pollution to Climate Change*, 2nd edition : 1225

Senlin, L., Zhenkun, Y., Xiaohui, C., Minghong, W., Guoying, S., Jiamo, F., Paul, D., 2008. The relationship between physicochemical characterization and the potential toxicity of fine particulates (PM_{2.5}) in Shanghai atmosphere. *Atmos. Environ* 42, 7205-7214.

Shi, T., Duffin, R., Borm, P.J.A., Li, H., Weishaupt, C., Schins, R.P.F., 2006. Hydroxyl-radical-dependent DNA damage by ambient particulate matter from contrasting sampling locations. *Environ. Res* 101, 18-24.

Shimada, T., 2006. Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metab. Pharmacokinet* 21, 257-276.

Shimada, T., Fujii-Kuriyama, Y., 2004. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. *Cancer Sci* 95, 1-6.

Shimada, T., Guengerich, F.P., 2006. Inhibition of human cytochrome P450 1A1-, 1A2-, and 1B1-mediated activation of procarcinogens to genotoxic metabolites by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chem. Res. Toxicol* 19, 288-294.

Bibliographie

- Shirali, P., Teissier, E., Marez, T., Hildebrand, H.F., Haguenoer, J.M., 1994. Effect of alpha Ni3S2 on arachidonic acid metabolites in cultured human lung cells (L132 cell line). *Carcinogenesis* 15, 759-762.
- 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)-kappaB-related genes and oxidant-dependent NF-kappaB activation in vitro. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol* 23, 182-187.
- Sies, H., 1991. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am. J. Med* 91, 31S-38S.
- Simkhovich, B.Z., Kleinman, M.T., Kloner, R.A., 2008. Air pollution and cardiovascular injury epidemiology, toxicology, and mechanisms. *J. Am. Coll. Cardiol* 52, 719-726.
- Singh, S., Shi, T., Duffin, R., Albrecht, C., van Berlo, D., Höhr, D., Fubini, B., Martra, G., Fenoglio, I., Borm, P.J.A., Schins, R.P.F., 2007. Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO2: role of the specific surface area and of surface methylation of the particles. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 222, 141-151.
- Sivertsen B., Guerreiro C., LY I., 2010. Air quality standards for Senegal. Rapport de projet d'implantation d'un laboratoire central et d'un réseau de surveillance de la qualité de l'air à Dakar.
- Smith, K.R., Kim, S., Recendez, J.J., Teague, S.V., Ménache, M.G., Grubbs, D.E., Sioutas, C., Pinkerton, K.E., 2003. Airborne particles of the California central valley alter the lungs of healthy adult rats. *Environ. Health Perspect* 111, 902-908; discussion A408-409.
- Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J. et Klenk D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150 (1) : 76-85
- Snyder, J.C., Reynolds, S.D., Hollingsworth, J.W., Li, Z., Kaminski, N., Stripp, B.R., 2010. Clara cells attenuate the inflammatory response through regulation of macrophage behavior. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol* 42, 161-171.
- Sørensen, M., Schins, R.P.F., Hertel, O., Loft, S., 2005. Transition metals in personal samples of PM2.5 and oxidative stress in human volunteers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* 14, 1340-1343.
- Soukup, J.M., Becker, S., 2001. Human alveolar macrophage responses to air pollution particulates are associated with insoluble components of coarse material, including particulate endotoxin. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 171, 20-26.
- Spivack, S.D., Hurteau, G.J., Fasco, M.J., Kaminsky, L.S., 2003. Phase I and II carcinogen metabolism gene expression in human lung tissue and tumors. *Clin. Cancer Res* 9, 6002-6011

