

ARTICLES

Étude de l'activation métabolique des composés organiques volatils et des hydrocarbures aromatiques polycycliques d'un aérosol anthropogénique par des macrophages alvéolaires humains en culture primaire

Metabolic activation of volatile organic compounds and polycyclic aromatic hydrocarbons coated onto airborne PM_{2.5} in isolated human alveolar macrophages

F. SAINT-GEORGES*, **, I. ABBAS**, G. GARÇON**, S. BILLET**,
A. VERDIN**, P. GOSSET***, D. COURCOT****, P. MULLIEZ*, P. SHIRALI**

Résumé

Les études épidémiologiques montrent l'existence d'une relation de causalité entre l'augmentation de la pollution atmosphérique et l'incidence accrue de pathologies cardiorespiratoires. Toutefois, ces enquêtes ne considèrent généralement que l'aspect granulométrique des aérosols ; en effet, l'une des difficultés à laquelle sont confrontés les épidémiologistes est la grande complexité et hétérogénéité de tels aérosols.

Afin de contribuer à améliorer les connaissances sur les mécanismes d'action toxiques sous-jacents impliqués dans le développement des pathologies pulmonaires, nous nous sommes intéressés à l'activation métabolique par des macrophages alvéolaires (MA) humains en culture primaire des composés organiques volatils (COV) et/ou des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) présents au sein de la fraction particulaire d'un aérosol anthropogénique collecté à Dunkerque.

Les MA humains ont été isolés à partir de lavages bronchiolo-alvéolaires réalisés chez des patients après le recueil de leurs consentements éclairés. L'exposition des cultures primaires de MA humains à des concentrations croissantes de l'échantillon particulaire collecté à Dunkerque a induit des variations significatives des activités de la déshydrogénase mitochondriale et de la lactate déshydrogénase extracellulaire, indiquant respectivement une altération du métabolisme mitochondrial et de la perméabilité et/ou de l'intégrité membranaire. Les concentrations létales à 10 % et 50 % étaient de 14,93 µg/mL et 74,63 µg/mL.

En outre, l'exposition des MA humains à la fraction particulaire de l'aérosol anthropogénique a provoqué l'induction génique des enzymes de la phase I (i.e. *cytochrome P450 (CYP) 1A1, CYP2E1, NADPH Quinone Oxydo-reductase (NQO)-1*) et de la phase II (i.e. *Glutathion S-Transférase (GST) P1 et M3*) de l'activation métabolique pulmonaire des COV et des HAP, ce qui pourrait générer des métabolites très réactifs impliqués dans la formation d'adduits à l'ADN.

* Service de pneumologie – Hôpital Saint-Philibert – GHICL-FLM – 115, rue du Grand But – BP 249 – 59462 Lomme Cedex – France.

** LCE-EA2598 – Laboratoire de recherche en toxicologie industrielle et environnementale – ULCO-MREI 2 – 189A, avenue Maurice Schumann – 59140 Dunkerque – France.

*** Laboratoire d'anatomie et de cytologie pathologiques – Hôpital Saint-Vincent – GHICL-FLM – 56, rue du Port, 59046 Lille Cedex – France.

**** LCE-EA2598 – Laboratoire de catalyse et environnement – ULCO-MREI 1 – 189A, avenue Maurice Schumann, 59140 Dunkerque, France.

De plus, les différences quant à la cinétique d'induction génique de ces enzymes du métabolisme des COV et des HAP en fonction des expositions considérées ont suggéré que la fraction inorganique des aérosols jouerait un rôle de vecteur physique de la fraction organique adsorbée, et favoriserait par conséquent sa pénétration, sa rétention et sa toxicité dans les cultures primaires de MA humains.

Mots clés

Patients sains. Lavage bronchiolo-alvéolaire. Macrophages alvéolaires. Aérosol anthropogénique. Cytotoxicité. Activation métabolique. Composés organiques volatils. Hydrocarbures aromatiques polycycliques.

Abstract

To contribute to improve the knowledge of the underlying mechanisms of action involved in air pollution Particulate Matter (PM)-induced cytotoxicity, we were interested in the metabolic activation of Volatile Organic Compounds (VOC) and/or Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH)-coated onto Dunkerque City's PM_{2.5} in human Alveolar Macrophages (AM) isolated from BronchoAlveolar Lavage Fluid (BALF). This *in vitro* cell lung model is very close to the normal *in vivo* situation, notably in the characteristics that AM display in terms of gene expression of phase I and phase II-metabolizing enzymes. The bronchoscopic examinations and BAL procedures were carried out without any complications. The exposure of AM, during 24, 48 or 72 h, to increasing concentrations of the collected aerosol induced significant variations of the activities of the extracellular lactate deshydrogenase and the mitochondrial deshydrogenase. The lethal concentrations at 10% and 50% were 14.93 and 74.63 µg/mL for AM, respectively, and indicated the relatively higher sensibility of such target lung cells. VOC and/or PAH-coated at low levels onto the surface of the particulate fraction significantly induced gene expression of *cytochrome P450 (CYP) 1A1*, *CYP2E1*, *NADPH Quinone Oxydo-reductase (NQO) 1* and *Glutathione S-Transferase (GST)P1* and *M3*, versus controls, suggesting thereby the formation of biologically reactive metabolites. Moreover, these results suggested the role of physical vector of carbonaceous core of PM, which can, therefore, increase both the penetration and the retention of attached-VOC into the cells, thereby enabling them to exert a more durable induction. Hence, we concluded that the metabolic activation of the very low doses of VOC and/or PAH-coated onto Dunkerque City's PM_{2.5} is one of the underlying mechanisms of action closely involved in its cytotoxicity in isolated human AM in culture.

Keywords

Healthy outpatients. Bronchoalveolar lavage. Alveolar macrophage. Particulate matter. Anthropogenic aerosol. Cytotoxicity. Metabolic activation. Volatile organic compounds. Polycyclic aromatic hydrocarbons.

1. Introduction

La pollution atmosphérique particulaire est un facteur de risque environnemental suspecté d'avoir un impact significatif sur la santé et notamment d'être à l'origine d'infections respiratoires aiguës, de décompensations cardio-respiratoires et pouvant participer au développement des cancers broncho-pulmonaires [1]. Les mécanismes d'action des aérosols (i.e. *Particule Matter* ; PM) sur la santé demeurent encore incomplètement compris, mais l'une des hypothèses sous-jacentes est que la fraction organique adsorbée à la surface des particules pourrait jouer un rôle clé dans leur toxicité [2] (cf. Billet *et al.*, dans ce numéro). Une meilleure connaissance des caractéristiques physiques et chimiques des aérosols, dépendant des sources d'émission, de l'intensité des émissions et des interactions moléculaires entre leurs composants organiques et inorganiques, constitue une information cruciale pour l'évaluation de leur toxicité, mais se révèle insuffisante pour prédire leur réactivité toxicologique [3].

