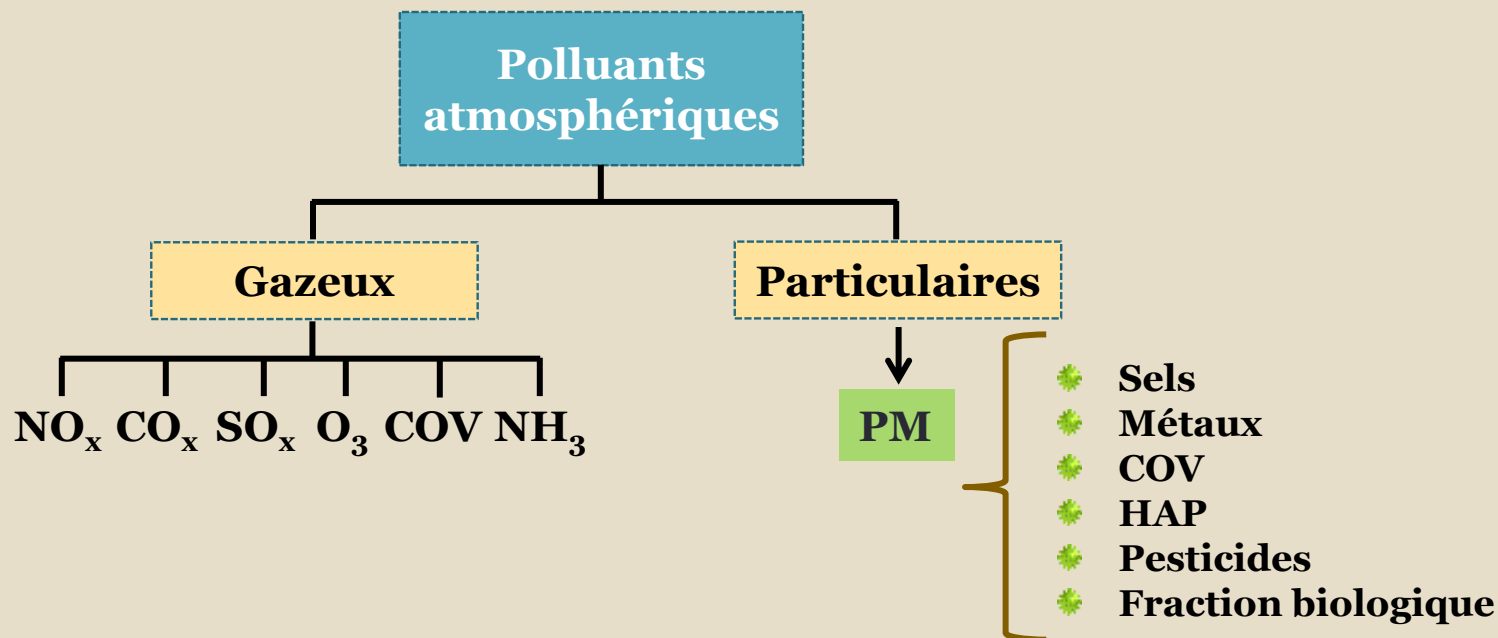


Caractérisation chimique et évaluation des propriétés cytotoxiques, pro-inflammatoires et génotoxiques de particules fines en suspension dans l'air en milieu rural

La pollution atmosphérique est connue comme étant un facteur de risque majeur pour la santé humaine (*Pope et al., 2009*)

Classée récemment cancérigène certain pour l'Homme (*CIRC, 2013*)



INTRODUCTION

Interaction des PM avec l'appareil respiratoire

3

Fosses nasales,
pharynx et larynx

PM > 10 μm

Trachée, bronches
et bronchioles

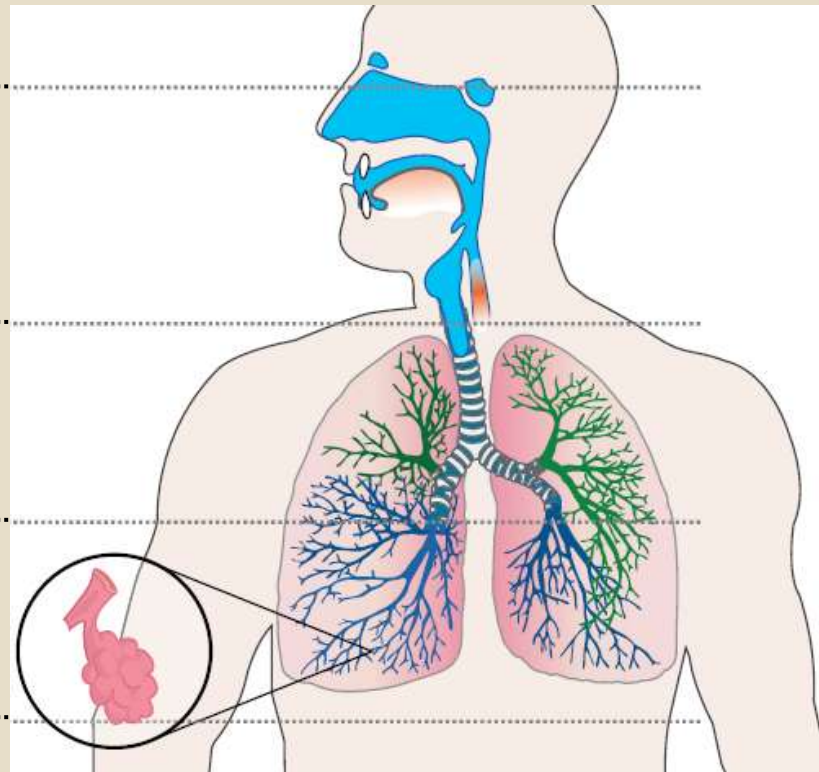
PM < 10 μm

Alvéoles
pulmonaires

PM < 2,5 μm

Tissus pulmonaires,
circulation sanguine

PM < 0,1 μm



(d'après ERS, 2010)

■ Etudes épidémiologiques

🌐 Exposition aux $PM_{2,5}$:

- ✱ ↑ Maladies cardiovasculaires (*Puett et al., 2011*)
- ✱ ↑ Maladies respiratoires : asthme, bronchite et BPCO (*Silverman et Ito, 2009 ; Tsai et al., 2013*)

🌐 ↑ $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de $PM_{2,5}$:

