

Génotoxicité comparée de particules atmosphériques PM_{2.5} en fonction de leur origine industrielle, urbaine ou rurale

Comparative genotoxicity of airborne particulate matter PM_{2.5} collected under industrial, urban or rural influence

C. Lepers¹, S. Billet¹, M. Dergham¹, P. Gosset^{1,2}, A. Verdin¹,
G. Garçon¹, D. Pottier³, D. Pottier³, P. Shirali¹, F. Sichel³

Résumé

L'exposition chronique aux particules atmosphériques fines (*Particulate Matter*, PM_{2.5}) constitue une cause de mortalité par cancer broncho-pulmonaire. Cependant, peu d'études se sont focalisées sur la relation entre la composition chimique des particules et leur potentiel cancérigène. Afin d'apporter des éléments de réponse à cette question, notre travail a consisté en l'étude toxicologique d'échantillons de PM_{2.5}, en lien avec leurs caractéristiques physico-chimiques. Nous nous sommes ainsi intéressés à l'induction d'enzymes participant à l'activation métabolique des composés organiques, puis à la recherche d'effets génotoxiques. Six échantillons de PM_{2.5} ont été prélevés sous trois influences (industrielle, urbaine ou rurale) et au cours de deux périodes (printemps-été et automne-hiver). Ils ont ensuite fait l'objet d'une caractérisation physique (i.e. granulométrie et surface spécifique), chimique (e.g. composition en Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques – HAP – et métaux) et biologique (i.e. fractions bactérienne et fongique) approfondies. Les PM_{2.5} ont été testées pour leur capacité à induire des mutations à l'aide du test d'Ames, sur trois souches de *Salmonella typhimurium* (TA102, TA98, YG1041). Nous avons complété ce volet toxicologique *in vitro* par l'utilisation d'une lignée de cellules épithéliales bronchiques humaines d'origine normale (cellules BEAS-2B). Après 72 h d'exposition aux PM_{2.5}, nous avons étudié l'expression génique et l'activité catalytique du CYP1A1, une enzyme impliquée dans l'activation des HAP en métabolites réactifs à l'encontre des macromolécules cellulaires. La génotoxicité des particules a ensuite été évaluée par 3 méthodes complémentaires : le post-marquage au ³²P, le test des comètes et le test des micronoyaux. Les résultats obtenus par le test d'Ames ont montré une mutagenicité significative de l'ensemble des échantillons de PM_{2.5}. Ces mutations impliqueraient majoritairement des composés nitro-aromatiques et, dans une moindre mesure, la matrice des particules selon un mécanisme qui reste à décrypter. Le post-marquage au ³²P a ensuite permis de détecter la formation d'adduits encombrants, probablement mais non exclusivement liés à la présence de HAP. Le test des comètes a, quant à lui, révélé la présence de lésions au sein de ce même ADN. Enfin, le test des micronoyaux a mis en évidence une augmentation dose-dépendante du nombre de cassures chromosomiques et/ou du taux de séparation anormal des chromosomes lors de la division cellulaire. Les altérations mises en évidence semblent liées à la fois à la présence de composés organiques et à la fraction inorganique des particules. Notre étude apporte ainsi des éléments de réponse quant aux mécanismes impliqués dans la toxicité des PM_{2.5}.

Mots-clés

pollution atmosphérique, PM_{2.5}, mutagenicité, génotoxicité, BEAS-2B

(1) EA4492, Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant, ULCO, Dunkerque

(2) Laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Groupe Hospitalier de l'Institut Catholique de Lille, Lille

(3) EA4651, Aliments Bioprocédés Toxicologie Environnements, Université de Caen Basse-Normandie, Caen

Groupe Régional d'Études sur le Cancer, Centre François Baclesse, Caen

Abstract

Numerous epidemiological studies have demonstrated a positive correlation between an elevation of *Particulate Matter* (PM) concentration in ambient air and both mortality and morbidity by cardio-pulmonary diseases. However, mechanism by which PM composition is linked to toxic effects is still unclear. In this context, the present work consisted in an assessment of the metabolic activation of organic fraction and the genotoxic potential of PM_{2.5} samples collected in Dunkerque city, a French seaside city characterized by intense industrial activity and heavy motor vehicle traffic. 6 PM_{2.5} samples were collected either under industrial, urban or rural influence, during spring and summer 2008 or autumn and winter 2008-2009. Each of these samples was subjected to an extensive physical (i.e. size distribution, specific area) and chemical characterization (i.e. determination of content in polycyclic aromatic hydrocarbons, polychloro-dibenzo-p-dioxins/furans, polychlorobiphenyls, and metals). Toxicological evaluation subsequently was carried out *in vitro* on the metabolically competent BEAS-2B cell line. Metabolic activation of PM_{2.5} organic fraction was evaluated through the analysis of CYP1A1 induction and CYP1A1 activity, whereas PM genotoxic potential was studied using four complementary methods: Ames test on 3 *Salmonella typhimurium* tester strains (TA98, TA102, and YG1041), ³²P post-labelling of bulky DNA-adducts, comet assay, and micronucleus formation assay. Ames test revealed a significant mutagenicity of all PM_{2.5} samples, especially on the YG1041 tester strain which is sensitive to nitro-aromatic compounds. Secondly, CYP1A1 gene induction and activity studies showed a strong induction of this enzyme following exposure to PM samples. ³²P post-labeling method revealed bulky DNA adducts formation that seemed to be partially linked to polycyclic aromatic hydrocarbons. Furthermore, comet assay demonstrated DNA breakage formation in exposed cells. Finally, micronucleus assay showed an increase in abnormal segregation and/or chromosome breakage after cells' exposure to PM_{2.5} samples. Genotoxic alterations revealed in this study seem to be linked to both organic and inorganic fractions of PM_{2.5}, whatever the sampling site and period. Altogether, these results give answers about physiological mechanisms that may be involved in PM_{2.5} genotoxic effects.

Keywords

air pollution, PM_{2.5}, mutagenicity, genotoxicity, BEAS-2B

Introduction

Au sein de son environnement, l'homme est exposé en permanence à une multitude de polluants. Les conséquences délétères que peuvent avoir ces molécules sur les organismes sont notamment conditionnées par leurs propriétés physico-chimiques, la voie par laquelle les individus sont exposés (orale, cutanée ou respiratoire) ou encore l'état physiologique de ces mêmes individus (âge, pathologies, susceptibilité génétique). Ces effets toxiques sont divers et dépendent non seulement de la cible du xénobiotique au niveau des organes, des cellules ou des molécules biologiques, mais aussi de la dose du polluant qui atteint effectivement cette cible.

Parmi la diversité des polluants présents au niveau atmosphérique, de nombreuses études épidémiologiques ont mis en évidence une corrélation entre une élévation du niveau de particules en suspension et l'accroissement de la morbidité et de la mortalité par maladies respiratoires et cardio-vasculaires [1].

La granulométrie des particules inhalées est un paramètre primordial, car elle conditionne en grande partie leur répartition le long de l'arbre respiratoire. Ainsi, environ 20 % des particules fines (PM_{2.5}) sont capables de pénétrer jusqu'aux alvéoles, entraînant avec elles les composés adsorbés potentiellement toxiques [2], [3]. La composition chimique des particules est l'un des autres éléments déterminants de leur caractère toxique. En effet, un aérosol atmosphé-

rique particulière est un mélange complexe de molécules inorganiques et organiques. D'un point de vue global, les espèces majoritairement retrouvées sont les ions sulfate, nitrate et ammonium, des dérivés chlorés, des espèces carbonées organiques et inorganiques, ainsi que des éléments terrigènes et biogènes. À ces espèces prépondérantes s'ajoutent des éléments à l'état de traces, tels que les métaux ou les dioxines [4]. Les activités humaines sont responsables du rejet d'un grand nombre de composés organiques, tels que des Composés Organiques Volatils (COV) et des polluants organiques persistants, tels que les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP), les PolyChloroDibenzo-*p*-Dioxines (PCDD), les PolyChloroDibenzo-Furanes (PCDF), ou encore les PolyChloroBiphényles (PCB). Ainsi, la variabilité locale dans la composition des particules atmosphériques est principalement influencée par les sources d'émission présentes. À titre d'exemple, les PM_{2.5} prélevées à Dunkerque, ville regroupant de nombreuses industries sidérurgiques et métallurgiques, sont caractérisées par une forte proportion de métaux (environ 10 % de la masse totale des PM_{2.5}).

Certains des xénobiotiques chimiques qui composent les particules atmosphériques sont hydrophobes et doivent donc être biotransformés en métabolites plus hydrosolubles afin d'être excrétés par l'organisme humain. La métabolisation des xénobiotiques est réalisée par différents systèmes enzymatiques, répartis en enzymes de phase I, II et III, permettant respectivement la fonctionnalisation, la

conjugaison et l'élimination du xénobiotique. Bien que la biotransformation de ces molécules ait pour objectif de permettre leur inactivation et leur excrétion, un phénomène de bioactivation peut avoir lieu, majoritairement sous l'action des enzymes de phase I. Certains métabolites produits sont électrophiles et susceptibles d'interagir avec différentes macromolécules intracellulaires telles que l'ADN, les protéines, ou encore les lipides [5]. Considérant les conséquences délétères de certains xénobiotiques sur le génome, 75 % des molécules cancérogènes seraient en réalité les produits d'une activation métabolique de composés pro-cancérogènes [6], comme c'est le cas pour le Benzo[a]Pyrène (B[a]P), transformé en cancérogène ultime, le Benzo[a]Pyrène-Diol-Epoxyde (BPDE), par les Cytochromes P450 (CYP) de la famille 1A [7]. Cependant, d'autres composés ne nécessitent pas d'être activés par les systèmes enzymatiques pour exercer leurs effets toxiques sur l'ADN.