Du fait de leur petite taille, les particules fines et ultra-fines (i.e. PM_{2.5} et PM_{0.1}, respectivement) ont la capacité d'atteindre les régions distales des poumons et sont responsables des effets sanitaires les plus délétères [4]. De tels aérosols d'origine anthropogénique sont des mélanges très complexes et très

hétérogènes d'éléments chimiques et/ou biologiques tels que les métaux, les sels, les matériels carbonés, les composés organiques volatils (COV), les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), et des endotoxines [2]. Malgré leur présence à des doses faibles voire ultra-faibles, certains de ces constituants organiques, après avoir subi une activation métabolique par les cellules pulmonaires, peuvent être étroitement impliqués dans la cytotoxicité des aérosols atmosphériques [5, 6].

Le tractus respiratoire est le premier organe cible des polluants atmosphériques [7]. Il est composé de plus de 40 types cellulaires différents, chacun avec un niveau de compétence métabolique spécifique [8]. Parmi eux, les macrophages alvéolaires (MA) jouent un rôle critique dans la défense du compartiment pulmonaire contre la pollution atmosphérique. Les cellules macrophagiques prennent notamment part à la détoxification des polluants organiques inhalés grâce à leur activation métabolique par des enzymes de la phase I et de la phase II [7]. Ces enzymes, et en particulier les cytochromes P450 (CYP), sont présents dans le parenchyme pulmonaire humain et différents types cellulaires, où elles contribuent à l'activation métabolique *in situ* de certains des polluants organiques [9].

Chez l'homme, les COV et les HAP requièrent une activation métabolique pour exercer leur toxicité

pulmonaire et sont majoritairement convertis en métabolites électrophiles biologiquement très réactifs par la superfamille des CYP : CYP2E1 et CYP2F1 pour les COV et CYP1A1 pour les HAP [2, 9-11]. Les CYP jouent un rôle important dans la défense du poumon contre les polluants organiques inhalés, même si leurs expressions géniques varient en fonction du type de cellules ou du tissu pulmonaire considérés [9]. Les époxydes formés subissent un réarrangement soit directement avec production de phénols, soit indirectement, lorsque leur conversion en dihydrodiols est catalysée par l'époxyde hydrolase microsomale (EHm) [12]. Ces métabolites pourront par la suite être oxydés par les mêmes CYP [13]. Dans le poumon, la NADPH quinone oxydo-réductase-1 (NQO1) catalyse la conversion des dérivés des quinones en leurs formes réduites telles que les hydroquinones [12]. Une fois métabolisés par les enzymes de la phase I, les intermédiaires réactifs peuvent se réarranger ou exercer directement leurs effets toxiques. La phase de métabolisation suivante consiste en la conjugaison des métabolites hautement réactifs en métabolites plus hydrophiles, essentiellement catalysée par les glutathion S-transférases (GST) [14]. La connaissance de l'expression des enzymes des phases I et II de l'activation métabolique dans des cellules ou des tissus pulmonaires pourrait donc permettre de mieux apprécier le rôle joué par la fraction organique des aérosols dans leur cytotoxicité pulmonaire.

En effet, l'activation métabolique des très faibles doses de COV et/ou de HAP, adsorbés à la surface de la fraction particulaire des aérosols prélevés à Dunkerque (France), serait l'un des principaux mécanismes d'action impliqués dans leur cytotoxicité dans les cellules dérivées d'un carcinome épithélial alvéolaire humain de type II (A549). Toutefois, ces observations, présentées par Billet *et al.* dans ce numéro, ont été réalisées dans un modèle de cellules humaines pulmonaires cancéreuses et il est donc indispensable de les confirmer dans un modèle de cellules pulmonaires humaines normales.

Afin d'améliorer la connaissance du rôle clef joué par les fractions organiques adsorbées à la surface des particules atmosphériques, nous nous sommes intéressés à la cytotoxicité potentielle de PM_{2,5}, collectées à Dunkerque dans un modèle de culture primaire de MA humains isolés par lavage bronchiolo-alvéolaire (LBA). Ces cellules jouent, en effet, un rôle particulièrement important dans la défense pulmonaire contre la pollution de l'air, non seulement par l'intermédiaire de la clairance des particules inhalées, mais aussi en contribuant largement à la détoxification de la fraction organique des xénobiotiques, *via* son activation métabolique par les enzymes de Phases I et II [6, 7]. L'activation métabolique par ce modèle cellulaire des COV et/ou les HAP adsorbés sur ces particules a été étudiée *via* la détermination de l'expression génique du CYP1A1, CYP2E1, CYP2F1, EHm, NQO1, GSTP1 et GSTM3. Pour mieux discerner le rôle de la fraction organique, des particules de dioxyde

de titane (TiO₂), d'une part, et des particules totales (Pt) ayant subi une désorption thermique sous vide secondaire (particules désorbées ; Pd), d'autre part, ont été incluses dans cette étude, comme contrôles négatifs, puisque ne présentant *a priori* pas de fraction organique susceptible d'être métabolisée.

2. Matériels et méthodes

2.1. Matériels

2.1.1. Matériels chimiques

La fraction particulaire d'un aérosol anthropogénique a été prélevée en continu pendant neuf mois, par impaction en cascade dans la ville de Dunkerque, en milieu urbain et sous l'influence du complexe industriel [2]. La caractérisation physico-chimique de la fraction particulaire de cet aérosol est présentée par Billet *et al.* dans ce même numéro. Brièvement, l'étude granulométrique de l'échantillon a révélé que 92,15 % des particules avaient un diamètre aérodynamique inférieur à 2,5 µm (PM_{2,5}). Leur surface spécifique était de 1 m²/g pour les particules totales (Pt) et de 50 m²/g après désorption thermique sous vide progressif (Pd). De nombreux éléments inorganiques (Fe : 7,84 %, Al : 5,83 %, Mn : 0,35 %, etc.), organiques (benzène : 106,5 ppm, diéthylbenzène : 170,3 ppm, tétraméthylbenzène : 89,5 ppm, toluène : 42,2 ppm, xylène : 65,4 ppm, anthracène : 47,1 ppm, phénanthrène : 28,3 ppm, pyrène : 4,7 ppm, benzo-(a)anthracène : 4,9 ppm, etc.) et ioniques (CL⁻, NO₃⁻, SO₄²⁻, NH₄⁺ et F⁻) ont été identifiés au sein des particules atmosphériques collectées à Dunkerque.

2.1.2. Matériel biologique

Les modèles de cellules pulmonaires utilisés dans le présent travail étaient des MA humains, recueillis à partir des LBA de patients.