- ✱ ↑ 26 % du risque de mortalité par cause cardio-vasculaire (*Lepeule et al., 2012*)
- ✱ ↑ 8 % de l'incidence du cancer pulmonaire (*ERS, 2010*)

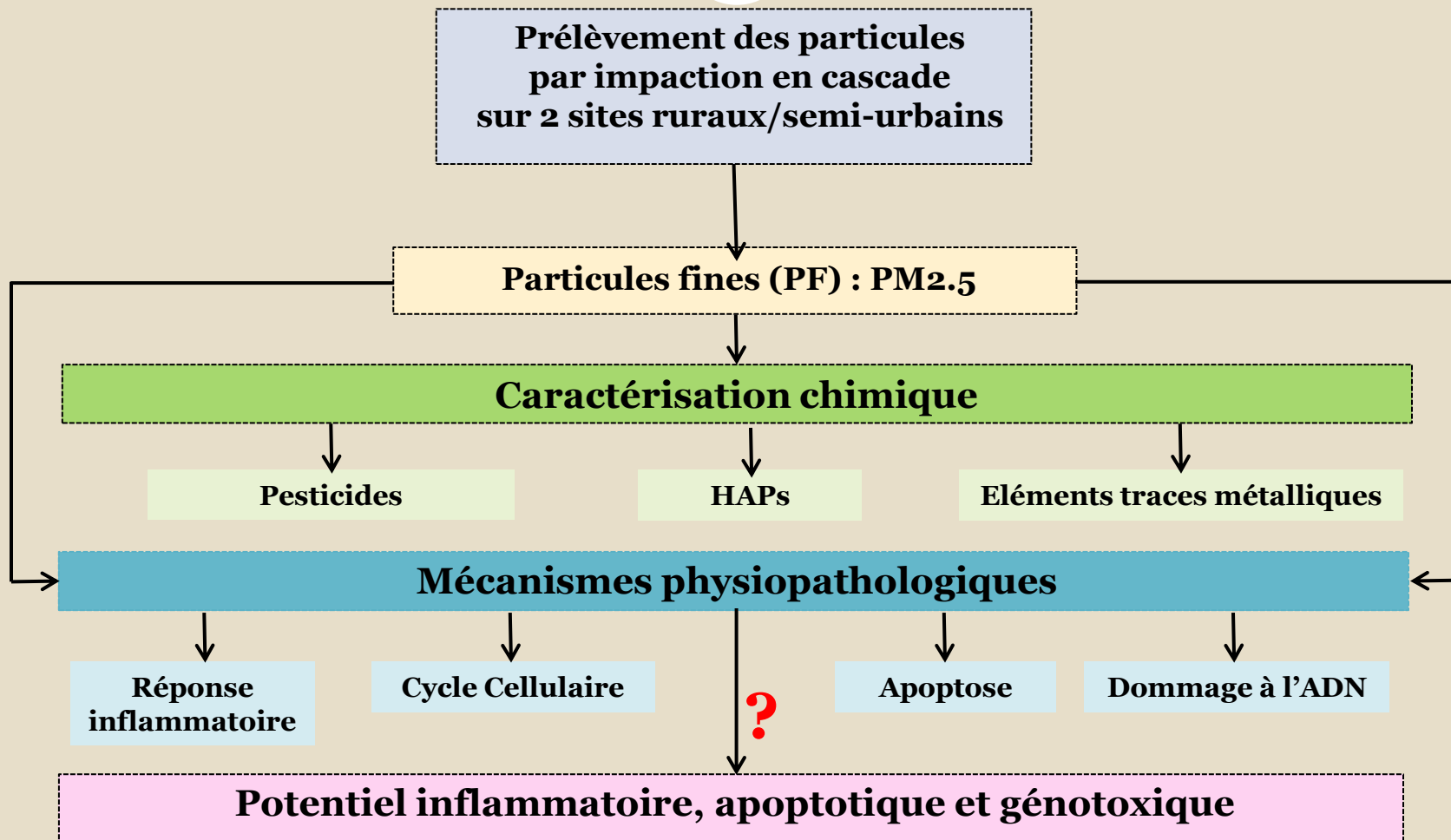
Des études supplémentaires sont indispensables afin de mieux comprendre :

- leur implication dans l'apparition de pathologies respiratoires
- le rôle des différents composés qui constituent les particules

OBJECTIFS

Approche méthodologique

5



PLAN

6

• **Introduction**

• **Objectifs**

• **Matériels et méthodes**

• **Echantillonnage des PM**

• **Résultats et discussion**

• **Analyse chimique**

• **Analyse toxicologique**

• **Conclusion générale**

• **Perspectives**

MATÉRIELS ET MÉTHODES

■ Méthodologie de prélèvement

7

Echantillonnage des PM_{2.5}

🌿 L'échantillonnage des particules :

🌿 Spycker: mai – novembre 2015

🌿 Wormhout: mai – novembre 2015



Impacteur en cascade :

- 🌿 **Staplex® modèle 236, USA**
- 🌿 **Haut débit : 42 m³/h**
- 🌿 **6 étages + filtre d'arrêt**

PLAN

8

• **Introduction**

• **Objectifs**

• **Matériels et méthodes**

• Echantillonnage des PM

• **Résultats et discussion**

• Analyse chimique

• Analyse toxicologique

• **Conclusion générale**

• **Perspectives**

Pesticides

- ✿ **Extraction au dichlorométhane par ASE**
- ✿ **Dosage par GC-MS et LC-QTOF**