Les atteintes génotoxiques par les xénobiotiques peuvent être différenciées selon leur interaction directe ou non avec l'ADN. Ainsi, un effet direct peut se traduire par la formation d'adduits, de pontages inter- ou intra-caténaires, de coupures simple ou double brin, ainsi que par la modification de bases ou des intercalations. À l'inverse, des atteintes indirectes peuvent avoir lieu par une action sur la mitose, le cycle cellulaire ou les systèmes enzymatiques de réparation de l'ADN, tels que les topoisomérases [8]. Selon l'intensité des dommages subis, la cellule pourra entrer en apoptose, mourir par nécrose ou survivre, en ayant réparé ou non ces altérations. Les modifications de la structure de l'ADN vont pouvoir, si elles ne sont pas réparées ou si la réparation est erronée, conduire à l'apparition de mutations lors de la réplication de l'ADN. Si des lésions stables du génome persistent, un processus de cancérogenèse pourra éventuellement être initié.

Lors de la dernière décennie, l'activité de recherche s'est intensifiée pour tenter d'élucider les mécanismes par lesquels s'exerce la toxicité des polluants atmosphériques. Cependant, l'association entre les caractéristiques physico-chimiques et la toxicité des particules atmosphériques reste mal connue. En s'intéressant plus particulièrement à la question du potentiel cancérogène des $PM_{2.5}$, il semble fondamental d'évaluer au préalable les effets génotoxiques que ces particules fines peuvent engendrer, que ce soit au niveau de lésions primaires, de mutations ou d'altérations de la structure des chromosomes.

Dans ce contexte, des prélèvements de particules fines ($PM_{2.5}$) ont été réalisés sous influence urbaine, industrielle et rurale, à l'aide d'impacteurs en cascade. La ville de Dunkerque, agglomération située à l'extrême nord de la France, est caractérisée par la

présence d'un complexe industriel regroupant essentiellement des activités de sidérurgie, métallurgie, chimie et pétrochimie, de même qu'un centre de valorisation énergétique en périphérie de la zone urbaine. Deux axes autoroutiers très fréquentés (A16 et A25) desservent l'agglomération, au sein de laquelle se situe la zone portuaire. L'existence de ces différents sites et activités conditionne fortement la composition chimique et donc la toxicité des particules atmosphériques présentes. Afin de mieux évaluer l'importance des sources de pollution, des $PM_{2.5}$ ont été collectées sous trois influences (industrielle, urbaine ou rurale), et au cours de deux campagnes (printemps-été 2008 et automne-hiver 2008-2009), permettant l'étude des variations saisonnières.

L'objectif de notre travail a été de tester la capacité des $PM_{2.5}$ à induire des mutations dans un modèle procaryote, puis d'étudier *in vitro* sur une lignée de cellules épithéliales bronchiques humaines d'origine normale (cellules BEAS-2B), l'expression génique et l'activité catalytique du CYP1A1 et d'évaluer la génotoxicité des particules par trois méthodes complémentaires (post-marquage au ^{32}P , test des comètes et test des micronoyaux), par une approche originale d'exposition directe des cellules aux particules natives.

1. Matériels et méthodes

1.1 Réactifs

Le DiMéthylSulfOxyde (DMSO) ($\geq 99,9\%$), le Triton X-100, l'hydroxyde de sodium (BioUltra 10 M), le Bromure d'ETHidium (BET), l'agarose, l'agarose *low melting point*, la polyvinylpyrrolidone, le sodium lauryl sarcosinate, le glucose, l'histidine, la biotine et le B[a]P, proviennent de Sigma-Aldrich (St-Quentin Fallavier, France). La trypsine (0,5 % EDTA), l'amphotéricine B et le tampon phosphate ont été fournis par Invitrogen-Life Technologies (Cergy-Pontoise, France). Le chlorure de sodium et l'hydroxyde de sodium anhydre proviennent de Carlo Erba Réactifs (Val-de-Reuil, France). Le S9 induit par l'Aroclor1254 a été fourni par Trinova Biochem (Giessen, Allemagne). Le tris-hydroxyméthyl-aminométhane (Tris) et l'Acide Ethylène-Diamine-Tétraacétique (EDTA) proviennent d'Acros Organics (Noisy-le-Grand, France).

1.2 Matériel chimique

1.2.1 Collecte des $PM_{2.5}$

Les prélèvements ont été réalisés sur deux sites distincts. Le premier, situé au niveau de la zone portuaire de Dunkerque (51,0350° N ; 2,3659° E), permet, grâce à un asservissement selon la direction

des vents, un échantillonnage sous influence urbaine (secteur : 60° à 225°) ou industrielle (secteur : 240° à 325°). Le second site, où ont été réalisés les prélèvements du bruit de fond rural, est situé à Rubrouck (50,8392° N ; 2,3542° E), soit à l'intérieur des terres 30 km plus au sud. La collecte des PM_{2.5} a été effectuée à l'aide d'impacteurs en cascade de type Sierra 235 (Sierra Anderson, Smyrna, USA), comportant 5 étages, et d'une pompe aspirante grand volume (80 m³/h) modèle TFIA (Staplex, New York, USA). Le recueil régulier des particules a été effectué par grattage des surfaces d'impaction, avant conservation à -20°C.

1.2.2 Notation

Afin de faciliter la lecture, une notation abrégée est adoptée pour désigner chacun des échantillons atmosphériques, reprenant tout d'abord la campagne de prélèvement soit (1) pour la campagne printemps-été et (2) pour la campagne automne-hiver. La lettre associée désigne quant à elle le site de prélèvement, à savoir (R) pour le site sous influence rurale, (U) sous influence urbaine et (I) pour le site influencé par la zone industrielle. Enfin, la lettre (T) désigne les cellules non exposées.

1.2.3 Physico-chimie des PM_{2.5}

La granulométrie des prélèvements a été étudiée par microscopie électronique à balayage. La surface spécifique des particules a été déterminée par porosimétrie à azote, selon la théorie Brunauer, Emmet et Teller (BET). L'analyse chimique totale a permis de déterminer la composition en métaux et métalloïdes par spectroscopie atomique à l'aide d'un Plasma Inductif couplée à un Spectromètre de Masse (ICP-MS) et en composés organiques par Chromatographie en phase Gazeuse couplée à un Spectromètre de Masse (GC-MS), après extractions des composés lourds par la méthode Soxhlet. Enfin, les HAP chlorés (PCDD/F et PCB) ont été analysés par Chromatographie en phase Gazeuse Haute Résolution couplée à un Spectromètre de Masse Haute Résolution (HRGC/HRMS), après extraction et purification par chromatographie liquide. Les propriétés des différents échantillons de PM_{2.5} sont reprises dans le Tableau I.

1.3 Matériel biologique

1.3.1 Souches de *Salmonella typhimurium*

Le test d'Ames a été conduit sur trois souches de *Salmonella typhimurium* (TA98, TA102 et

YG1041). Les caractéristiques et la sensibilité de ces trois souches permettent de distinguer la contribution relative des différentes familles de composés chimiques dans la mutagénicité des particules.

1.3.2 Cellules BEAS-2B

L'étude de l'activation métabolique des HAP, le post-marquage au ³²P, le test des comètes et le test des micronoyaux ont été réalisés sur les cellules BEAS-2B (N° ATCC : CRL 9609).

1.4 Méthodes

1.4.1 Test d'Ames

Le protocole a été appliqué comme décrit par André *et al.* [9]. Ainsi, les PM_{2.5} ont été testées à une concentration de 5 ; 25 ou 50 µg/10 µL de DMSO par boîte avec ou sans activation métabolique, sur les souches TA98, TA102 et YG1041. Pour chaque condition testée, le nombre de révertants par boîte a été rapporté au nombre moyen de révertants dans les boîtes non exposées (Taux de Réversion Spontanée, TRS), obtenu pour chaque expérience en remplaçant les PM_{2.5} par 10 µL de DMSO. Chaque condition (DMSO seul, PM_{2.5} à 5 ; 25 et 50 µg) a été analysée sur trois réplicats, et l'expérience reproduite au cours de deux manipulations indépendantes. Un témoin positif, spécifique de la souche utilisée et de l'activation métabolique, a également été inclus dans chaque série.

1.4.2 Culture et exposition des cellules épithéliales bronchiques

L'ensemencement des cellules a été réalisé 24 h avant l'exposition à hauteur de 6 000 cellules/cm², dans des plaques de culture de type CellBind (Corning ; Fisher Scientific Labosi SAS, Élancourt, France). Les cellules ont été cultivées dans du *Bronchial Epithelial cell Growth Medium* (BEGM) (Lonza, Basel, Suisse), en atmosphère humide à 37 °C et en présence de 5 % de CO₂, et ont ensuite été exposées en remplaçant le milieu initial par du milieu frais contenant la substance à tester et supplémenté de 0,5 % (v/v) d'amphotéricine B (2,5 µg/mL), pour limiter les contaminations fongiques. Pour l'ensemble des tests, les cellules BEAS-2B ont été exposées pendant 72 h à deux concentrations de PM_{2.5} sélectionnées pour encadrer la concentration en PM_{2.5} inhibant de 10 % l'activité mitochondriale des cellules exposées (C1 = 3,75 ou C2 = 15 µg/cm²) ou au B[a]P à 50 µM.