2.2. Méthodes

2.2.1. LBA

Les LBA ont été effectués après accord du Comité de protection des personnes (CPP). Grâce à un questionnaire médical exhaustif, des critères d'inclusion et d'exclusion ont été appliqués à la sélection des patients. En effet, les patients inclus devaient notamment être majeurs, à jeun depuis au moins 4 h, non fumeurs ou anciens fumeurs (> 10 ans), et ne pas présenter d'insuffisance respiratoire, d'asthme, de cancer bronchique, d'allergie à la lidocaïne, de bradycardie, ni de tachycardie, etc. Les LBA ont été réalisés sous endoscopie après anesthésie locale nasopharyngée par la lidocaïne, avec 300 mL de solution saline isotonique stérile, injectée par fraction de 50 mL. La réaspiration immédiate de ces fractions a permis de récupérer en partie les fractions injectées ; les liquides recueillis, supplémentés à 1 % (v/v) avec un antifongique et des antibiotiques, ont été conservés à 4 °C.

2.2.2. Cultures primaires de MA

Après centrifugation (10 min, 500 g, 4 °C) des liquides recueillis par LBA, les culots cellulaires ont été lavés avec du milieu de culture RPMI 1640 supplémentés à 1 % (v/v) avec un antifongique et des antibiotiques. Des numérations et des formules cellulaires ont été réalisées avec une cellule de Malassez après une coloration de May-Grünwald-Giemsa. Les MA ont alors étéensemencés soit dans des microplaques de culture à 96 puits, soit dans des flacons de culture 25 cm² en présence de RPMI 1640 complet, contenant 10 % (v/v) de sérum de veau fœtal. Les cellules ont été incubées dans des conditions de culture classiques (T = 37 °C ; CO₂ = 5 %, atmosphère saturée en humidité), puis, après 4 h, un changement des milieux de culture a été effectué pour éliminer les cellules non adhérentes.

2.2.3. Cytotoxicité

Après avoir exposé les cultures primaires de MA à des concentrations croissantes de Pt, leur cytotoxicité a été évaluée par deux méthodes : l'activité de la lactico-déshydrogénase (LDH) extracellulaire et l'activité de la déshydrogénase mitochondriale (DHm).

Les MA (5.10⁴ cellules/200 µL/puits) ont étéensemencés dans des microplaques de culture à 96 puits et incubés pendant 24, 48 ou 72 h en présence de concentrations croissantes de Pt : 18,84 ; 37,68 ; 56,52 ; et 75,36 µg/mL. Pour chaque microplaque, 16 puits ne contenant que du RPMI 1640 complet ont été considérés comme témoins négatifs (100 % viabilité), 8 puits ont été exposés à chaque concentration de particules, et 8 puits contenant du Triton X100 à 2 % (v/v) ont servi de témoins positifs (100 % mortalité).

L'activité enzymatique de la LDH a été déterminée sur les surnageants (100 µL/puits), prélevés dans les microplaques de culture avant la mesure de l'activité de la DHm, grâce au *Cytotoxicity detection kit* (LDH ; Roche Applied Science). La survie cellulaire a pu être évaluée via l'activité de la DHm en utilisant le test de cytotoxicité WST-1 (Roche Applied Science).

2.2.4. Activation métabolique de la fraction organique des aérosols par les MA

Afin d'évaluer le rôle de la fraction organique dans la cytotoxicité intrinsèque des aérosols, l'expression génique des enzymes de la phase I (CYP1A1, CYP2E1, CYP2F1, EHM, NQO1) et de la phase II (GSTP1 et GSTM3) impliquées chez l'homme dans l'activation métabolique pulmonaire des COV et/ou des HAP a été déterminée après 24, 48 ou 72 h d'exposition des macrophages alvéolaires.

Les MA ont étéensemencés dans 132 flacons de culture de 25 cm² (1 série de 44 flacons/temps d'incubation) à raison de 1.10⁶ cellules/5 mL/flacon. Après 4 heures d'incubation, le milieu de culture a été changé pour éliminer les cellules non adhérentes. Pour chaque temps d'incubation, 4 flacons de culture ont été exposés aux Pt à leurs concentrations létales

(CL) à 10 % et à 50 % (CL₁₀ = 14,93 µg/mL et CL₅₀ = 74,63 µg/mL, respectivement). Les flacons de culture ne contenant que du milieu de culture complet ont été considérés comme des témoins négatifs (n = 8). De même, des flacons exposés à des particules de TiO₂ (n = 4) et à des P_d (n = 4), à des concentrations équivalentes à la CL₁₀ et à la CL₅₀ de la fraction inorganique des aérosols, c'est-à-dire intégrant la perte de masse liée à la désorption effective de la fraction organique, ont servi de témoins négatifs (Eq CL₁₀ = 12,22 µg/mL et Eq CL₅₀ = 61,11 µg/mL). Par ailleurs, l'exposition de flacons de culture au benzène (7 µM ; n = 4), au toluène (7 µM ; n = 4) et au B(a)P (1 µM ; n = 4) a constitué des contrôles positifs. Dès la fin du temps d'incubation, les cellules ont été prélevées, lavées deux fois avec du tampon phosphate (10 mM ; pH = 7,2-7,4), puis des aliquots des culots cellulaires ont été rapidement congelés et conservés à -80 °C.

Les ARN totaux ont été extraits à partir des MA à l'aide du RNAqueous-4PCR (Ambion). Pour la synthèse des ADN complémentaires (ADNc) par la méthode de la *Reverse Transcription* (RT), 1 µg d'ARN totaux a été mis en suspension dans un volume final de 20 µL de mélange réactionnel (50 mM Tris-HCl, 40 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM de dithiothreitol, 0,5 % (v/v) Tween® 20, 1 mM d'un mélange équimolaire de désoxynucléotides triphosphates, 20 U d'inhibiteur de RNases, 100 pM de random hexamers, 50 U de *Multiscribe Reverse Transcriptase* ; *High CAP cDNA Reverse Transcriptase Kit*, Applera France SA), et incubé comme suit : 10 min à 25 °C, 120 min à 37 °C, et 5 s à 85 °C. La quantification relative de l'expression génique des enzymes des phases I et II impliquées dans l'activation métabolique pulmonaire des COV et des HAP, à savoir le CYP1A1, le CYP2E1, le CYP2F1, l'EHM, la NQO1, la GSTP1, et la GSTM3, a été déterminée grâce à la méthode des C_t en utilisant l'ARN18S comme gène rapporteur. Les réactifs *TaqMan Gene Expression Assay* et *TaqMan Fast Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG* (Applera France SA) ont été utilisés selon un programme à deux étapes : dénaturation (95 °C, 2 s/cycle) puis 35 cycles d'hybridation et d'élongation (60 °C, 3 s/cycle). Les réactions de RT et de PCR ont été réalisées à l'aide d'un thermocycleur 7500 *Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems SA).

2.2.5. Analyses statistiques

L'attribution des traitements a été réalisée avec une table de permutation au hasard à onze éléments. Les variables aléatoires quantitatives continues considérées, à savoir l'activité de la DHm, l'activité de la LDH extracellulaire, l'expression génique du CYP1A1, du CYP2E1, du CYP2F1, de la NQO1, de l'EHM, de la GSTP1, et de la GSTM3, et les taux relatifs d'adduits ont été décrites par leurs moyennes et leurs valeurs minimales-maximales. Les valeurs des variables aléatoires de chaque groupe (contrôles négatifs, contrôles positifs, concentrations croissantes de l'aérosol) ont été comparées à celles du groupe témoin grâce au test non paramétrique U de Mann-

Whitney. Le risque d'erreur de première espèce (α) consenti était de 0,05. Le traitement des données a été réalisé avec le logiciel d'analyses statistiques SPSS 12.0 for Windows, Version 12.0.1 Nov. 2003 (SPSS France, Paris, France).