HAP

- ✿ **Extraction au dichlorométhane par ASE**
- ✿ **Dosage par GC-MS : 16 HAP**

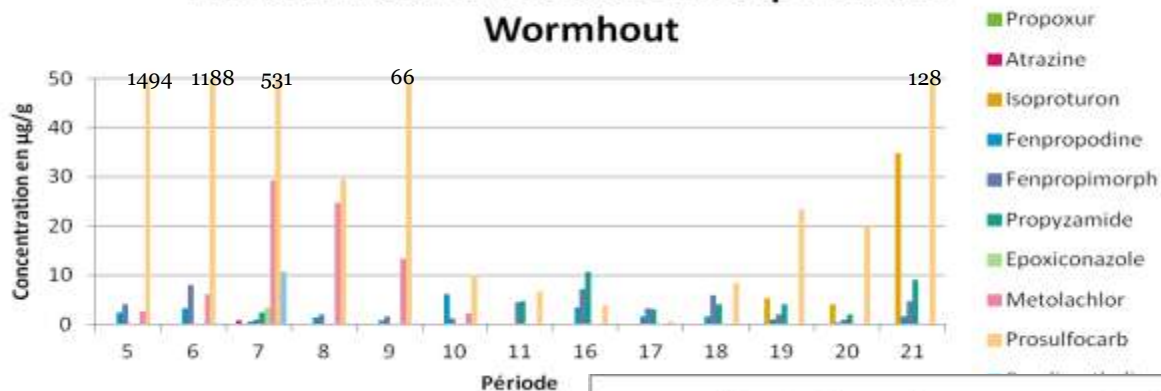
MATÉRIELS ET MÉTHODES

■ Échantillons de PM

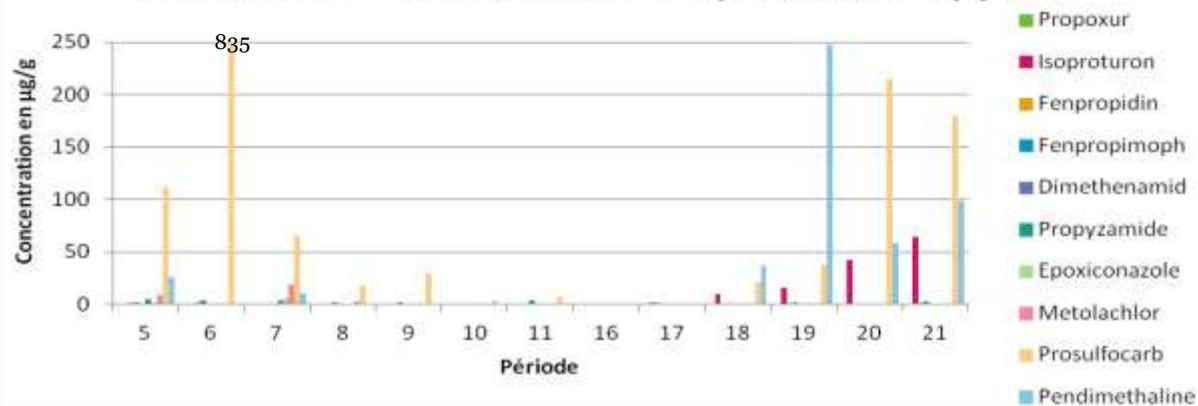
Préparation des échantillons de PM_{2.5} pour les études toxicologiques

10

Evolution des concentrations en pesticides - Wormhout



Evolution des concentrations en pesticides - Spycker



Ces échantillons individuels ont été analysés de manière à étudier l'évolution des concentrations en pesticides durant les différentes périodes d'échantillonnage