Tableau I. Caractéristiques physiques et chimiques des échantillons de particules fines PM_{2,5} (R : Rural, U : Urbain, I : Industriel, collectés au cours des saisons 1 (printemps-été 2008) ou 2 (automne-hiver 2008-2009)).
HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques ; B[a]P-CEC : Concentrations Cancérogènes Équivalentes au Benzo[a]Pyrène ; PCDD : PolyChloroDibenzo-p-Dioxines ; PCDF : PolyChloroDibenzo-Furans ; DL-PCB : PolyChloroBiphényles Dioxin-Like ; PCB : PolyChloroBiphényles ; I-TEQ PCDD/F : Quantités Toxiques Équivalentes Internationales pour les PCDD et PCDF ; TE DL-PCB : Équivalent Toxique pour les DL-PCB.
Physical and chemical characteristics of PM_{2,5} samples (R : Rural, U : Urban, I : Industrial, collected in 1 : spring-summer 2008 or 2 : autumn-winter 2008-2009).
HAP : Polycyclic Aromatic Hydrocarbons ; B[a]P-CEC : Benzo[a]Pyrene Carcinogenic Equivalent Concentration ; PCDD : PolyChloroDibenzo-p-Dioxins ; PCDF : PolyChloroDibenzo-Furans ; DL-PCB : Dioxin-Like PolyChloroBiphenyls ; PCB : PolyChloroBiphenyls ; I-TEQ PCDD/F : International-Toxic Equivalent Quantity for PCDD and PCDF ; TE DL-PCB : Toxic Equivalent for DL-PCB.

		1R	1U	1I	2R	2U	2I
Granulométrie (% PM _{2,5})		98%	84%	97%	80%	79%	95%
Surface spécifique (m ² /g)		2,8	3,5	5,2	5,3	5,7	6,2
Conc. atmosphérique (µg/m ³)		2,8	9,9	11,5	1,9	12,9	15,4
Métaux (µg/g)	Al	20681	14 136	39 366	46 912	22 227	26 522
	Ba	234	307	502	421	350	240
	Cr	215	389	414	153	119	101
	Cu	397	874	1671	2 384	949	559
	Fe	26 505	41 947	107 346	22 545	40 453	85 630
	Mn	1 103	1 820	6 115	573	1 171	2 257
	Ni	108	191	245	133	226	170
	Pb	419	376	464	356	352	430
	Ti	353	731	818	270	300	320
	Zn	1 135	1 776	2 820	574	1 010	1 757
Σ métaux (µg/g)		51 150	62 547	159 761	74 321	67 151	117 986
HAP (µg/g)	Acenaphthylène	0,12	0,09	0,3	0,56	0,24	0,08
	Fluoranthène	2,8	2,52	1,58	25,92	8,5	2,06
	Fluorène	0,22	0,08	0,08	-	-	-
	Naphtalène	0,34	37,53	63,61	-	-	24,14
	Phenanthrène	1,23	1,29	0,89	11,76	1,8	0,83
	Pyrène	2,26	2,08	1,22	25,05	8,26	2
	Anthracène	0,24	0,44	0,17	1,7	0,97	0,27
	Benzo[ghi]perylène	6,82	3,95	3,24	28,26	16,48	18,39
	Chrysène	4,79	2,65	1,92	52,54	27,05	24,09
	Benzo[a]anthracène	4,5	2,01	1,53	26,19	13,36	15,44
	Benzo[b]fluoranthène	12,76	7,16	6,24	49,9	30,01	28,39
	Benzo[k]fluoranthène	2,83	1,49	1,65	14,94	8,09	8,65
	Indeno[123cd]pyrène	6,7	4,55	3,74	-	-	12,54
	Benzo[a]pyrène	6,11	3,02	1,95	23,41	12,14	13,6
	Dibenzoanthracène	1,36	0,78	0,72	27,34	12,29	-
Σ HAP (µg/g)		68,3	77,2	96,4	329,9	161,7	147,3
Σ B[a]P-CEC (µg/g)		15,73	8,55	6,98	183,4	90,98	55,27
HAP chlorés (ng/g)	Σ PCDD	203	13	73	16	37	85
	Σ PCDF	10	8	20	5	13	30
	Σ DL-PCB	42	60	65	79	87	113
	Σ PCB	499	594	652	363	542	791
Σ I-TEQ PCDD/F (ng/g)		0,9	0,5	1,2	0,4	0,8	1,7
Σ TE DL-PCB (ng/g)		0,06	0,07	0,18	0,06	0,07	0,07

1.4.3 Expression génique et activité catalytique du CYP1A1

Le niveau d'expression du CYP1A1 a été déterminé par l'utilisation du kit Cell-to-CT (Ambion, In Vitrogen-Life Technologies), du TaqMan® Gene Expression Assay (Applied Biosystems, In Vitrogen-Life Technologies) d'un système de PCR 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). L'amplification a été réalisée en parallèle pour le CYP1A1 et l'ARN 18S, choisi comme référence interne. Après la PCR, le cycle seuil (Cycle threshold, Ct) a été déterminé grâce au logiciel Sequence Detection 7500 v2.0.3 (Applied Biosystems), et la quantité relative (RQ) d'ARNm dans les cellules exposées par rapport aux cellules non exposées a été obtenue par la méthode de calcul suivante : $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, (avec $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{exposées}} - \Delta Ct_{\text{non exposées}}$ et $\Delta Ct = Ct_{\text{CYP1A1}} - Ct_{\text{18S}}$). L'activité catalytique du CYP1A1 a, quant à elle, été mesurée selon la méthode décrite par Abbas *et al.* [10]. Les résultats représentent la moyenne de quatre expériences.

1.4.4 Post-marquage

Le protocole employé est basé sur la méthodologie standardisée décrite par Phillips et Castegnaro [11]. Les expériences ont été réalisées trois fois, à 72 h d'intervalle et à partir de la même source de ^{32}P . Un échantillon d'ADN de thymus de veau exposé au BPDE a été utilisé comme témoin positif (11 adduits/ 10^9 nucléotides) pour chaque manipulation. Il a également servi à la quantification relative des adduits dans les échantillons.

1.4.5 Test des comètes

La méthode utilisée a été adaptée du protocole initialement décrit par Singh *et al.* [12]. Trois lames ont été réalisées pour chaque condition analysée, hormis le témoin négatif pour lequel 8 lames ont été préparées, colorées au BET, puis lues en aveugle à l'aide d'un microscope de type BX51 muni d'une caméra DP70 et d'une lampe à fluorescence modèle U RFL T (Olympus France SAS, Rungis, France) ($\lambda_{\text{ex}} = 530 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 600 \text{ nm}$). Pour chaque lame, 50 images ont été acquises grâce au logiciel DPController 2.1.1.183 (Olympus, France). L'analyse individuelle des comètes a été réalisée grâce au logiciel CASP 1.2.2 (CASPLab, GNU public license), fournissant entre autres paramètres le pourcentage d'ADN dans la queue, sélectionné pour les analyses statistiques selon les recommandations de Collins *et al.* [13].

1.4.6 Test des micronoyaux

Le protocole employé est identique à celui décrit par Mehri *et al.* [14], hormis le choc hypotonique qui a été réalisé en incubant le culot cellulaire pendant 90 secondes dans un mélange BEGM/eau ultra-pure (2/1, v/v). Les résultats sont obtenus à partir de deux expériences indépendantes, au cours desquelles deux lames ont été réalisées pour chaque condition. Les micronoyaux ont été dénombrés pour 1 000 cellules mononucléées par lame.

1.4.7 Analyses statistiques

L'ensemble des analyses statistiques a été réalisé à l'aide du logiciel SAS 9.2 (SAS Institute, USA). Le degré de significativité des facteurs d'induction obtenus par le test d'Ames a été étudié par un test unilatéral de Dunnett, alors que les effets de la dose et de la présence de S9 ont été évalués par une analyse de variances (ANOVA). Le pourcentage d'ADN dans la queue de comète, le niveau d'expression génique du CYP1A1 et l'activité EROD ont été analysés par un test non paramétrique de Mann-Whitney. Enfin, les pourcentages de micronoyaux ont été comparés par un test du χ^2 .

2. Résultats

2.1 Mutagénicité des PM_{2.5}

L'étude de mutagénicité par test d'Ames met en évidence une tendance mutagène de la quasi-totalité des échantillons PM_{2.5} sur la souche TA102. Les échantillons de particules se révèlent également mutagènes sur la souche TA98, sauf les prélèvements 1U -S9 et 1I. Enfin, l'ensemble des PM_{2.5} possède un effet mutagène significatif sur la souche YG1041 (Figure 1). Ces augmentations du Facteur d'Induction (FI) sont généralement associées à un effet dose significatif (ANOVA ; $P < 0,01$), à l'exception du prélèvement 2U sur la souche TA102 en absence de S9. Une diminution significative du FI est constatée lors de l'ajout de S9 pour la souche YG1041 et pour l'ensemble des échantillons (ANOVA ; $P < 0,05$). De même, des différences entre les campagnes de prélèvement sont observées sur la souche TA98, avec pour tendance globale une augmentation des effets lors de la seconde campagne. L'étude de la dernière souche (YG1041) met en évidence un effet mutagène significativement supérieur des PM_{2.5} de la seconde campagne, et ce quel que soit le site considéré et indépendamment de la présence de S9 (ANOVA, $P < 0,05$). Si l'on s'intéresse enfin aux différences entre les sites pour une même saison de prélèvement, aucune variation n'est observée sur la souche TA102. À l'inverse, des différences entre sites apparaissent après analyse des résultats sur les deux autres souches (TA98 et YG1041), à savoir une tendance $R > U > I$ conservée pour les deux campagnes, en l'absence comme en présence de S9.