3. Résultats

3.1. Caractéristiques des patients inclus et de leurs LBA

Le Tableau 1 résume les principales caractéristiques des LBA des quatre patients inclus dans le protocole.

Le Tableau 1 présente les caractéristiques des lavages bronchiolo-alvéolaires (LBA) des quatre patients inclus dans le protocole. Les résultats sont décrits par leurs moyennes et leurs valeurs minimales-maximales. (LDH : lactate déshydrogénase).

3.2. Cytotoxicité

La Figure 1 montre les résultats quant aux activités de la LDH extracellulaire et de la DHm dans les MA exposés à des concentrations croissantes d'aérosols. Après 24 h d'incubation, l'activité de la LDH extracellulaire n'est significativement accrue que pour les MA exposés à des concentrations de poussières supérieures ou égales à 37,68 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,01$). Au contraire, aucune variation significative n'est observée après 48 et 72 h d'incubation. Quel que soit le temps d'observation considéré, l'activité de la DHm est significativement réduite en présence des aérosols, et ce dès la plus faible concentration (18,84 $\mu\text{g/mL}$; $p < 0,01$). Les résultats des trois temps d'incubation quant à l'activité de la DHm nous permettent de calculer les concentrations létales à 10 % ($\text{CL}_{10} = 14,93 \mu\text{g/mL}$) et à 50 % ($\text{CL}_{50} = 74,63 \mu\text{g/mL}$), qui seront utilisées dans la suite de ce travail.

3.4. Activation métabolique de la fraction organique des aérosols par les MA

Afin d'étudier l'implication de la fraction organique dans la toxicité intrinsèque des aérosols, l'activation métabolique des COV et des HAP a été étudiée via la détermination de l'expression génique du *CYP1A1*, du *CYP2E1*, du *CYP2F1*, de l'*EHm*, de la *NQO1*, et des *GSTP1* et *GSTM3* (Tableaux 2 et 3). L'exposition des MA aux concentrations de Pd, de Pt, et de B(a)P induit une transcription accrue du *CYP1A1* après 24, 48, et 72 h ($p < 0,05$). De plus, contrairement aux expositions aux Pd, l'expression génique du *CYP2E1* n'est significativement induite que dans les MA exposés à la CL_{10} et à la CL_{50} des Pt après 24, 48 et 72 h d'incubation ($p < 0,01$). L'induction significative de la transcription de ce gène par le benzène et le toluène est limitée aux temps d'incubation de 24 et 48 h ($p < 0,01$). Au contraire, le gène codant pour la protéine du *CYP2F1* n'est pas exprimé dans les MA. Les taux de transcription de l'*EHm* ne varient pas significativement quels que soient l'exposition et le temps d'incubation considérés. L'expression génique de la *NQO1* est significativement induite dans les MA 24 et 48 h après leur incubation en présence des différentes concentrations de Pd, Pt, benzène, toluène et B(a)P, ($p < 0,05$). Par contre, après 72 h d'incubation, seule l'exposition de ces cellules aux Pt à leurs CL_{10} et CL_{50} provoque une induction génique de la *NQO1* ($p < 0,05$). De plus, une induction significative de la transcription de la *GSTP1* est observée 24 et 48 h après l'incubation des cellules en présence des Pd à leurs CL_{10} et CL_{50} , des Pt à leurs CL_{10} et CL_{50} , du benzène, du toluène et du B(a)P ($p < 0,01$). Toutefois, après 72 h d'incubation, seule l'exposition aux deux concentrations de Pt provoque une induction significative de cette enzyme ($p < 0,01$). Quels que soient le temps d'incubation et l'exposition considérés, le profil d'induction génique de la *GSTM3* est similaire à celui de la *GSTP1*.

Tableau 1.

Caractéristiques des LBA des patients inclus dans le protocole.

This table shows the Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF) characteristics, total cell counts, and differential cell counts. Values are depicted as mean values and ranges (minimum value-maximum value) (LDH: Lactico-DesHydrogenase).

Paramètres	
Liquide réaspiré (mL)	150 (130-210)
Liquide réaspiré (%)	62,50 (54,17-87,50)
Protéines totales (mg/mL)	3,98 (3,00-5,00)
Nombre total de cellules ($\times 10^6$)	27,65 (22,10-37,80)
Nombre total de cellules ($\times 10^3/\text{mL}$)	185 (170-210)
Activité de la LDH (mIU/mL)	22,31 (19,76-25,89)
Activité de la LDH (mIU/mg protéine)	5,70 (5,18-6,59)
Macrophages (%)	87,50 (83,00-92,50)
Neutrophiles/Eosinophiles (%)	2,63 (0,50-5,00)
Lymphocytes (%)	9,88 (2,50-15,00)