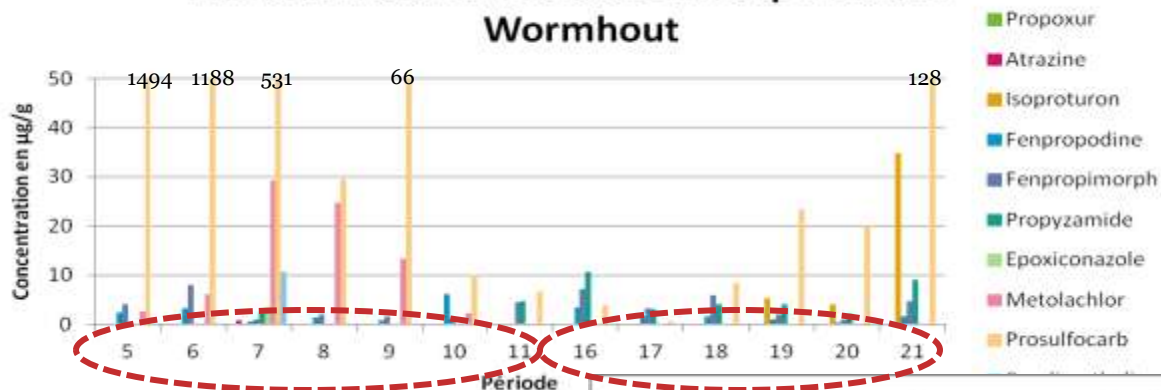
MATÉRIELS ET MÉTHODES

■ Échantillons de PM

Préparation des échantillons de PM_{2.5} pour les études toxicologiques

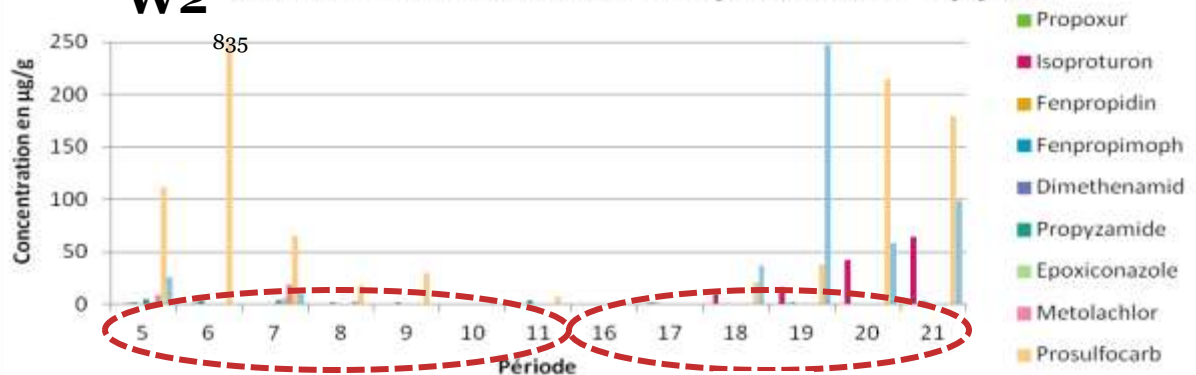
11

Evolution des concentrations en pesticides - Wormhout



W1

Evolution des concentrations en pesticides - Spycker



S1

S2

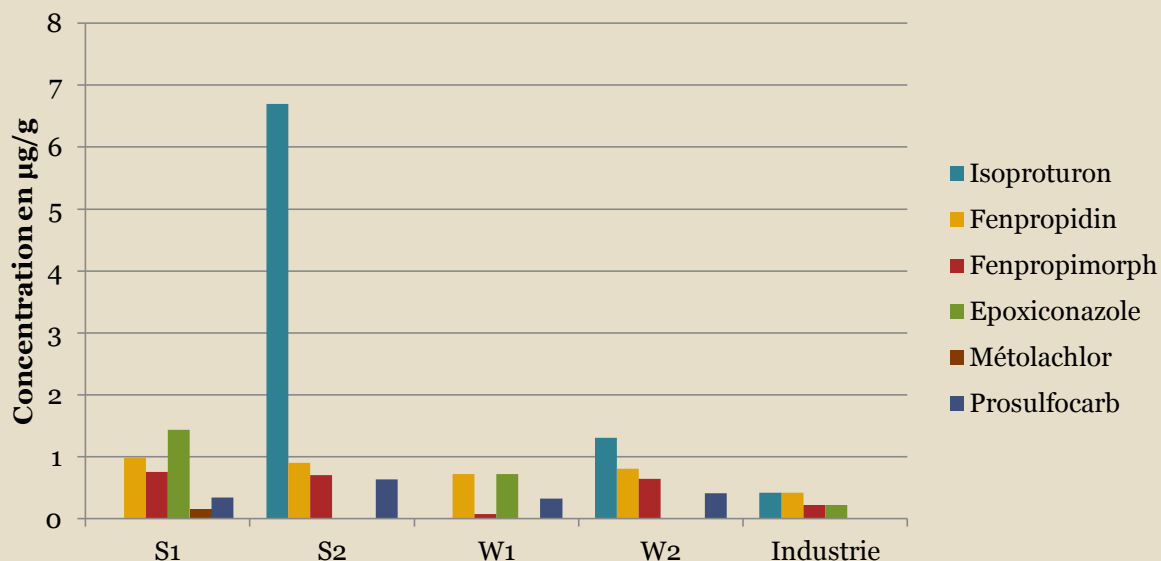
Échantillons
composites de
particules fines

Regroupement des échantillons 5 à 11 puis 16 à 21 pour les 2 sites : W1, S1, W2, S2

■ Pesticides

12

Concentrations en pesticides



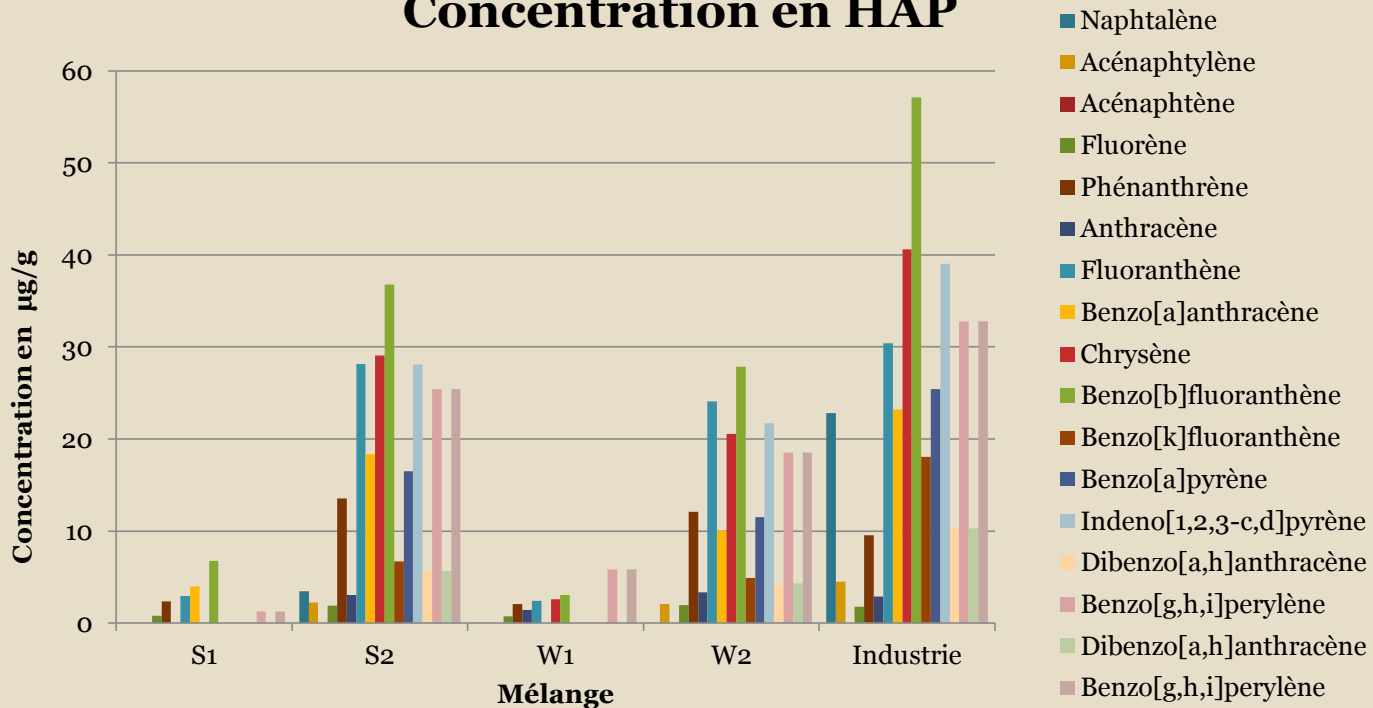
✿ Profils similaires pour les périodes 1 et 2 : effet saisonnier

✿ Quantités supérieures en périodes 2

■ HAP

13

Concentration en HAP



✿ Les teneurs en HAP sont plus élevées dans les échantillons de la période 2 et dans l'échantillon industriel