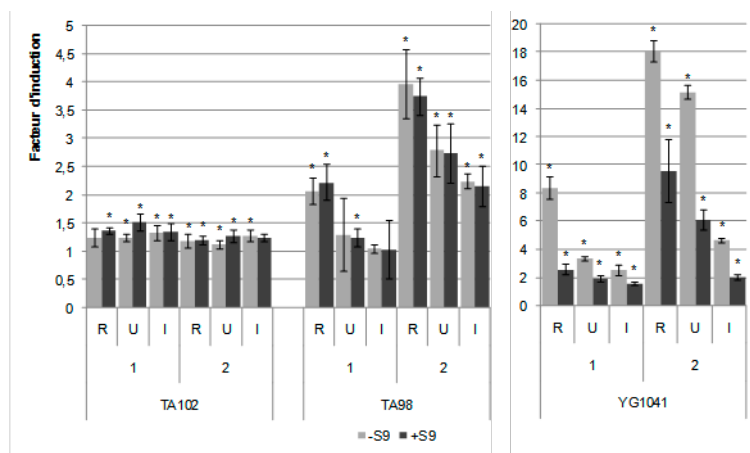


Figure 1. Facteurs d'induction (nombre de colonies révertantes par boîte/taux de réversion spontanée - TRS) observés pour chacun des prélèvements de particules fines $PM_{2.5}$ (R : Rural, U : Urbain, I : Industriel, collectés au cours des saisons 1 (printemps-été 2008) ou 2 (automne-hiver 2008-2009)) à une dose de 50 µg/boîte, en l'absence ou en présence de S9 et pour chacune des trois souches testées (TA102, TA98 et YG1041). Les résultats sont présentés sous la forme moyenne $\pm$ déviation standard ($n = 2 \times 3$). Analyses statistiques : * $P < 0,05$ vs TRS.

*Induction Factor (number of revertants per plate / spontaneous reversion rate - TRS) observed for each of the six $PM_{2.5}$ samples (R: Rural, U: Urban, I: Industrial, collected in 1: spring-summer 2008 or 2: autumn-winter 2008-2009) at a dose of 50µg/plate, with or without S9, and for each of the three tester strains (TA102, TA98 and YG1041). Results are expressed as mean $\pm$ standard deviation ($n= 2 \times 3$). Statistical analyses: * $P < 0.05$ vs. TRS.*

2.2 Activation métabolique des composés organiques

Après une exposition de 72 h aux différents échantillons de $PM_{2.5}$, le niveau d'expression du *CYP1A1* est significativement supérieur à celui observé dans les cellules non exposées ($P < 0,01$), et ce quels que soient l'échantillon de $PM_{2.5}$ et la concentration testés (Tableau II). De plus, cette induction du gène est associée à une augmentation significative de l'activité EROD ($P < 0,01$) pour l'ensemble des prélèvements de $PM_{2.5}$ testés.

2.3 Formation d'adduits encombrants à l'ADN

Les quantifications relatives obtenues après analyse par post-marquage au ^{32}P mettent en évidence la formation d'adduits encombrants à l'ADN des cellules BEAS-2B exposées aux six prélèvements de $PM_{2.5}$ à 3,75 ou 15 µg/cm², avec un effet dose vraisemblable pour tous les échantillons sauf 2U (Figure 2). Selon les conditions testées, un ou deux spots sont détectés après chromatographie et révélation. Le premier (spot « B[a]P ») est constant, situé en position centrale et superposable au spot généré suite à l'exposition des cellules au B[a]P et retrouvé dans le témoin obtenu par exposition d'ADN de thymus de veau au BPDE. À l'inverse, le second spot n'est pas systématiquement observé et se localise à mi-distance entre le point de dépôt et le spot « B[a]P », avec une migration verticale plus réduite. Les niveaux relatifs d'adduits (Relative Adduct Level, RAL) sont variables selon les conditions étudiées. Ainsi, si l'on considère l'en-

semble des adduits et en se basant sur les effets à la plus faible concentration, l'exposition des cellules aux prélèvements de la seconde campagne induit la formation d'un nombre plus important d'adduits, avec un effet plus marqué pour les échantillons d'origine industrielle que ceux d'origine urbaine ou rurale. À l'inverse, aucun spot n'est détecté dans les échantillons d'ADN issus des cellules non exposées. Par ailleurs, nous avons observé une bonne reproductibilité, d'une expérience à l'autre, des RAL détectés dans les échantillons B[a]P et BPDE (données non présentées). Ces résultats, comme ceux obtenus en tests d'Ames, montrent une tendance globale à l'augmentation de la formation d'adduits encombrants à l'ADN dans les cellules exposées aux particules de la seconde campagne de prélèvement. Cependant, il semble que les effets induits par les particules industrielles soient plus importants que ceux observés suite à l'exposition des cellules aux particules urbaines et rurales pour une campagne de prélèvement donnée.

2.4 Fragmentation de l'ADN

Le B[a]P induit une augmentation significative du pourcentage d'ADN dans la queue de comète à la concentration étudiée (50 µM). L'exposition des cellules BEAS-2B pendant 72 h aux différents échantillons conduit à une augmentation significative mais globalement assez modeste de la fragmentation au sein de l'ADN des cellules exposées, par rapport aux cellules non exposées. Cet effet est observé dès la plus faible concentration testée (soit 3,75 µg/cm²) pour les échantillons 1R, 1I et 2R. En ce qui concerne

Tableau II. Niveau d'expression génique déterminé par RT-qPCR et activité catalytique du Cytochrome P450 1A1 (CYP1A1), obtenue par dosage de l'activité EROD, observés dans les cellules non exposées (T) ou après exposition des cellules BEAS-2B aux particules fines PM_{2,5} (R : Rural, U : Urbain, I : Industriel, collectés au cours des saisons 1 (printemps-été 2008) ou 2 (automne-hiver 2008-2009)) pendant 72 h, à une concentration de 3,75 (C1) ou 15 µg/cm² (C2), ou au Benzo[a]Pyrène (B[a]P) à 1 µM. RQ = $2^{-\Delta\Delta Ct}$, avec $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{exposé}} - \Delta Ct_{\text{non exposé}}$, $\Delta Ct = Ct_{\text{CYP1A1}} - Ct_{\text{18S}}$

RQ : Quantité Relative d'ARNm vs T ; Ct : Cycle seuil ; EROD : EthoxyRésofurine-O-Dééthylase. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne ± déviation standard (n = 4). Analyses statistiques: ** P < 0,01 vs T.

Gene expression, as determined by RT-qPCR, and catalytic activity, measured through EROD activity, of Cytochrome P450 1A1 (CYP1A1), observed in unexposed cells (T) of after BEAS-2B cells exposure for 72h to PM_{2,5} samples (R: Rural, U: Urban, I: Industrial, collected in 1: spring-summer 2008 or 2: autumn-winter 2008-2009) at a concentration of 3.75 (C1) or 15µg/cm² (C2),

or to Benzo[a]Pyrene (B[a]P) at 1µM. RQ = $2^{-\Delta\Delta Ct}$, with $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{exposé}} - \Delta Ct_{\text{unexposed}}$, $\Delta Ct = Ct_{\text{CYP1A1}} - Ct_{\text{18S}}$

*RQ: mRNA Relative Quantification vs T; Ct: Cycle threshold; EROD: EthoxyResorufin-O-Deethylase. Results are expressed as mean ± standard deviation (n= 4). Statistical analyses : ** P < 0.01 vs. T.*

	RQ CYP1A1	Activité EROD
T	1,000 [0,587 ;1,702]	0,002 ± 0,000
1R C1	43,55 [34,92 ;54,30] **	1,382 ± 0,098 **
1R C2	140,3 [56,20 ;350,5] **	5,766 ± 0,420 **
1U C1	36,08 [25,36 ;51,32] **	4,379 ± 0,422 **
1U C2	132,0 [79,50 ;219,1] **	5,760 ± 0,212 **
1I C1	14,13 [9,729 ;20,55] **	7,262 ± 0,674 **
1I C2	46,99 [35,34 ;62,46] **	6,981 ± 0,377 **
2R C1	77,02 [76,10 ;77,95] **	7,570 ± 0,434 **
2R C2	76,76 [59,70 ;98,69] **	6,449 ± 0,461 **
2U C1	133,4 [115,7 ;153,9] **	7,107 ± 0,648 **
2U C2	104,5 [89,49 ;122,1] **	8,831 ± 0,560 **
2I C1	87,58 [64,58 ;118,7] **	7,305 ± 0,742 **
2I C2	192,7 [146,7 ;253,2] **	10,72 ± 0,461 **
B[a]P	6,386 [5,110 ;7,982] **	9,972 ± 0,946 **

les prélèvements 1U et 2U, une concentration de 15 µg/cm² est nécessaire pour induire une augmentation significative du pourcentage d'ADN dans la queue de comète. L'échantillon 2I ne semble pas induire de cassures significatives de l'ADN des cellules exposées. De manière surprenante, une dose plus importante de PM_{2,5} 2R provoque une diminution de la fragmentation de l'ADN (figure 3).