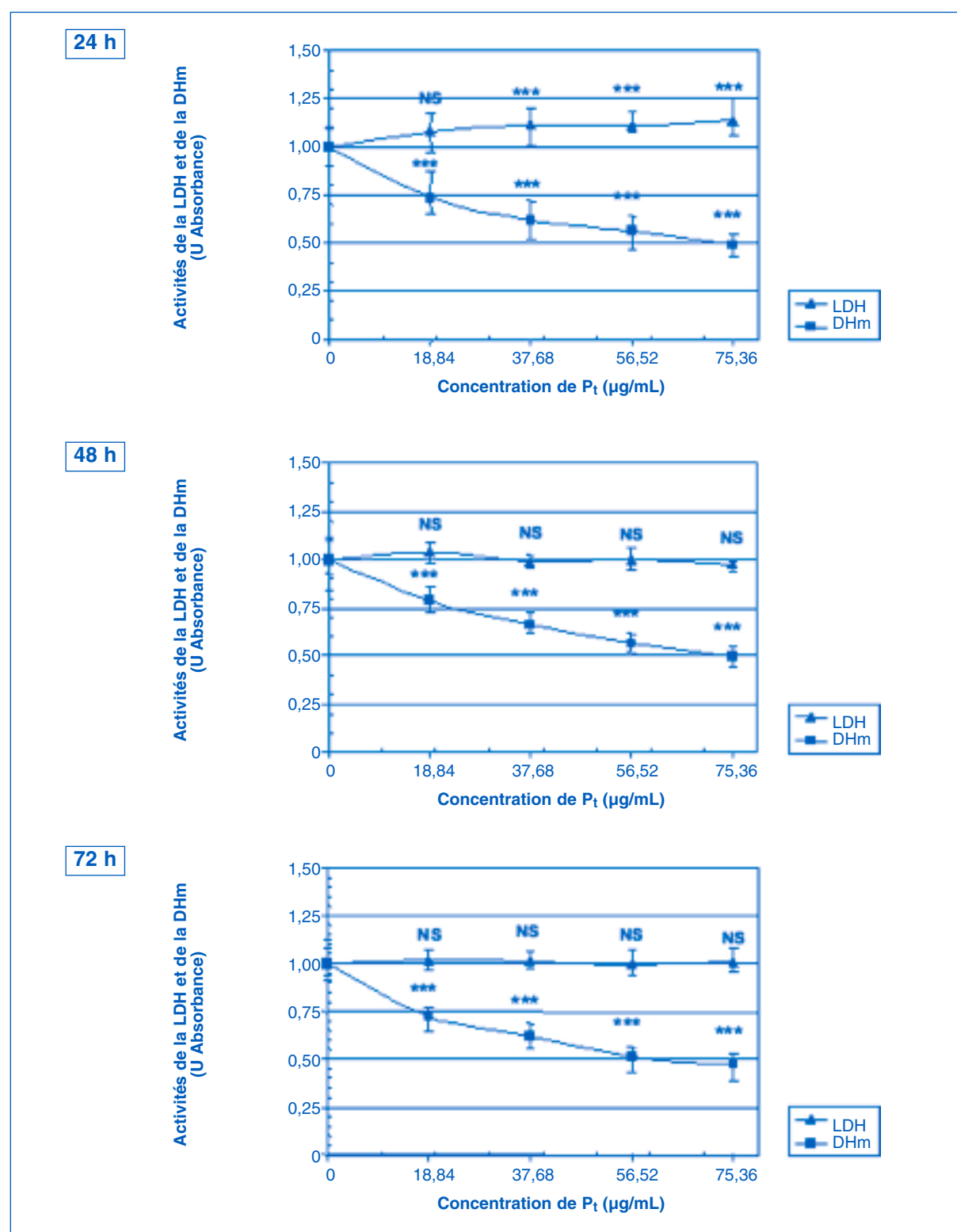


Figure 1.

Activité de la lactate déshydrogénase (LDH) extracellulaire et de la déshydrogénase mitochondriale (DHm) dans les macrophages alvéolaires exposés pendant 24, 48 ou 72 h à des concentrations croissantes de particules totales (P_t) (18,84, 37,68, 56,52 ou 75,36 $\mu\text{g/mL}$). Les résultats sont décrits par leurs moyennes et leurs valeurs minimales-maximales. (Mann-Whitney U-test ; vs témoins ; NS : Non Significatif et *** : $p < 0,001$).

Released Lactate DesHydrogenase (LDH) activity (U absorbency) in cell-free culture supernatants of Alveolar Macrophages, and Mitochondrial DesHydrogenase (MDH) activity (U of absorbency) in Alveolar Macrophages, 24, 48 or 72 h after their incubation in the continuous presence of increasing concentrations of Particle Matter (PM; 18.84, 37.68, 56.52 or 75.36 $\mu\text{g PM/mL}$) without renewing the culture media. Non exposed cells were used as negative controls. These values are depicted as mean values and ranges (minimum value-maximum value) of 16 replicates for negative controls and 8 replicates for every PM concentrations. (Mann-Whitney U-test; vs controls; NS: Not Significant and ***: $p < 0.001$).

Tableau 2.
Activation métabolique des COV et des PAH présents au sein de l'aérosol : expression génique du *CYP1A1*, du *CYP2E1* et de l'*Ehm*
Metabolic Activation of the VOC and/or PAH-Coated Onto PM: Gene Expression of *CYP1A1*, *CYP2E1*, and *Ehm*.

		EXPOSITION									
		Témoins	TiO ₂ EqCL ₁₀	TiO ₂ EqCL ₅₀	Pd EqCL ₁₀	Pd EqCL ₅₀	Pt CL ₁₀	Pt CL ₅₀	Benzène	Toluène	B(a)P
<i>CYP1A1</i>	24 h	1,01 (0,71-1,58)	0,86NS (0,85-0,88)	1,21NS (0,87-1,62)	3,48* (1,46-3,03)	4,56** (3,56-5,56)	7,45** (6,85-8,59)	34,18** (29,85-36,32)	0,78NS (0,35-0,97)	0,84NS (0,61-1,14)	40,95* (36,25-46,01)
	48 h	0,99 (0,74-1,66)	0,50NS (0,31-0,77)	0,44NS (0,24-0,63)	3,63** (3,29-4,24)	8,00** (7,25-9,01)	11,23** (9,98-12,44)	37,87** (31,40-46,39)	0,46NS (0,17-0,72)	0,53NS (0,19-0,90)	36,14** (34,60-38,02)
	72 h	1,10 (0,52-1,88)	1,33NS (1,03-1,63)	0,99NS (0,70-1,37)	1,48NS (1,28-1,63)	2,65** (2,46-2,81)	3,68** (3,00-4,47)	21,37** (18,25-23,68)	1,51NS (1,25-1,71)	1,18NS (0,88-1,47)	8,01** (7,34-8,71)
<i>CYP2E1</i>	24 h	1,02 (0,69-1,38)	1,18NS (1,02-1,29)	1,02NS (0,76-1,33)	1,04NS (0,88-1,17)	1,01NS (0,74-1,37)	9,62** (7,91-10,98)	28,46** (25,29-31,64)	13,02** (11,32-15,26)	7,70** (6,40-9,44)	0,77NS (0,45-0,95)
	48 h	0,99 (0,28-1,43)	0,81NS (0,41-1,11)	1,15NS (1,13-1,17)	0,88NS (0,80-0,98)	0,84NS (0,45-1,06)	12,62** (11,03-14,75)	33,31** (22,02-39,20)	11,27** (9,75-13,87)	7,90** (6,42-9,42)	0,95NS (0,64-1,25)
	72 h	1,07 (0,63-1,78)	0,69NS (0,35-0,97)	0,93NS (0,81-1,05)	0,97NS (0,70-1,23)	1,19NS (0,81-1,62)	3,32** (3,06-3,88)	7,49** (6,34-8,52)	0,68NS (0,42-1,09)	0,68NS (0,48-1,04)	0,75NS (0,46-1,05)
<i>Ehm</i>	24 h	1,09 (0,40-1,80)	0,82NS (0,36-1,33)	0,82NS (0,36-1,25)	1,34NS (0,44-2,60)	1,07NS (0,86-1,28)	0,97NS (0,54-1,50)	1,07NS (0,77-1,64)	1,03NS (0,34-1,67)	1,17NS (0,46-1,77)	0,93NS (0,40-1,53)
	48 h	1,12 (0,47-2,18)	0,65NS (0,47-0,94)	0,77NS (0,61-1,09)	0,99NS (0,74-1,28)	0,90NS (0,31-1,29)	0,88NS (0,33-1,22)	0,84NS (0,75-0,93)	0,66NS (0,40-0,94)	0,56NS (0,18-1,24)	0,76NS (0,54-0,94)
	72 h	1,06 (0,49-1,47)	0,72NS (0,47-0,93)	0,37NS (0,30-0,42)	1,20NS (0,66-1,96)	0,94NS (0,88-1,01)	1,11NS (0,52-1,69)	0,64NS (0,49-0,84)	1,37NS (1,04-1,56)	1,31NS (0,75-1,84)	1,27NS (0,96-1,69)