PLAN

14

- **Introduction**

- **Objectifs**

- **Matériels et méthodes**

- **Echantillonnage des PM**

- **Analyse chimique**

- **Analyse toxicologique**

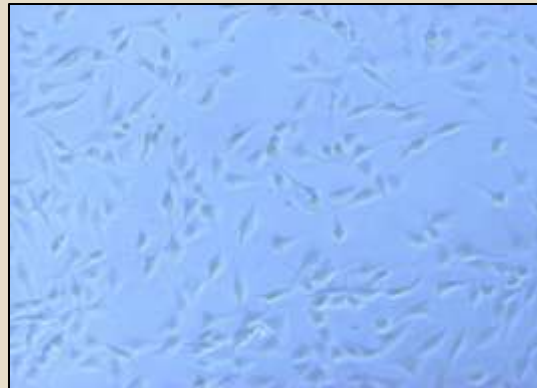
- **Résultats et discussion**

- **Conclusion générale**

- **Perspectives**

■ Matériel biologique

- ✿ Lignée cellulaire : BEAS-2B / ECACC - référence 95102433
- ✿ Cellules épithéliales bronchiques humaines
- ✿ Non cancéreuses
- ✿ Infection par le virus hybride Ad12-SV40
- ✿ Capacités métaboliques (*Garcia-Canton et al., 2013 ; Uppstad et al., 2010*)



Cellles BEAS-2B (x100)

MATÉRIELS ET MÉTHODES

■ Mécanismes physiopathologiques

Analyse toxicologique

16

Réponse
inflammatoire

Cytotoxicité
(LDH et DHm)

Indicateurs d'arrêt du cycle
cellulaire

Indicateurs
d'apoptose

Indicateurs de
dommage à
l'ADN/réparation

- ✿ Cellules BEAS-2B (24 et 48h)
- ✿ PM_{2.5} rurales (S1, S2, W1 et W2)
- ✿ EO PM_{2.5} (S1EO, S2EO, W1EO et W2EO)
- ✿ PM_{2.5} industrielles
- ✿ Mélange de pesticides commerciaux

PLAN

17

- **Introduction**

- **Objectifs**

- **Matériels et méthodes**

- **Résultats et discussion : Effets toxicologiques des PM**

- **Conclusion générale**

- **Perspectives**

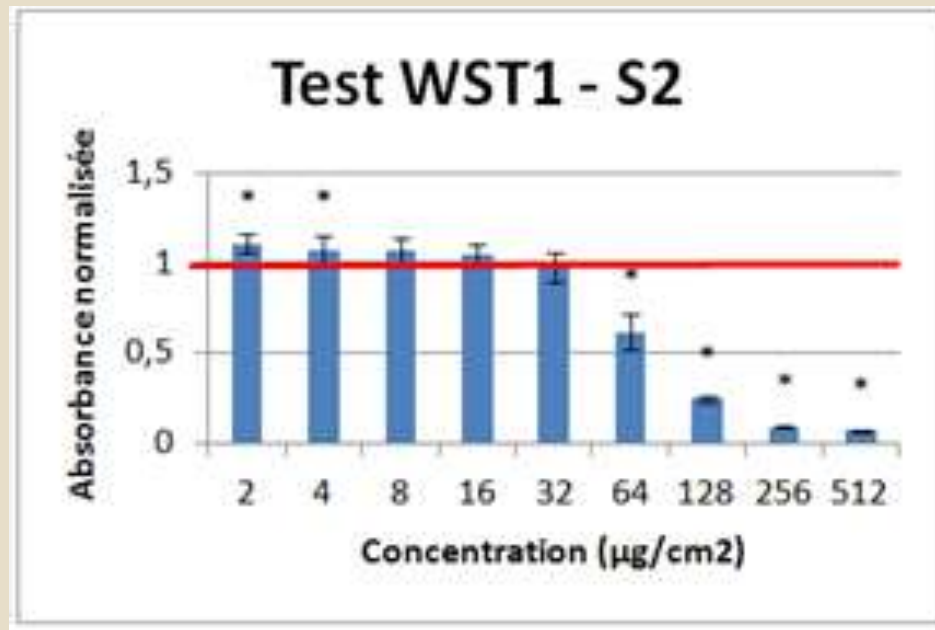
RÉSULTATS ET DISCUSSION

■ Cytotoxicité

Étude toxicologique des PM

18

Détermination des concentrations d'intérêt



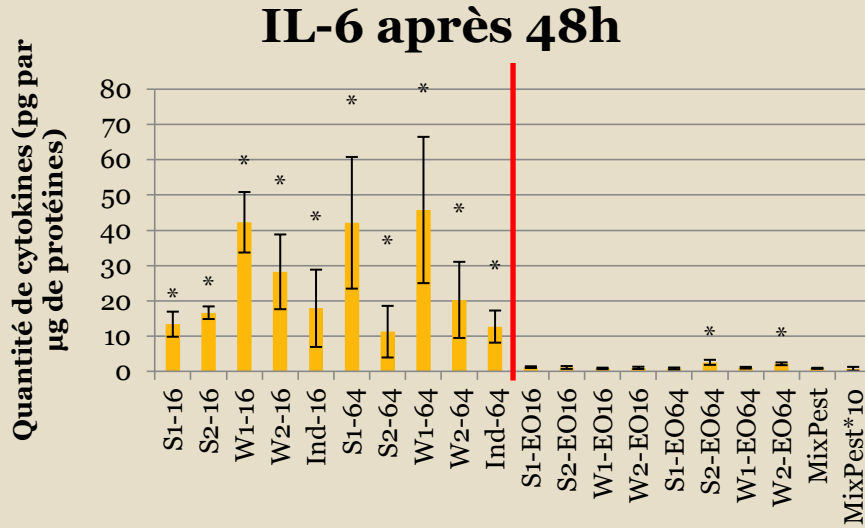
- ✿ **Profils similaires pour chaque échantillon**
 - **Concentration non létale : 16 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$**
 - **Concentration modérément létale: 64 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$**

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Réponse inflammatoire

19

Étude toxicologique des PM



- ★ Profils similaires pour les 2 interleukines
- ★ Effets inflammatoires plus prononcés pour l'exposition aux particules
- ★ Relation dose/réponse (16 ou 64)
- ★ Réponse plus importante pour la période1 (S1 et W1)
- ★ Léger effet pour les EO et le mélange de pesticides commerciaux

Quantité de cytokines (pg par µg de protéines)