2.5 Formation de micronoyaux

Le dernier paramètre de génotoxicité évalué est la formation de micronoyaux. L'exposition au B[a]P a induit une augmentation du nombre de micronoyaux. Ce test met en évidence une augmentation significative, par rapport aux cellules non exposées, du nombre de cellules mononucléées présentant un micronoyau après exposition à tous les échantillons particuliers à la concentration la plus élevée (15 µg/cm²). Cet effet est retrouvé après exposition aux prélèvements 1R, 1I, 2U et 2I à la concentration la plus faible, soit 3,75 µg/cm² (figure 4).

3. Discussion

Les mécanismes sous-jacents de la toxicité de PM_{2,5} restent mal connus. En effet, les particules atmosphériques représentent un cocktail de polluants présents à faibles voire très faibles doses, et les effets toxiques observés se révèlent bien souvent différents de la somme des effets prévisibles pour chacun des polluants aux concentrations retrouvées. Ceci suggère, selon les cas, l'existence de phénomènes d'additivité, de synergie ou d'antagonisme entre les différentes substances présentes. Dans ce contexte, nous nous sommes proposé d'étudier les effets génotoxiques de six échantillons de particules fines (PM_{2,5}) sur la lignée cellulaire BEAS-2B. Ces particules ont été prélevées au cours de deux saisons et sous trois influences distinctes, avant de faire l'objet d'une caractérisation physique et chimique approfondie. Après avoir étudié la mutagénicité des PM_{2,5} par le test d'Ames, nous nous sommes intéressés à l'expression génique et l'activité catalytique du CYP1A1 dans les cellules exposées, puis nous avons évalué la génotoxicité des particules par trois méthodes : (i) la formation d'adduits

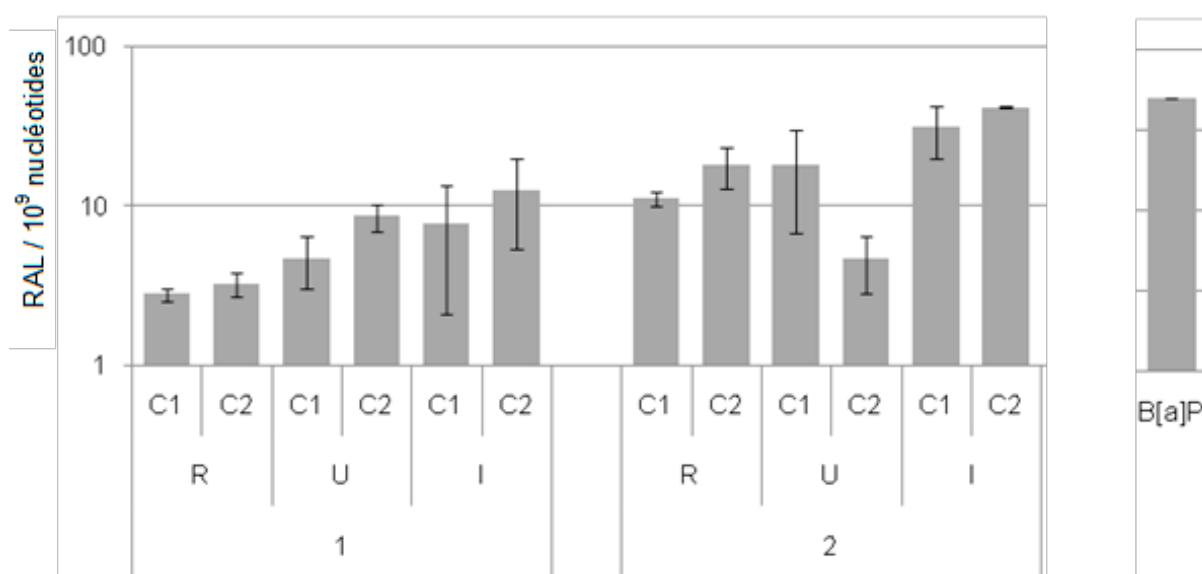


Figure 2. Quantification relative des adduits encombrants à l'ADN par la méthode du post-marquage au ^{32}P des cellules BEAS-2B exposées pendant 72 h aux particules fines $\text{PM}_{2.5}$ (R : Rural, U : Urbain, I : Industriel, collectés au cours des saisons 1 (printemps-été 2008) ou 2 (automne-hiver 2008-2009)), à une concentration de 3,75 (C1) ou 15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (C2) ou au Benzo[a]Pyrène (B[a]P) à 1 μM . Les résultats sont exprimés en niveau relatif d'adduits (RAL) pour 10^9 nucléotides et sous la forme : moyenne $\pm$ déviation standard (n = 3).

Relative quantification of bulky DNA-adducts by ^{32}P post-labeling method in BEAS-2B cells exposed for 72h to $\text{PM}_{2.5}$ samples (R: Rural, U: Urban, I: Industrial, collected in 1: spring-summer 2008 or 2: autumn-winter 2008-2009) at a concentration of 3.75 (C1) or 15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (C2), or to Benzo[a]Pyrene (B[a]P) at 1 μM . Results are expressed as mean $\pm$ standard deviation (n= 3).

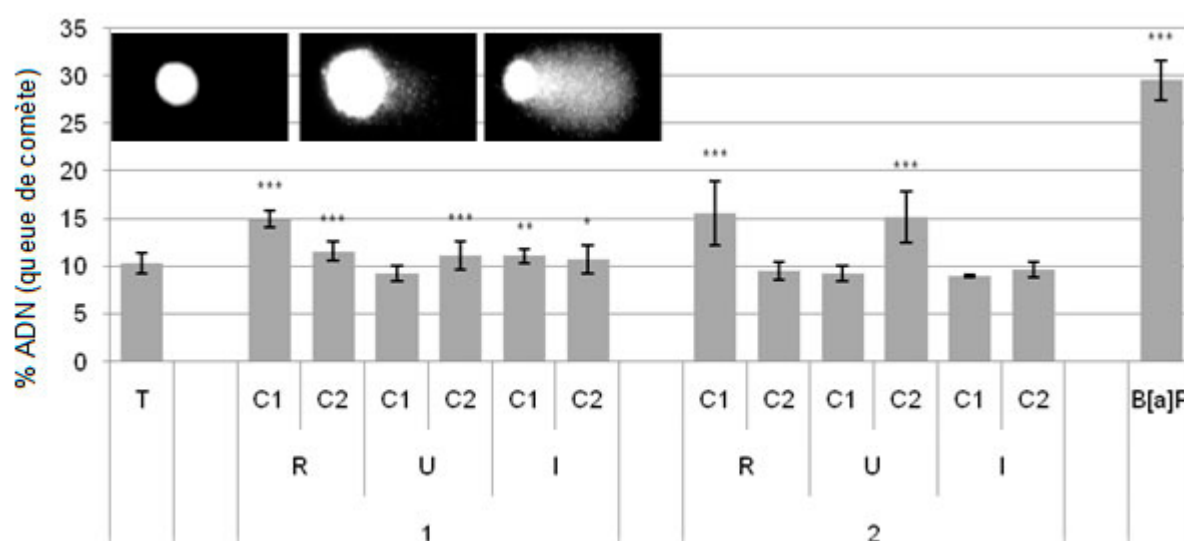


Figure 3. Pourcentage d'ADN dans la queue de comète déterminé par test des comètes en conditions alcalines, mesuré dans les cellules non exposées (T) ou après exposition des cellules BEAS-2B pendant 72 h aux particules fines $\text{PM}_{2.5}$ (R : Rural, U : Urbain, I : Industriel, collectés au cours des saisons 1 (printemps-été 2008) ou 2 (automne-hiver 2008-2009)), à une concentration de 3,75 (C1) ou 15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (C2), ou au Benzo[a]Pyrène (B[a]P) à 50 μM . Les résultats sont présentés sous la forme moyenne $\pm$ déviation standard (n = 3 x 50). Analyses statistiques : * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs T. Les images sont celles d'une cellule intacte (gauche) et de cellules dont l'ADN a été faiblement (centre) ou fortement (droite) endommagé.

*Percentage of DNA in comet tail as determined by alkaline comet assay measured in BEAS-2B cells exposed for 72h to $\text{PM}_{2.5}$ samples (R: Rural, U: Urban, I: Industrial, collected in 1: spring-summer 2008 or 2: autumn-winter 2008-2009) at a concentration of 3.75 (C1) or 15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (C2), or to Benzo[a]Pyrene (B[a]P) at 50 μM . Results are expressed as mean $\pm$ standard deviation (n= 3 x 50). Statistical analyses : * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ vs T.*