Expressions géniques du cytochrome P450 (*CYP*) 1A1, du *CYP2E1*, et de l'époxycyde hydrolase (*Ehm*) dans les cultures primaires de Macrophages Alvéolaires (MA) 24, 48 ou 72 h après leur exposition. Les MA exposés au TiO₂ ou aux Particules désorbées (Pd) à des concentrations équivalentes aux Concentrations Létales (CL) à 10 % (EqCL₁₀ = 12,22 µg/mL) ou à 50 % (EqCL₅₀ = 61,11 µg/mL), ont servi de contrôles négatifs. D'autres MA ont été exposés aux Particules totales (Pt) à leur CL₁₀ (i.e. 14,93 µg/mL) ou CL₅₀ (i.e. 74,63 µg/mL). Les MA exposés au benzène (7 µM), toluène (7 µM), et au benzo(a)pyrene (B(a)P; 1 µM) ont servi de contrôles positifs. Les résultats ont été décrits par leurs moyennes et leurs valeurs minimales-maximales. (Mann-Whitney U-test; vs témoins.
NS : Non Significatif. *: p < 0,05. **: p < 0,01).

Gene expressions of cytochrome P450 (*CYP*) 1A1 and *CYP2E1*, and microsomal Epoxide Hydrolase (mEH) (fold-induction vs controls) in primary cultures of alveolar macrophages (AM) 24, 48 or 72 h after their exposure. AM exposed to TiO₂ or desorbed Particulate Matter (dPM) at equivalent concentrations to inorganic LC₁₀ (Eq LC₁₀ = 12,22 µg PM/mL) or LC₅₀ (Eq LC₅₀ = 61,11 µg PM/mL), integrating weight losses due to the organic desorption, were used as negative controls. Other AM were exposed to Particulate Matter (PM) at their LC₁₀ (i.e. 14,93 µg PM/mL) or LC₅₀ (i.e. 74,63 µg PM/mL). AM exposed to benzene (7 µM), toluene (7 µM), and benzo(a)pyrene (B(a)P; 1 µM) served as positive controls for the induction of the gene expression of Volatile Organic Compounds (VOC) and/or Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH)-metabolizing enzymes. These values are depicted as mean values and ranges (minimum value-maximum value) of 8 replicates for negative controls, PM exposures, and positive controls (Mann-Whitney U-test; vs controls.
NS: Not Significant. *: p < 0,05. **: p < 0,01).

Tableau 3.
Activation métabolique des COV et des PAH présents au sein de l'aérosol : expression génique de la *NQO1*, de la *GSTP1* et de la *GSTM3*.
Metabolic Activation of the VOC and/or PAH-Coated Onto PM: Gene Expression of *NQO1*, *GSTP1*, and *GSTM3*.

		EXPOSITION										B(a)P
		Témoins	TiO ₂ EqCL ₁₀	TiO ₂ EqCL ₅₀	Pd EqCL ₁₀	Pd EqCL ₅₀	Pt CL ₁₀	Pt CL ₅₀	Benzène	Toluène		
NQO1	24 h	0,62 (0,26-0,90)	0,45NS (0,24-0,58)	0,72NS (0,46-0,89)	1,69** (1,36-2,03)	2,72** (1,74-3,26)	4,92** (3,38-7,28)	12,31** (10,95-13,64)	3,38** (3,09-3,82)	4,20** (3,04-6,36)	4,15** (3,26-4,77)	
	48 h	1,04 (0,66-1,48)	1,02NS (0,96-1,07)	0,64NS (0,29-1,23)	2,64** (2,18-3,07)	4,90** (4,58-5,66)	5,41** (4,89-5,79)	20,28** (17,90-22,65)	4,08** (3,29-5,61)	3,82** (3,06-4,29)	3,85** (3,43-4,29)	
	72 h	1,34 (1,05-1,51)	0,90NS (0,50-1,18)	0,91NS (0,69-1,48)	0,94NS (0,81-1,10)	1,35NS (0,97-1,99)	1,96* (1,70-2,46)	4,48** (3,75-4,91)	1,058NS (0,74-1,42)	1,349NS (1,09-1,60)	2,39* (1,98-2,73)	
GSTP1	24 h	0,72 (0,47-0,96)	0,81NS (0,34-1,35)	0,76NS (0,57-0,98)	1,52** (1,22-1,80)	2,34** (2,01-3,24)	4,54** (3,15-5,13)	11,19** (7,51-14,79)	4,27** (4,07-4,43)	5,44** (4,67-6,40)	6,02** (4,15-7,52)	
	48 h	1,05 (0,86-1,30)	0,70NS (0,52-0,90)	0,99NS (0,76-1,31)	1,98** (1,63-2,18)	2,97** (2,46-3,69)	3,85** (3,15-4,64)	9,85** (8,17-11,74)	4,58** (3,61-6,09)	4,93** (4,19-5,60)	5,91** (5,41-6,38)	
	72 h	0,87 (0,50-1,26)	0,75NS (0,63-1,05)	0,63NS (0,35-0,99)	0,84NS (0,57-1,45)	0,93NS (0,65-1,66)	2,19** (2-2,31)	7,70** (6,04-9,78)	1,19NS (0,66-1,81)	1,18NS (0,92-1,47)	3,84** (3,38-4,26)	
GSTM3	24 h	0,96 (0,68-1,22)	0,90NS (0,86-0,95)	1,28NS (1,01-1,60)	1,41* (1,25-1,70)	2,54** (1,94-3,24)	2,10** (1,75-2,91)	7,02** (6,93-7,13)	3,44** (2,49-3,92)	3,77** (3,39-4,44)	3,41** (3,01-3,55)	
	48 h	0,84 (0,32-1,35)	1,30NS (1,26-1,37)	1,37NS (1,13-1,67)	1,96** (1,68-2,31)	2,63** (2,47-2,85)	3,42** (2,90-3,75)	8,77** (7,36-10,08)	4,75** (3,89-4,94)	4,33** (3,54-5,28)	4,94** (4,52-6,02)	
	72 h	1,30 (0,83-1,85)	1,00NS (0,80-1,28)	1,43NS (1,33-1,54)	1,14NS (0,91-1,24)	1,35NS (1,11-1,59)	2,19* (1,87-2,52)	4,62* (4,23-4,90)	1,00NS (0,89-1,17)	1,21NS (0,90-1,50)	2,70* (2,31-2,88)	

Expressions géniques de la NADPH quinone oxydo-réductase-1 (*NQO1*) et de la glutathion S-transférase (*GSTP1*) et *GSTM3* dans les cultures primaires de Macrophages Alvéolaires (MA) 24, 48 ou 72 h après leur exposition. Les MA exposés au TiO₂ ou aux Particules désorbées (Pd) à des concentrations équivalentes aux Concentrations Létales (CL) à 10 % (EqCL₁₀ = 12,22 µg/mL) ou à 50 % (EqCL₅₀ = 61,11 µg/mL), ont servi de contrôles négatifs. D'autres MA ont été exposés aux Particules totales (Pt) à leur CL₁₀ (i.e. 14,93 µg/mL) ou CL₅₀ (i.e. 74,63 µg/mL). Les MA exposés au benzène (7 µM), toluène (7 µM), et au benzo(a)pyrene (B(a)P; 1 µM) ont servi de contrôles positifs. Les résultats ont été décrits par leurs moyennes et leurs valeurs minimales-maximales. (Mann-Whitney U-test ; vs témoins. * p < 0,05. ** p < 0,01).