○ Site+N°échantillon – Concentration

○ EO = Extrait organique

IL-8 après 48h

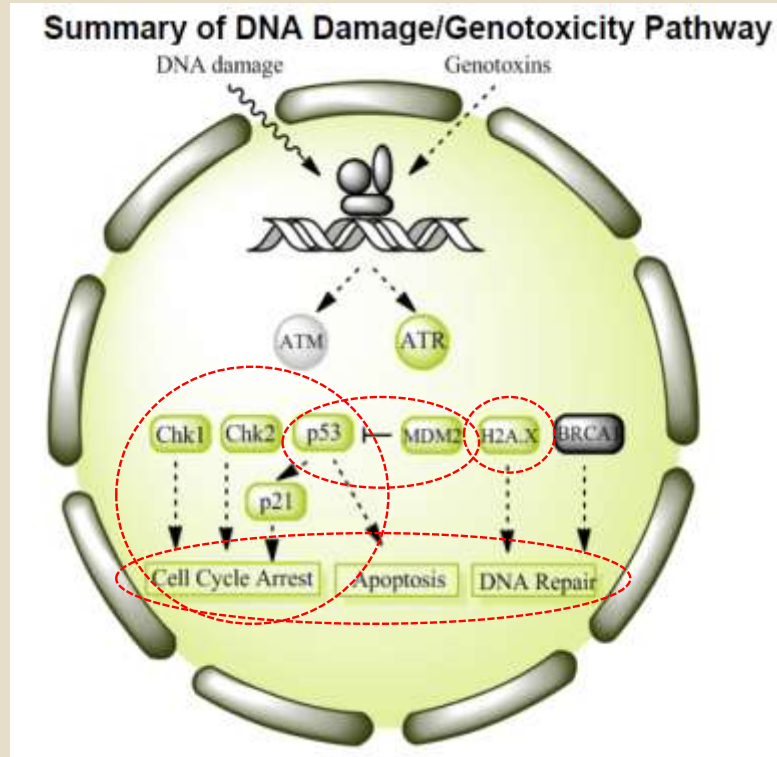


RÉSULTATS ET DISCUSSION

■ Evaluation du potentiel génotoxique

Étude toxicologique des PM

20



- ATM: Ataxia Telangiectasia Mutated
- ATR: Ataxia Telangiectasia and Rad3-Related protein
- Chk: Checkpoint kinase
- MDM2: Murine Double Minute 2
- H2A.X: Histone

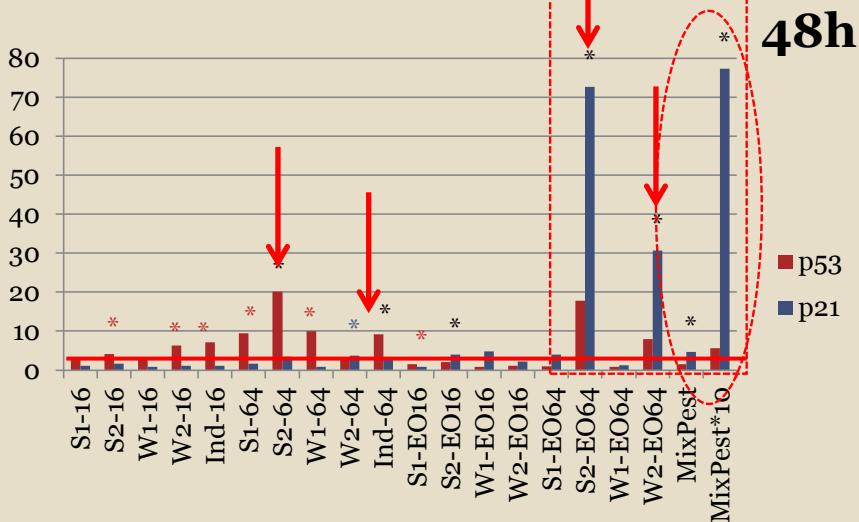
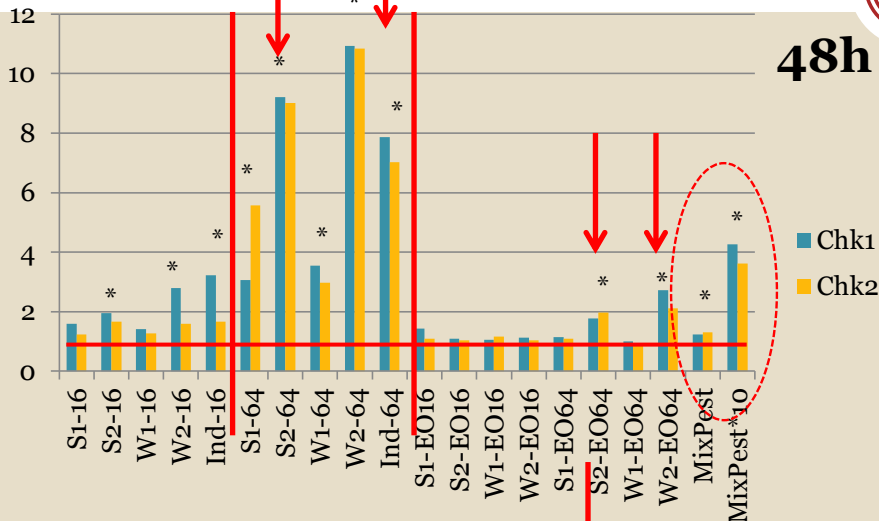
- 5 biomarqueurs – 4 actions différentes
- Protéines Chk1 et Chk2: interruption du cycle cellulaire lors des transitions
- Protéine P53 suppresseur de tumeur, si phosphorylé → production de p21
- H2A.X: indicateur de cassures double brin de l'ADN

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Evaluation du potentiel génotoxique

Étude toxicologique des PM

21



➤ Chk1, Chk2, p53 et p21 : Arrêt du cycle cellulaire

- Effet toujours plus marqué à 48h
- Observations pour Chk1, Chk2 et p53:
 - Relation dose/réponse
 - S2, W2 et Ind effets plus marqués ainsi que leur EO
 - Réponse pour le mélange de pesticides
- Observation p21:
 - Effet majeur pour les EO et les mélanges de pesticides

Arrêt du cycle cellulaire plus marqué pour S2, W2 et leur EO et les mélanges de pesticides