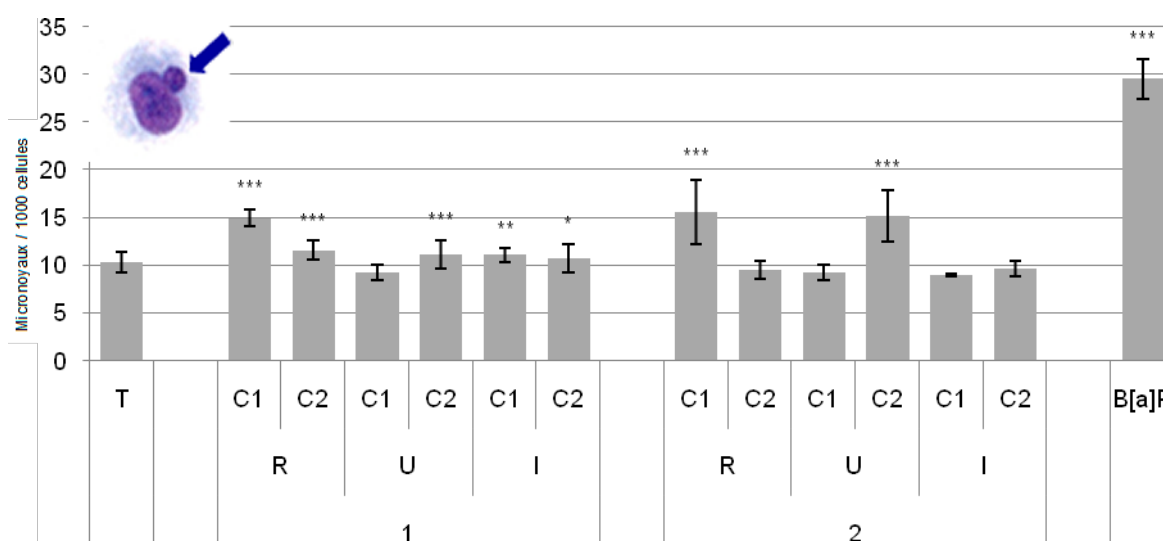


Figure 4. Nombre de micronoyaux pour 1 000 cellules mononucléées, dans les cellules non exposées (T) ou après exposition des cellules BEAS-2B pendant 72 h aux particules fines $PM_{2.5}$ (R : Rural, U : Urbain, I : Industriel, collectés au cours des saisons 1 (printemps-été 2008) ou 2 (automne-hiver 2008-2009)), à une concentration de 3,75 (C1) ou 15 $\mu g/cm^2$ (C2), ou au Benzo[a]Pyrène (B[a]P) à 50 μM . Les résultats sont présentés sous la forme moyenne $\pm$ déviation standard ($n = 2 \times 2$). Analyses statistiques : * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs T.

L'image est celle d'une cellule présentant un micronoyau, indiqué par la flèche.

*Number of micronuclei per 1,000 mononuclear cells observed in unexposed cells (T) of after BEAS-2B cells exposure for 72h to $PM_{2.5}$ samples (R: Rural, U: Urban, I: Industrial, collected in 1: spring-summer 2008 or 2: autumn-winter 2008-2009) at a concentration of 3.75 (C1) or 15 $\mu g/cm^2$ (C2), or to Benzo[a]Pyrene (B[a]P) at 50 μM . Results are expressed as mean $\pm$ standard deviation ($n = 2 \times 2$). Statistical analyses : * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ vs. T.*

encombrants à l'ADN (post-marquage au ^{32}P), (ii) la fragmentation de l'ADN (test des comètes) et (iii) les anomalies de séparation des chromosomes (test des micronoyaux).

Afin de conduire notre étude, nous avons utilisé comme modèle cellulaire la lignée BEAS-2B, immortalisée par l'antigène T du virus SV40 et ayant pour origine un épithélium bronchique normal. Ce choix présente un double avantage, lié à la fois au type de cellules sélectionné et aux capacités métaboliques de cette lignée. En effet, les différentes études ont été réalisées sur des cellules présentant un phénotype normal, entre le 5^e et le 7^e passage après immortalisation, stade auquel seuls quelques changements caryotypiques mineurs, n'étant pas associés à un potentiel tumorigène chez la souris, ont été observés [15]. Cette lignée est ainsi plus proche des conditions physiologiques, en comparaison avec une lignée tumorale telle que A549. Considérant l'origine bronchique des cellules, ce choix semble tout à fait pertinent au vu des particules étudiées. En effet, notre étude s'est focalisée sur les particules fines ($PM_{2.5}$), pouvant être inhalées et se retrouvant ainsi au contact, entre autres, des cellules épithéliales bronchiques dans le contexte d'une exposition humaine réelle [2]. Enfin, les capacités métaboliques des cellules BEAS-2B ont été démontrées, notamment concernant l'activation méta-

bolique des HAP et des COV [16], [17]. Pour les différents tests mis en œuvre sur cette lignée cellulaire, un temps d'exposition de 72 h a été sélectionné en fonction des résultats d'expérimentations préliminaires.

Notre travail a débuté par une étude de la mutagenicité intrinsèque des particules prélevées. Pour ce faire, le test d'Ames a été réalisé sur trois souches de *Salmonella typhimurium* de sensibilité différente, avec ou sans activation métabolique. Bien que ce potentiel mutagène des $PM_{2.5}$ ait déjà été évalué par de nombreux chercheurs, il convient de noter que l'ensemble de ces études a été réalisé sur la fraction organique extractible (*Extractable Organic Matter*, EOM) des particules. Ceci soulève plusieurs problèmes liés à la concentration très importante en composés organiques dans cet EOM et à la représentativité de l'extrait par rapport à l'échantillon initial, ainsi qu'à l'absence de considération quant à la biodisponibilité réelle des constituants et au rôle potentiel de la particule elle-même [18], [19]. Dans le cadre de notre étude, nous avons donc pris le parti d'étudier les particules dans leur intégralité afin de contourner ces écueils. Un choix pertinent de souches procaryotes a permis de mettre en avant le rôle de certains mécanismes d'action ou de certaines fractions particulières dans la mutagenicité globale des particules. La souche TA102 a ainsi été utilisée pour étudier l'implication du stress oxydant

généralisé par les $PM_{2.5}$, possiblement lié à la production d'Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) en surface des particules ou à la présence de métaux de transition, pouvant catalyser la réaction de Fenton, (e.g. Fe, Cu, Mn, Al ou Cr) et de HAP, dont la métabolisation peut générer des ERO [20]. L'effet observé est de très faible amplitude, semble indépendant de la présence de S9 et apparaît constant entre les différents sites. Considérant ces éléments, qui sont en totale opposition avec les résultats obtenus sur les deux autres souches testées, nous supposons que ces variations relèveraient d'une fluctuation expérimentale plutôt que d'une réelle activité mutagène. Cependant, les particules ont été remises en suspension dans du DMSO, connu pour être un piègeur de radicaux hydroxyle, qui aurait donc pu modifier la réponse de la souche TA102 [21]. La deuxième souche testée (TA98) est sensible aux mutagènes directs ainsi qu'aux HAP après activation métabolique par la fraction S9. Bien qu'une réponse significative ait été observée pour la plupart des échantillons de particules, aucune augmentation n'a été détectée après activation métabolique. Ce résultat pourrait sembler assez surprenant au vu des quantités relativement importantes de HAP détectées au sein des aérosols collectés et de la corrélation établie entre concentration en HAP et mutagenicité des $PM_{2.5}$ dans plusieurs études [22], [23], [24]. Néanmoins, cette différence pourrait s'expliquer par une biodisponibilité moindre des HAP dans les particules totales, en comparaison avec les EOM, et par le fait que les HAP ne représentent pas les composés les plus mutagènes au sein des particules atmosphériques [18]. Les études menées sur la troisième souche (YG1041), caractérisée par des activités nitro-réductase et *O*-acetyltransférase accrues, ont mis en évidence un potentiel mutagène très important des $PM_{2.5}$. Cette réponse amplifiée de la souche YG1041 par rapport à la souche TA98 a déjà été décrite par Pastorková *et al.* [24]. La très nette diminution de l'effet en présence de fraction S9 suggère un rôle prépondérant des composés aromatiques nitrés dans la mutagenicité des particules. En effet, ces composés sont connus pour être des mutagènes directs, détoxifiés lorsqu'ils sont métabolisés, observation déjà évoquée par une étude antérieure [25].

En outre, les composés nitro-aromatiques sont connus pour être de puissants mutagènes chez les bactéries et seraient plus biodisponibles que les HAP de par leur polarité plus importante. Ces deux facteurs pourraient concourir à l'induction d'une réponse significative à des doses relativement faibles [26]. Ces résultats pourraient également expliquer les effets observés sur la souche TA98, compte tenu de la proportionnalité entre les facteurs d'induction sur les deux souches. Cependant, ce type de composés n'a pas pu être mis en évidence dans les aérosols particulaires par la méthode classique de GC-MS. Ainsi,

l'ensemble des résultats obtenus par le test d'Ames rejoint les conclusions d'autres auteurs, à savoir (i) que la souche YG1041 est vraisemblablement la plus à même de révéler un potentiel mutagène des $PM_{2.5}$ et (ii) que les HAP ne semblent pas jouer un rôle prépondérant dans la mutagenicité globale des particules [18], [24], [25]. Ils diffèrent néanmoins de certaines autres observations par la corrélation de la mutagenicité avec la somme des B[a]P-CEC, plutôt qu'avec les concentrations brutes.