Gene expressions of the NADPH quinone oxydo-reductase-1 (*NQO1*), glutathione S-transférase-pi 1 (*GSTP1*), and glutathione S-transférase-mu 3 (*GSTM3*) (fold-induction vs controls) in primary cultures of alveolar macrophages (AM) 24, 48 or 72 h after their exposure. AM exposed to TiO₂ or desorbed Particulate Matter (dPM) at equivalent concentrations to inorganic LC₁₀ (Eq LC₁₀ = 12,22 µg PM/mL) or LC₅₀ (Eq LC₅₀ = 61,11 µg PM/mL), integrating weight losses due to the organic desorption, were used as negative controls. Other AM were exposed to Particulate Matter (PM) at their LC₁₀ (i.e. 14,93 µg PM/mL) or LC₅₀ (i.e. 74,63 µg PM/mL). AM exposed to benzene (7 µM), toluene (7 µM), and benzo(a)pyrene (B(a)P; 1 µM) served as positive controls for the induction of the gene expression of Volatile Organic Compounds (VOC) and/or Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH)-metabolizing enzymes. These values are depicted as mean values and ranges (minimum value-maximum value) of 8 replicates for controls (Témoins), and 4 replicates for negative controls, PM exposures, and positive controls (Mann-Whitney U-test; vs controls. * p < 0.05. ** p < 0.01).

4. Discussion

Afin d'améliorer la connaissance quant aux mécanismes sous-jacents impliqués dans la cytotoxicité des aérosols, nous nous sommes intéressés à l'expression génique des enzymes de biotransformation des COV et des HAP dans des cultures primaires de MA isolés à partir de BAL.

Jusqu'à présent, les mécanismes de cytotoxicité des aérosols étaient surtout étudiés dans des cellules A549 [7] (cf. Billet *et al.*, dans ce numéro). Toutefois, l'utilisation de cellules humaines isolées à partir d'un tissu pulmonaire permettrait de reproduire les conditions plus proches de la situation *in vivo* et de mieux étudier les phénomènes qui s'y passent. La réalisation d'un tel modèle *in vitro* soulève la difficulté d'isoler et de cultiver des cellules humaines pulmonaires fonctionnelles. Dans ce contexte, des LBA ont été réalisés chez des patients conformément aux recommandations internationales [15]. La fibroscopie bronchique et le LBA, réalisés sans complication, ont permis de recueillir un volume satisfaisant (> 50 % du volume initial injecté) et d'isoler un nombre suffisant de MA humains. La bonne réalisation du LBA a aussi été confirmée par la faible variabilité des caractéristiques des LBA et la faible contamination (< 2 %) du matériel cellulaire. La viabilité cellulaire, évaluée par une coloration au bleu trypan et l'activité de la LDH dans le LBA, était en accord avec les standards en vigueur [16]. Ces résultats valident les procédures de LBA et l'utilisation des MA humains pour évaluer la cytotoxicité d'aérosols anthropogéniques.

Les variations significatives de l'activité de la LDH après une exposition de 24 h à des concentrations croissantes de Pt ont indiqué une altération précoce de l'intégrité de la membrane cellulaire et/ou de sa perméabilité. Aucune modification significative de l'activité de la LDH n'a été observée pour des expositions supérieures à 24 h ; ceci était probablement dû au pouvoir de phagocytose des MA. Après 24, 48 et 72 h d'exposition aux Pt, nous avons noté une diminution concentration-dépendante de l'activité de la DHm chez les MA humains, suggérant une altération du métabolisme mitochondrial. En nous référant aux variations moyennes des activités de la DHm, nous avons ainsi pu calculer leurs CL₁₀ et CL₅₀ : 14,93 µg/mL et 74,63 µg/mL, respectivement. Garçon *et al.* (2006) et Billet *et al.* (2007) ont étudié la cytotoxicité de ces aérosols dans des cellules embryonnaires dérivées de l'épithélium pulmonaire humain (L132) et dans des cellules épithéliales dérivées d'un carcinome pulmonaire (A549). Les valeurs des CL qu'ils ont rapportées étaient supérieures à celles observées dans les MA (i.e. L132 : CL₁₀ = 18,84 µg/mL et CL₅₀ = 75,36 µg/mL ; A549 : CL₁₀ = 23,72 µg/mL et CL₅₀ = 118,60 µg/mL) [2, 17]. Ces différences seraient dues aux origines différentes des cellules (normales vs carcinomateuses, lignées cellulaires vs cultures primaires). Nos résultats révèlent que les MA humains isolés à partir de BAL constituent un modèle *in vitro* de cellules pulmonaires très sensible aux polluants atmosphériques.

Nos résultats ont montré une induction significative de la transcription des gènes codant pour les CYP1A1 et le CYP2E1 suite à l'exposition des MA aux Pt. En outre, la transcription du CYP1A1 induite dans les MA humains exposés aux Pd, ont indiqué que la désorption thermique, sous vide secondaire, était insuffisante pour éliminer la totalité des HAP. Cependant, la désorption thermique a permis une meilleure élimination des COV adsorbés à la surface des Pt, évitant ainsi l'induction du CYP2E1 par les particules désorbées. Par ailleurs, le CYP2F1 n'était pas exprimé dans notre modèle cellulaire.

Les CYP1A1 et CYP2E1 catalysent respectivement l'oxydation des COV et HAP en époxydes, qui peuvent être convertis en diols, puis en catéchols et enfin en dérivés de quinone. Nous n'avons pas observé de variations significatives de l'expression génique de l'Ehm alors que l'expression génique de la NQO1 était induite par les Pd, les Pt, le benzène, le toluène ou le B(a)P. Les époxydes dérivés de l'activation métabolique des composés chimiques organiques sont combinés par les isoenzymes GSTP1, et GSTM3 [18]. Dans le poumon humain, la GSTP1 est plus active que la GSTM1 et la GSTM3, alors que la GSTT1 n'est pas exprimée [19-21]. Les expositions des cultures primaires de MA humains isolés aux Pd, aux Pt ou aux contrôles positifs ont induit l'expression génique des GSTP1 et GSTM3.