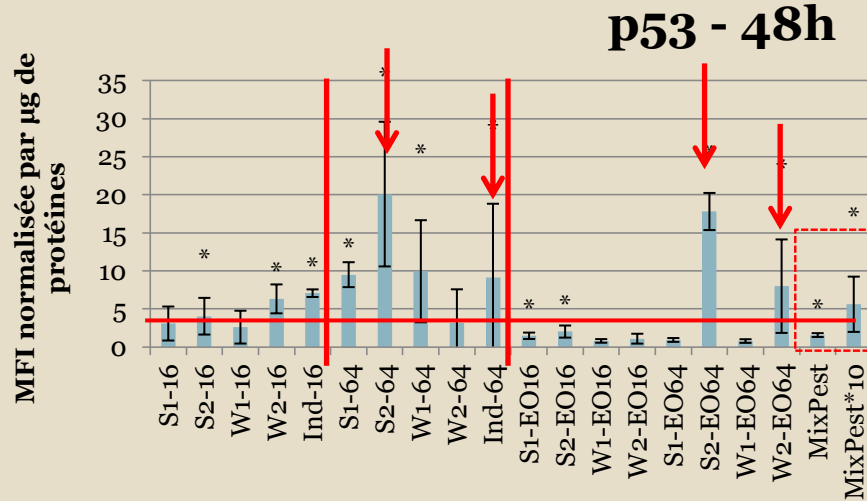
RÉSULTATS ET DISCUSSION

■ Evaluation du potentiel génotoxique

Étude toxicologique des PM

22

➤ P53 : Apoptose (mort cellulaire programmée)



- Effet plus marqué à 48h
- Observations:
 - Relation dose/réponse
 - S2, W2 et Ind effets plus marqués
 - EO de S2 et W2: réponse importante
 - Réponse pour le mélange de pesticides

Présence de biomarqueurs indiquant l'apoptose pour S2, W2 et leur EO et les mélanges de pesticides

RÉSULTATS ET DISCUSSION

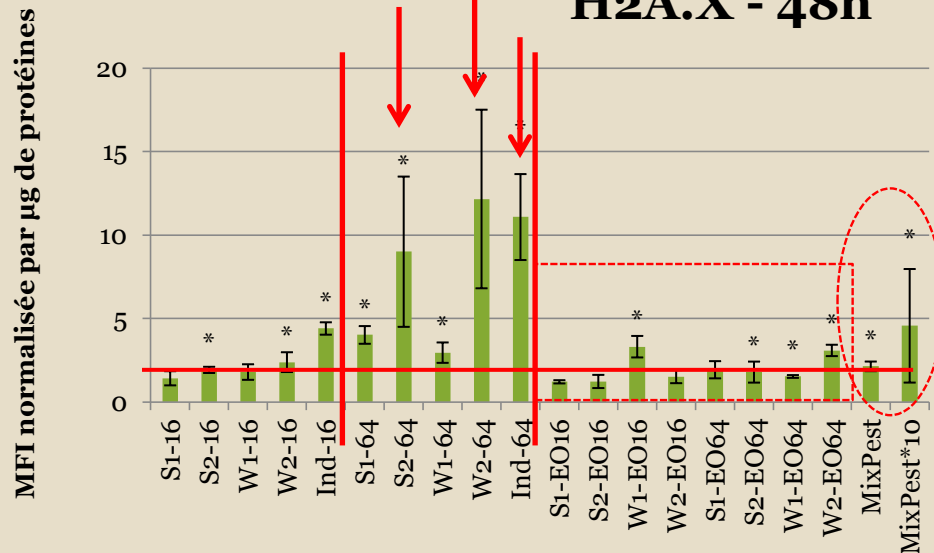
■ Evaluation du potentiel génotoxique

Étude toxicologique des PM

23

➤ H2A.X indiquant l'atteinte à l'ADN et sa réparation:

H2A.X - 48h



- Effet toujours plus marqué à 48h
- Observations:
- Relation dose/réponse
- S2, W2 et Ind effets plus marqués
- Moins de réponse pour les EO
- Réponse pour le mélange de pesticides

Indicateur de dommages à l'ADN (cassures et réparations) pour S2, W2 et les mélanges de pesticides

PLAN

24

- **Introduction**

- **Objectifs**

- **Matériels et méthodes**

- **Résultats et discussion**

- **Conclusion générale**

- **Perspectives**

CONCLUSION GÉNÉRALE

25

- Effets plus marqués après exposition:
 - aux $PM_{2.5-0.3}$ ($64 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)
 - aux extraits organiques ($64 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)
 - de 48h
- Effet inflammatoire : échantillons printaniers (fraction biologique des particules et ETM ?)
- Génotoxicité : effet notable pour échantillons automnaux et Ind et leur EO ($64 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) : riches en HAP et en pesticides
- Effets notables : mélanges pesticides

PLAN

26

- **Introduction**

- **Objectifs**

- **Matériels et méthodes**

- **Résultats et discussion**

- **Conclusion générale**

- **Perspectives**

- Dosage des ETM
- Dopage des échantillons de PM par des pesticides
- Dosage de toxines bactériennes et fongiques
et dénombrement/identification des espèces microbiennes
- Etude du cycle cellulaire