Nous avons ensuite cherché à expliquer cette mutagenicité et nous sommes intéressés à différents marqueurs de génotoxicité. Nous avons en premier lieu évalué la formation d'adduits encombrants à l'ADN des cellules BEAS-2B exposées, en lien avec le potentiel d'activation métabolique de ces cellules. L'étude de ce paramètre paraît en effet pertinente au vu des concentrations importantes en HAP mesurées dans les particules, cohérentes avec les capacités d'adsorption des $PM_{2.5}$ révélées par leur surface spécifique élevée. Les expériences de mesure d'expression génique et d'activité catalytique du CYP1A1 ont permis de mettre en évidence une nette induction du gène codant pour cette enzyme, qui se traduit par une élévation du taux de protéine active, comme le démontre l'activité EROD accrue dans les cellules exposées. Cette induction passe vraisemblablement par une activation de l'Aryl hydrocarbon Receptor (AhR). En effet, les HAP, les PCDD ou encore certains PCB Dioxin-Like sont capables d'induire l'expression de différents gènes régulés par l'Ahr [27]. Ces xénobiotiques inducteurs se fixent sur l'Ahr cytoplasmique, déclenchant sa translocation dans le noyau où il s'hétérodimérise avec l'*Aryl Receptor Nuclear Translocator* (ARNT). L'hétérodimère ainsi formé se fixe sur les *Xenobiotic Responsive Element* (XRE) présents au niveau du promoteur de certains gènes dont il induit l'expression, parmi lesquels figure le CYP1A1 [28]. Nos résultats sont cohérents avec d'autres études, ayant mis en évidence une induction similaire du CYP1A1 suite à l'exposition de cellules pulmonaires à des $PM_{2.5}$ [29], [30]. Le dosage des adduits encombrants par post-marquage au ^{32}P a ainsi mis en évidence la formation d'adduits à l'ADN des cellules BEAS-2B exposées aux $PM_{2.5}$, avec un effet dose vraisemblable pour tous les échantillons hormis le prélèvement 2U. Cette inversion dans l'intensité des effets en fonction de la concentration en $PM_{2.5}$ 2U pourrait s'expliquer par un éventuel biais de manipulation lors de l'exposition des cellules. La détection d'adduits encombrants à l'ADN de cellules exposées à des $PM_{2.5}$ est en accord avec des résultats similaires obtenus dans une autre lignée de cellules pulmonaires métaboliquement compétente (A549) exposée à des particules de même type [30]. La présence d'adduits confirme ainsi les capacités de la lignée cellulaire BEAS-2B à transformer les HAP en métabolites réactifs, hypothèse supportée par l'activité EROD mesurée et préalablement démontrée

par Uppstad *et al.* [17]. Un spot superposable à celui retrouvé dans l'ADN des cellules exposées au B[a]P seul et dans l'ADN de thymus de veau exposé au BPDE est observé après exposition des cellules aux six prélèvements aux deux concentrations testées. Ceci laisse supposer que ce spot correspond à des nucléotides modifiés par un adduit BPDE ou de structure très proche. Cependant, l'intensité relative des spots entre les différentes conditions n'est pas corrélée aux concentrations en B[a]P mesurées dans les particules. De même, aucune relation ne peut être faite entre l'intensité totale des deux spots potentiellement retrouvés et les caractéristiques chimiques des échantillons que sont les concentrations en HAP totaux, les B[a]P-CEC et les équivalents toxiques PCDD/F et DL-PCB. Ces deux constatations laissent supposer la formation d'adduits encombrants supplémentaires par d'autres molécules, hypothèse étayée par la formation d'adduits encombrants détectables par post-marquage au ^{32}P dans des cellules BEAS-2B exposées à différents composés nitro-aromatiques [31]. Au vu des résultats discordants entre l'intensité des spots et les concentrations en HAP, cette expérience confirme également l'intérêt d'utiliser un test permettant d'évaluer une réponse biologique intégrée dans l'étude des effets toxiques, *a fortiori* dans le cas de mélanges complexes dont l'intégralité des constituants ne peut, pour des raisons pratiques, être déterminée par des méthodes analytiques.

Ayant mis en évidence la formation d'adduits encombrants suite à l'exposition aux particules atmosphériques, nous avons voulu étudier les conséquences de cette modification de nucléotides en nous intéressant aux cassures de l'ADN pouvant en résulter. Ainsi, le test des comètes a montré une augmentation significative, pour 5 de nos 6 échantillons, de la fragmentation de l'ADN des cellules BEAS-2B suite à l'exposition aux $\text{PM}_{2.5}$ pendant 72 h. Des résultats similaires ont déjà été mis en évidence pour d'autres particules atmosphériques et dans divers modèles cellulaires [32], [33]. Cependant le niveau de dommages mis en évidence par ce test selon notre protocole reste globalement faible par rapport à ces dernières études. Ce manque de sensibilité apparent du test des comètes pourrait être lié à l'utilisation des cellules BEAS-2B. En comparaison avec les cellules A549, ces cellules se sont avérées assez difficiles à individualiser par trypsination lors du test, ce qui pourrait permettre une réparation partielle des dommages à l'ADN lors de cette étape. De plus, nous avons constaté une diminution des effets mesurés en augmentant la dose de particules 2R. Cette diminution paradoxale pourrait être liée à un nombre insuffisant de cellules analysées (50 cellules par lames) par comparaison avec le test des micronoyaux (1 000 cellules par lames). Bien que nos résultats ne nous permettent pas de distinguer la contribution respective des fractions organiques et inorganiques dans les

effets observés, différentes études ont montré la capacité du TiO_2 ainsi que du B[a]P à induire une réponse significative par le test des comètes [34], [35]. Ainsi, il semble que les fractions organique et inorganique des aérosols contribuent toutes deux à l'induction de cassures de l'ADN, comme l'ont déjà proposé plusieurs auteurs [36], [37]. De plus, des particules ont été observées au niveau de noyaux fortement endommagés de certaines cellules préalablement exposées aux $\text{PM}_{2.5}$, résultat retrouvé également dans les travaux de Kalrsson *et al.* [38]. Ceci suggère la possibilité d'une interaction directe entre les particules et l'ADN.

Le dernier volet de notre étude concernait le dénombrement de micronoyaux dans les cellules exposées. Ces structures sont constituées d'un chromosome ou d'un fragment de chromosome, présent dans le cytoplasme et indépendant du noyau, issu d'un défaut de ségrégation lors de la mitose. Ce phénomène peut être lié à la présence de composés clastogènes, c'est-à-dire responsables d'anomalies dans la structure des chromosomes, ou de molécules aneugènes, qui induisent des anomalies dans le nombre de chromosomes [39]. Notre étude a mis en évidence une augmentation significative de la formation de micronoyaux dans les cellules exposées. Cette observation est en adéquation avec l'étude de Roubicek *et al.*, qui a montré l'importance des fractions organique et inorganique dans ce phénomène, en mettant en évidence une association significative entre la formation de micronoyaux et le cadmium ainsi que les HAP [40]. Cependant, la méthodologie employée ne nous permet pas de distinguer les effets aneugènes des clastogènes, et une modification du protocole devrait être appliquée selon les techniques décrites par Mateuca *et al.* [41].

Notre étude avait également pour objectif d'étudier les variations dans l'intensité des effets génotoxiques observés, selon la saison de prélèvement et l'origine des particules, en lien avec leur composition. Un caractère génotoxique plus important des particules prélevées au cours de la saison automne-hiver a d'ores et déjà été rapporté et pourrait être corrélé à la quantité importante de composés organiques retrouvés [33], [42]. Les différences entre les sites semblent également liées aux éléments chimiques retrouvés dans les $\text{PM}_{2.5}$ et notamment aux HAP et métaux de transition détectés. En effet, les particules d'origine rurale sont, pour une campagne de prélèvement donnée, plus mutagènes que les particules urbaines ou industrielles correspondantes. Ce résultat semble extrêmement surprenant de prime abord, mais peut s'expliquer par les concentrations très significatives en HAP retrouvées dans les particules rurales. Nous suspectons fortement le brûlage de débris végétaux (tailles de haies, etc.), fréquent et toléré dans la région, à faible distance de notre lieu de collecte, qui expliquerait la présence massive de composés orga-

niques dans les PM_{2,5} rurales. Ainsi, la composition des particules, bien que ne suffisant pas à expliquer la totalité des altérations retrouvées, joue un rôle crucial dans leur génotoxicité [43]. Notre travail tend à montrer un potentiel génotoxique globalement supérieur pour les échantillons ruraux, en comparaison avec les prélèvements réalisés sur les autres sites au cours de la même saison. Cependant, l'ensemble des expériences a été réalisé à une concentration mas-sique identique pour les trois sites de prélèvement, permettant d'évaluer les effets mutagènes et géno-toxiques intrinsèques des PM_{2,5}. Cette homogénéité dans la masse de particules utilisée ne prend donc pas en compte les concentrations atmosphériques en particules effectives au niveau des différentes locali-sations, paramètre crucial pour l'évaluation de l'ex-position humaine. Ainsi, bien qu'étant, de par leur composition, plus toxiques pour une quantité équiva-lente, les particules prélevées sous influence rurale sont de 3,5 à 8,1 fois moins concentrées dans l'air ambiant, diminuant d'autant l'exposition humaine.

Conclusion

Nous nous sommes ainsi attachés à l'étude de la mutagénicité et de la génotoxicité de la fraction solide inhalable (PM_{2,5}), de différents aérosols atmosphériques finement caractérisés et collectés sur des sites d'influence distincte au cours de deux saisons de pré-lèvement. Notre travail a mis en évidence le potentiel mutagène intrinsèque des particules, très probable-ment lié majoritairement à la présence de composés nitro-aromatiques. Associée à cette mutagénicité, les PM_{2,5} sont capables de former, à des concentrations faiblement cytotoxiques mais non cytostatiques, des adduits encombrants de HAP, voire de HAP nitrés, ainsi que de provoquer des cassures et de créer des

sites abasiques dans l'ADN des cellules BEAS-2B exposées. Elles sont également responsables d'une nette augmentation des anomalies de ségrégation des chromosomes dans les cellules exposées. Nous avons également montré des variations dans l'intensité des effets toxiques engendrés par les PM_{2,5}, en lien avec leur origine mais qu'il convient de corriger en fonction des concentrations atmosphériques effectives afin de rendre compte de l'exposition humaine réelle.

Ces altérations de l'ADN induites par les PM_{2,5}, si elles ne sont pas réparées, pourraient être à l'origine de mutations potentiellement capables d'initier un phénomène de cancérogenèse. Ce travail fournit donc certains éléments de réponse quant aux mécanismes physiopathologiques potentiellement impliqués dans la relation entre l'exposition des individus aux PM_{2,5} et les pathologies cancéreuses associées.