Il est important de souligner que l'expression génique du CYP2E1 dans les cultures primaires de MA exposées aux Pt persistait à 72 h, alors qu'une telle induction est restreinte voire absente 48 h après l'exposition des cultures primaires de MA au benzène ou au toluène. Ces résultats suggèrent ainsi le rôle des particules en tant que vecteur physique, favorisant la pénétration et la rétention intracellulaire des COV, ceux-ci étant alors capables d'exercer une induction génique prolongée.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats nous a permis de montrer que la fraction organique des aérosols, cocktail très hétérogène et très complexe de diverses substances organiques le plus souvent présentes à des doses relativement faibles, était capable d'induire l'expression génique des enzymes des phases I et II de l'activation métabolique pulmonaire des COV et des HAP. En outre, nos observations ont aussi mis en exergue le rôle de vecteur de pénétration et de rétention pulmonaires joué par la fraction particulaire, qui accroît donc la présence des substances organiques telles que les HAP et les COV à proximité de leurs cibles cellulaires et moléculaires, et par là même leur toxicité pulmonaire. Par ailleurs, ces nouveaux résultats ont montré quelques différences entre l'expression génique des enzymes de l'activation métabolique des COV et/ou des HAP dans des lignées cellulaires vs des cultures primaires de MA humains isolés à partir d'un LBA. L'utilisation de ce modèle de cultures primaires de MA humains pourrait contribuer à améliorer la connaissance des mécanismes impliqués dans la cytotoxicité des polluants atmosphériques.

Remerciements

Nous remercions M.-F. Dhaine du Service de pneumologie, Hôpital Saint-Philibert, Lille (France) pour son assistance technique dans la réalisation des lavages bronchiolo-alvéolaires. Le Laboratoire de recherche en toxicologie industrielle et environnementale (LCE-EA2598) participe à l'Institut de

recherches en environnement industriel (IRENI), qui est financé par la Région Nord-Pas-de-Calais, le ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche, et des fonds européens (FEDER). La recherche décrite dans cet article a été subventionnée par le ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche (Convention n° 6848-2005), et *via* une allocation de recherche de la Région Nord-Pas-de-Calais (Convention n° 08070005).

Références

1. Brunekreef B, Holgate S. Air pollution and health. *Lancet* 2002 ; 360 : 1233-42.
2. Billet S, Garçon G, Dagher Z *et al.* Ambient particulate matter (PM_{2.5}): physicochemical characterization and metabolic activation of the organic fraction in human lung epithelial cells (A549). *Environ Res* 2007 ; 105 : 212-23.
3. Baulig A, Poirault JJ, Ausset P *et al.* Physicochemical characteristics and biological activities of seasonal atmospheric particulate matter sampling in two locations of Paris. *Environ Sci Technol* 2004 ; 38 : 5985-92.
4. Diociaiuti M, Balduzzi M, De Berardis B *et al.* The two PM_(2.5) and PM_(2.5-10) coarse fractions: evidence of different biological activity. *Environ Res* 2001 ; 86 : 254-62.
5. Liden J, Ek A, Palmberg L, Okret S, Larsson K. Organic dust activates NF- κ B in lung epithelial cells. *Respir Med* 2003 ; 97 : 882-92.
6. Hukkanen J, Pelkonen O, Hakkola J, Raunio H. Expression and regulation of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 (CYP) enzymes in human lung. *Crit Rev Toxicol* 2002 ; 32 : 391-411.
7. Castell JV, Donato MT, Gomez-Lechon MJ. Metabolism and bioactivation of toxicants in the lung. The in vitro cellular approach. *Exp Toxicol Pathol* 2005 ; 57 : 89-204.
8. Hukkanen J, Hakkola J, Anttila S *et al.* Detection of mRNA encoding xenobiotic-metabolizing cytochrome P450s in human bronchoalveolar macrophages and peripheral blood lymphocytes. *Mol Carcinogen* 1997 ; 20 : 224-30.
9. Dahl AR, Lewis JL. Respiratory tract uptake of inhalants and metabolism of xenobiotics. *Annu Rev Pharmacol* 1993 ; 33 : 383-407.
10. Spivack SD, Hurteau GJ, Fasco MJ, Kaminsky LS. Phase I and II Carcinogen Metabolism Gene Expression in Human Lung Tissue and Tumors. *Clin Cancer Res* 2005 ; 9 : 6002-11.
11. Garçon G, Gosset P, Maunit B, Casset A, Hannotiaux MH, Muller JF, Shirali P. Mécanismes cellulaires de la synergie d'action de polluants atmosphériques (Fe(2)O(3) et HPA) dans l'apparition du cancer broncho-pulmonaire. *Revue Française des Laboratoires* 2003 ; 349 : 59-68.
12. Bauer AK, Faiola B, Abernethy DJ *et al.* Genetic susceptibility to benzene-induced toxicity: role of NADPH: quinone oxidoreductase-1. *Cancer Res* 2003 ; 63 : 929-35.
13. Koop DR, Laethem CL, Schnier GG. Identification of ethanol-inducible P450 isozyme 3a (P450IIE1) as a benzene and phenol hydroxylase. *Toxicol Appl Pharmacol* 1989 ; 98 : 278-88.
14. Hayes JD, Pulford DJ. 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* 1995 ; 30 : 445-600.
15. Baughman RP, Rennard SI. Bronchoalveolar lavage: general approaches to correct for variability of dilution and lung permeability. *Eur Respir Rev* 1999 ; 9 : 28-31.
16. Drent M, Cobben NAM, Henderson RF, Schmitz MPJ, van Diejen-Visser MP. Measurement of markers of cell damage of death in bronchoalveolar lavage fluid. *Eur Respir Rev* 1999 ; 9 : 141-4.
17. Garçon G, Dagher Z, Zerimech F *et al.* Dunkerque city air pollution particulate matter-induced cytotoxicity, oxidative stress and inflammation in human epithelial lung cells (L132) in culture. *Toxicol In Vitro* 2006 ; 20 : 519-28.
18. Macé K, Bowman ED, Vautravers P *et al.* Characterisation of Xenobiotic-metabolising Enzyme Expression in Human Bronchial Mucosa and Peripheral Lung Tissues. *Eur J Cancer*. 1998 ; 34 : 914-20.
19. Rossi AM, Guarnieri C, Rovesti S *et al.* Genetic polymorphisms influence variability in benzene metabolism in humans. *Pharmacogenetics* 1999 ; 9 : 445-51.
20. Thier R, Bruning T, Roos PH *et al.* Markers of genetic susceptibility in human environmental hygiene and toxicology: the role of selected CYP, NAT and GST genes. *Int J Hyg Environ Health* 2003 ; 206 : 149-71.
21. Thum T, Erpenbeck VJ, Moeller J *et al.* Expression of xenobiotic metabolizing enzymes in different lung compartments of smokers and nonsmokers. *Environ Health Perspect* 2006 ; 114 : 1655-61.