Bibliographie

- 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 Radic. Biol. Med* 31, 1132-1138.
- Stone, V., Shaw, J., Brown, D.M., Macnee, W., Faux, S.P., Donaldson, K., 1998. The role of oxidative stress in the prolonged inhibitory effect of ultrafine carbon black on epithelial cell function. *Toxicol In Vitro* 12, 649-659.
- Sun, Q., Jones, K., McClure, B., Cambareri, B., Zacharakis, B., Iversen, P.O., Stomski, F., Woodcock, J.M., Bagley, C.J., D'Andrea, R., Lopez, A.F., 1999. Simultaneous antagonism of interleukin-5, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and interleukin-3 stimulation of human eosinophils by targeting the common cytokine binding site of their receptors. *Blood* 94, 1943-1951.
- Sun, Y., Yin, Y., Zhang, J., Yu, H., Wang, X., Wu, J., Xue, Y., 2008. Hydroxyl radical generation and oxidative stress in *Carassius auratus* liver, exposed to pyrene. *Ecotoxicol. Environ. Saf* 71, 446-453.
- Takezawa, C., Takahashi, H., Fujishima, T., Shiratori, M., Morita, Y., Sano, H., Kuroki, Y., Abe, S., 2002. Assessment of differentiation in adenocarcinoma cells from pleural effusion by peripheral airway cell markers and their diagnostic values. *Lung Cancer* 38, 273-281.
- Takezawa, H., Ohtoshi, T., Kawasaki, S., Kohyama, T., Desaki, M., Kasama, T., Kobayashi, K., Nakahara, K., Yamamoto, K., Matsushima, K., Kudoh, S., 1999. Diesel exhaust particles induce NF-kappa B activation in human bronchial epithelial cells in vitro: importance in cytokine transcription. *J. Immunol* 162, 4705-4711.
- Aboul-Kassim, T.A.T., Simoneit, B.R.T., 1995. Petroleum hydrocarbon fingerprinting and sediment transport assessed by molecular biomarker and multivariate statistical analyses in the Eastern Harbour of Alexandria, Egypt. *Marine Pollution Bulletin* 30, 63-73.
- Thannickal VJ & Fanburg BL., 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279, L1005-1028.
- Thier, R., Brüning, T., Roos, P.H., Rihs, H.-P., Golka, K., Ko, Y., Bolt, H.M., 2003. Markers of genetic susceptibility in human environmental hygiene and toxicology: the role of selected CYP, NAT and GST genes. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 206, 149-171.
- Tilg, H., Trehu, E., Atkins, M.B., Dinarello, C.A., Mier, J.W., 1994. Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood* 83, 113-118.
- Torres, M., Forman, H.J., 1999. Activation of several MAP kinases upon stimulation of rat alveolar macrophages: role of the NADPH oxidase. *Arch. Biochem. Biophys* 366, 231-239.
- 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. *Particle and Fibre Toxicology* 7.

Bibliographie

- Tracey, D., Klareskog, L., Sasso, E.H., Salfeld, J.G., Tak, P.P., 2008. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol. Ther* 117, 244-279.
- Tracey, K.J., Cerami, A., 1993. Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Annu. Rev. Cell Biol* 9, 317-343.
- United Nations, Department of Economic and Social Affairs, 2010. *World Urbanization Prospects: The 2009 Revision*. United Nations, New York.
- Uppstad, H., Øvrebø, S., Haugen, A., Mollerup, S., 2010. Importance of CYP1A1 and CYP1B1 in bioactivation of benzo[a]pyrene in human lung cell lines. *Toxicol. Lett* 192, 221-228.
- Vakharia, D.D., Liu, N., Pause, R., Fasco, M., Bessette, E., Zhang, Q.-Y., Kaminsky, L.S., 2001. Effect of Metals on Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Induction of CYP1A1 and CYP1A2 in Human Hepatocyte Cultures. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 170, 93-103.
- Valavanidis, A., Fiotakis, K., Vlachogianni, T., 2008. Airborne particulate matter and human health: toxicological assessment and importance of size and composition of particles for oxidative damage and carcinogenic mechanisms. *J. Environ. Sci. Health C Environ. Carcinog. Ecotoxicol Rev* 26, 339-362.
- Valavanidis, A., Vlahoyianni, T., Fiotakis, K., 2005. Comparative study of the formation of oxidative damage marker 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) adduct from the nucleoside 2'-deoxyguanosine by transition metals and suspensions of particulate matter in relation to metal content and redox reactivity. *Free Radic. Res* 39, 1071-1081.
- Van Eeden, S.F., Tan, W.C., Suwa, T., Mukae, H., Terashima, T., Fujii, T., Qui, D., Vincent, R., Hogg, J.C., 2001. Cytokines involved in the systemic inflammatory response induced by exposure to particulate matter air pollutants (PM₁₀). *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 164, 826-830.
- Van Malderen, H., Van Grieken, R., Khodzher, T., Obolkin, V., Potemkin, V., 1996. Composition of individual aerosol particles above Lake Baikal, Siberia. *Atmos. Environ* 30, 1453-1465
- Vidrio, E., Phuah, C.H., Dillner, A.M., Anastasio, C., 2009. Generation of hydroxyl radicals from ambient fine particles in a surrogate lung fluid solution. *Environ. Sci. Technol* 43, 922-927.
- Wang, H., Shooter, D., 2001. Water soluble ions of atmospheric aerosols in three New Zealand cities: seasonal changes and sources. *Atmos. Environ.* 35, 6031-6040.
- Weinstein, J.P., Hedges, S.R., Kimbrough, S., 2010. Characterization and aerosol mass balance of PM_{2.5} and PM₁₀ collected in Conakry, Guinea during the 2004 Harmattan period. *Chemosphere* 78, 980-988.
- Westerholm, R., Egeback, K.E., 1994. Exhaust emissions from light- and heavy-duty vehicles: chemical composition, impact of exhaust after treatment, and fuel parameters. *Environ. Health Perspect* 102 Suppl 4, 13-23.