Nous tenons à remercier Fabrice Cazier, directeur du Centre Commun de Mesures de la Maison de Recherche en Environnement Industriel de Dunkerque, ainsi que Dominique Courcot, direc-teur de l'axe Chimie et Toxicologie des Émissions Atmosphériques de l'UCEIV, pour la collecte et la caractérisation phy-sico-chimique des échantillons de PM_{2,5}. Ce travail a bénéficié du soutien finan-cier de la Région Nord-Pas-de-Calais, du Syndicat Mixte de la Côte d'Opale, de l'Institut de Recherche en Environnement Industriel (IRENI) et de l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire, Alimentation, Environnement, Travail (ANSES).

Références bibliographiques

- [1] Pope CA, Burnett RT, Thurston GD, *et al.* Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air pollution: epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease. *Circulation* 2004; 109: 71-77.
- [2] Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect* 2005; 113: 823-39. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16002369>
- [3] Patton JS, Byron PR. Inhaling medicines: delivering drugs to the body through the lungs. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2007; 6: 67-74.
- [4] Harrison RM, Yin J. Particulate matter in the atmosphere: which particle properties are important for its effects on health? *Sci. Total Environ.* 2000; 249: 85-101.
- [5] Zhang Q, Pi J, Woods CG, Andersen ME. Phase I to II cross-induction of xenobiotic metabolizing enzymes: a feedforward control mechanism for potential hormetic responses. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2009, 237: 345-56.

- [6] Nebert DW, Dalton TP. The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 2009; 6: 947-60. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17128211>[7] Castell JV, Donato MT, Gómez-Lechón MJ. Metabolism and bioactivation of toxicants in the lung: The *in vitro* cellular approach. *Exp. Toxicol. Pathol.* 2005; 57: 189-204.
- [8] Kirsch-Volders M, Vanhauwaert A, Eichenlaub-Ritter U, Decordier I. Indirect mechanisms of genotoxicity. *Toxicol. Lett.* 2003; 141: 63-74.
- [9] André V, Billet S, Pottier, D, *et al.* Mutagenicity and genotoxicity of PM_{2.5} issued from an urbano-industrialized area of Dunkerque (France). *J. Appl. Toxicol.* 2011; 31: 131-38.
- [10] Abbas I, Garçon G, Saint-Georges F, *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbons within airborne particulate matter (PM_{2.5}) produced DNA bulky stable adducts in a human lung cell coculture model. *J. Appl. Toxicol.* 2013; 33:109-19.
- [11] Phillips DH, Castegnaro M. Standardization and validation of DNA adduct postlabelling methods: report of interlaboratory trials and production of recommended protocols. *Mutagenesis* 2009; 14: 301-15.
- [12] Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 1988; 175: 184-91.
- [13] Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, *et al.* The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 2008; 23: 143-51.
- [14] Mehri M, Youta Dombu C, Briant A, *et al.* Study of serum interaction with a cationic nanoparticle: Implications for *in vitro* endocytosis, cytotoxicity and genotoxicity. *Int. J. Pharmaceut.* 2012; 423: 37-44.
- [15] Ohnuki Y, Reddel RR, Bates SE, Lehman TA, Lechner JF, Harris CC. Chromosomal changes and progressive tumorigenesis of human bronchial epithelial cell lines. *Cancer Genet. Cytogenet.* 1996; 92: 99-110. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8976365>
- [16] Sheets PL, Yost GS, Carlson GP. Benzene metabolism in human lung cell lines BEAS-2B and A549 and cells overexpressing CYP2F1. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 2004; 18: 92-99.
- [17] Uppstad H, Øvrebø S, Haugen A, Møllerup S. Importance of CYP1A1 and CYP1B1 in bioactivation of benzo[a]pyrene in human lung cell lines. *Toxicol. Lett.* 2010; 192: 221-28. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19879933>[18] Claxton LD, Matthews PP, Warren SH. The genotoxicity of ambient outdoor air a review: Salmonella mutagenicity. *Mutat. Res.* 2004; 567: 347-99.
- [19] De Kok TM, Drieste HA, Hogervorst JG, Briedé JJ. Toxicological assessment of ambient and traffic-related particulate matter: a review of recent studies. *Mutat. Res.* 2006; 613: 103-22.
- [20] Risom L, Møller P, Loft S. Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutat. Res.* 2005; 592: 119-37. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16085126>
- [21] Grey CE, Adlercreutz P. Ability of antioxidants to prevent oxidative mutations in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutat. Res.* 2003, 527: 27-36.
- [22] ElAssouli SM, AlQahtani MH, Milaat W. Genotoxicity of air borne particulates assessed by comet and the *Salmonella* mutagenicity test in Jeddah, Saudi Arabia. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2007; 4: 216-33.
- [23] Gilli G, Pignata C, Schilirò T *et al.* The mutagenic hazards of environmental PM_{2.5} in Turin. *Environ. Res.* 2007; 103: 168-75.
- [24] Pastorková A, Cerná M, Smíd J, Vrbíková V. Mutagenicity of airborne particulate matter PM10. *Cent. Eur. J. Public Health* 2007; 12: 72-75. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15141986>[25] Traversi D, Degan R, De Marco R, *et al.* Mutagenic properties of PM_{2.5} urban pollution in the northern Italy: the nitro-compounds contribution. *Environ. Int.* 2009; 35: 905-10.
- [25] Traversi D, Degan R, De Marco R, *et al.* Mutagenic properties of PM25 urban pollution in the northern Italy: the nitro-compounds contribution. *Environ. Int.* 2009; 35: 905-10. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19406477>

- [26] Maeda T, Nakamura R, Kadokami K, Ogawa HI. Relationship between mutagenicity and reactivity or biodegradability for nitroaromatic compounds. *Environ. Toxicol. Chem.* 2007 ; 26 : 237-41.
- [27] Shimada T, Guengerich FP. Inhibition of human cytochrome P450 1A1-, 1A2-, and 1B1-mediated activation of procarcinogens to genotoxic metabolites by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chem. Res. Toxicol.* 2006; 19: 288-94.
- [28] Rushmore TH, Kong AT. Pharmacogenomics, regulation and signaling pathways of phase I and II drug metabolizing enzymes. *Curr. Drug Metab.* 2002; 3: 481-90.
- [29] 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.
- [30] Billet S, Abbas I, Goff JL, *et al.* Genotoxic potential of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons-coated onto airborne Particulate Matter (PM_{2.5}) in human lung epithelial A549 cells. *Cancer Lett.* 2008; 270: 144-55.
- [31] Øvrevik J, Arlt VM, Oya E, *et al.* Differential effects of nitro-PAHs and amino-PAHs on cytokine and chemokine responses in human bronchial epithelial BEAS-2B cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2010; 242: 270-80.
- [32] Bonetta S, Gianotti V, Bonetta S, *et al.* DNA damage in A549 cells exposed to different extracts of PM_{2.5} from industrial, urban and highway sites. *Chemosphere* 2009; 77: 1030-34.
- [33] Perrone MG, Gualtieri M, Ferrero L, *et al.* Seasonal variations in chemical composition and *in vitro* biological effects of fine PM from Milan. *Chemosphere* 2010; 78: 1368-77.
- [34] Falck GC, Lindberg HK, Suhonen S, *et al.* Genotoxic effects of nanosized and fine TiO₂. *Hum. Exp. Toxicol.* 2009; 28: 339-52.
- [35] Gábelová A, Valovicová Z, Bacová G, *et al.* Sensitivity of different endpoints for *in vitro* measurement of genotoxicity of extractable organic matter associated with ambient airborne particles (PM₁₀). *Mutat. Res.* 2007; 620: 103-13.
- [36] Knaapen AM, Shi T, Borm PJ, Schins RP. Soluble metals as well as the insoluble particle fraction are involved in cellular DNA damage induced by particulate matter. *Mol. Cell. Biochem.* 2002; 235: 317-26. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12162450>
- [37] Meng Z, Zhang Q. Damage effects of dust storm PM_{2.5} on DNA in alveolar macrophages and lung cells of rats. *Food Chem. Toxicol.* 2007; 45: 1368-74. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17336437>
- [38] Karlsson HL, Nygren J, Möller L. Genotoxicity of airborne particulate matter: the role of cell-particle interaction and of substances with adduct-forming and oxidizing capacity. *Mutat. Res.* 2004; 565: 1-10. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15576234>
- [39] Kirsch-Volders M, Plas G, Elhajouji A, *et al.* The *in vitro* MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. *Arch. Toxicol.* 2011; 85: 873-99.
- [40] Roubicek DA, Gutiérrez-Castillo ME, Sordo M *et al.* Micronuclei induced by airborne particulate matter from Mexico City. *Mutat. Res.* 2007; 631: 9-15.
- [41] Mateuca R, Lombaert N, Aka PV *et al.* Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie* 2006; 88: 1515-31.
- [42] Gábelová A, Valovicová Z, Horváthová E, *et al.* Genotoxicity of environmental air pollution in three European cities: Prague, Kosice and Sofia. *Mutat. Res.* 2004 ; 563 : 49-59. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15324748>
- [43] Gutiérrez-Castillo ME, Roubicek DA, Cebrián-García ME *et al.* Effect of chemical composition on the induction of DNA damage by urban airborne particulate matter. *Environ. Mol. Mutagen.* 2006; 47: 199-211. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16355389>