Bibliographie

- Whitby K.T. et Cantrell B.K., 1976. Atmospheric aerosols: characteristics and measurement. In: International Conference on Environmental Sensing and Assessment, Institute of Electrical and Electronic Engineers. IEEE 75-CH 1004-1, Paper 29-1, 6pp.
- Whitlock, J.P., Jr, 1999. Induction of cytochrome P4501A1. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* 39, 103-125.
- Whitlock, J.P., Jr, Chichester, C.H., Bedgood, R.M., Okino, S.T., Ko, H.P., Ma, Q., Dong, L., Li, H., Clarke-Katzenberg, R., 1997. Induction of drug-metabolizing enzymes by dioxin. *Drug Metab. Rev* 29, 1107-1127.
- WHO. 2006. Preventing disease through healthy environments: Towards an estimate of environmental burden of disease. Prüss-Ustén A and Corvalán C, World Health Organization, Geneva
- WHO, 2007. Country profiles of environmental burden of disease. www.who.int/quantifying_ehimpact/countryprofiles, accessed on 15 May 2008
- Wilson, M.R., Lightbody, J.H., Donaldson, K., Sales, J., Stone, V., 2002. Interactions between ultrafine particles and transition metals in vivo and *in vitro*. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 184, 172-179.
- Xia, T., Korge, P., Weiss, J.N., Li, N., Venkatesen, M.I., Sioutas, C., Nel, A., 2004. Quinones and aromatic chemical compounds in particulate matter induce mitochondrial dysfunction: implications for ultrafine particle toxicity. *Environ. Health Perspect* 112, 1347-1358.
- Xue, W., Warshawsky, D., 2005. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 206, 73-93.
- Yokel, R.A., Lasley, S.M., Dorman, D.C., 2006. The speciation of metals in mammals influences their toxicokinetics and toxicodynamics and therefore human health risk assessment. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit Rev* 9, 63-85.
- Yu M.-H., 2001. Environmental toxicology: Impacts of environmental toxicants on living systems.
- Zanobetti, A., Schwartz, J., Dockery, D.W., 2000. Airborne particles are a risk factor for hospital admissions for heart and lung disease. *Environ. Health Perspect* 108, 1071-1077.
- Zanobetti, A., Schwartz, J., 2002. Cardiovascular damage by airborne particles: are diabetics more susceptible? *Epidemiology* 13, 588-592.
- Zhou, Y.-M., Zhong, C.-Y., Kennedy, I.M., Leppert, V.J., Pinkerton, K.E., 2003. Oxidative stress and NFkappaB activation in the lungs of rats: a synergistic interaction between soot and iron particles. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 190, 157-169.
- Ziech, D., Franco, R., Pappa, A., Panayiotidis, M.I., 2011. Reactive Oxygen Species (ROS)--Induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis. *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 711, 167-173.