Merci de
votre
attention

3^{ème}
COLLOQUE INTERNATIONAL FRANCOPHONE
EN ENVIRONNEMENT ET SANTÉ

23 ET 24 OCTOBRE 2017

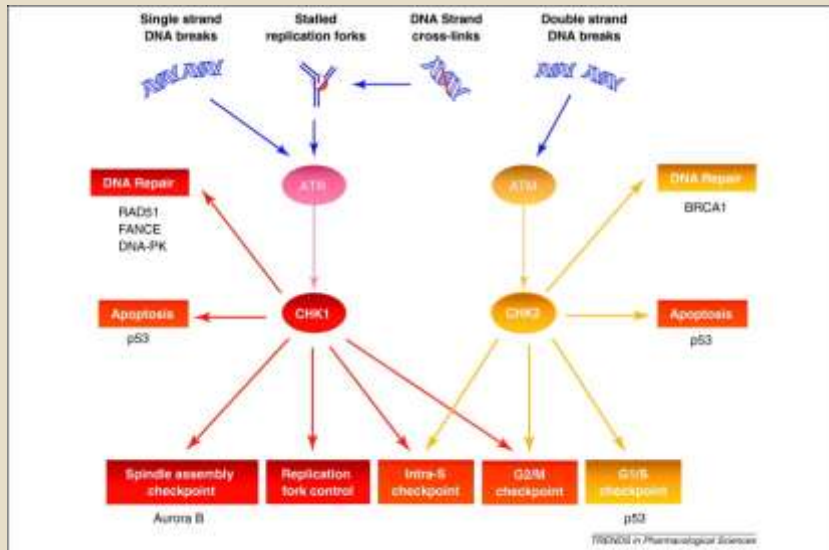
ULCO - 59375 Dunkerque - France



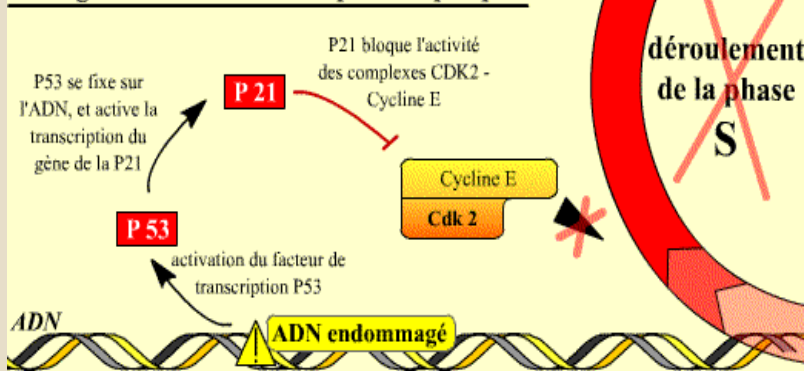
Première circulaire & Appel à communications
<http://ces.univ-littoral.fr/>

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Rôle de Chk1 et Chk2 (rappel)



blocage de l'initiation de la phase S par p53

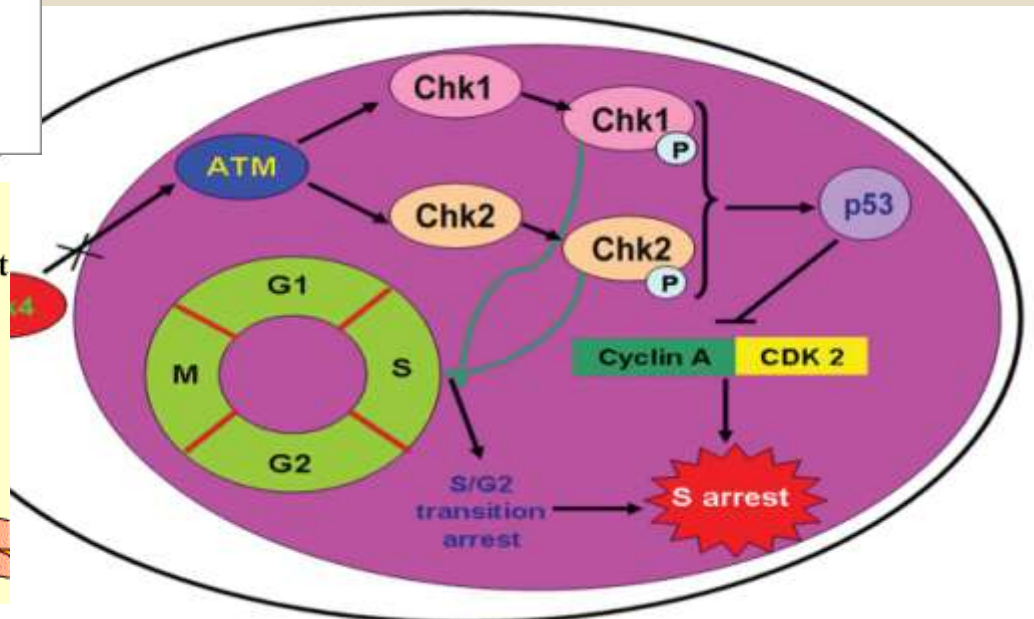


29

Étude toxicologique des PM

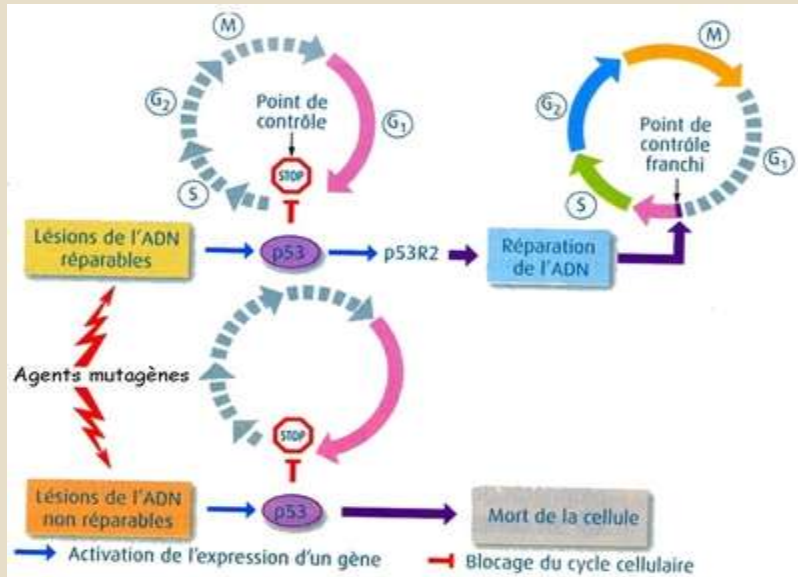
Chk1 et Chk2 sont des points de contrôle capables :

- d'induire l'arrêt du cycle cellulaire
- d'initier l'entrée de la cellule sur la voie de l'apoptose

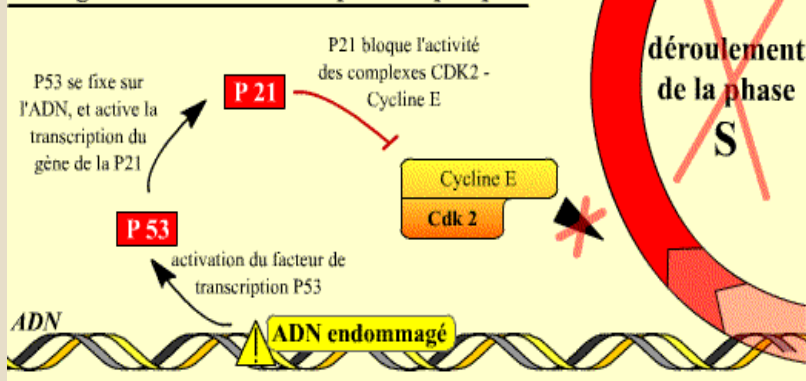


RÉSULTATS ET DISCUSSION

Rôle de P53 (rappel)



blocage de l'initiation de la phase S par p53



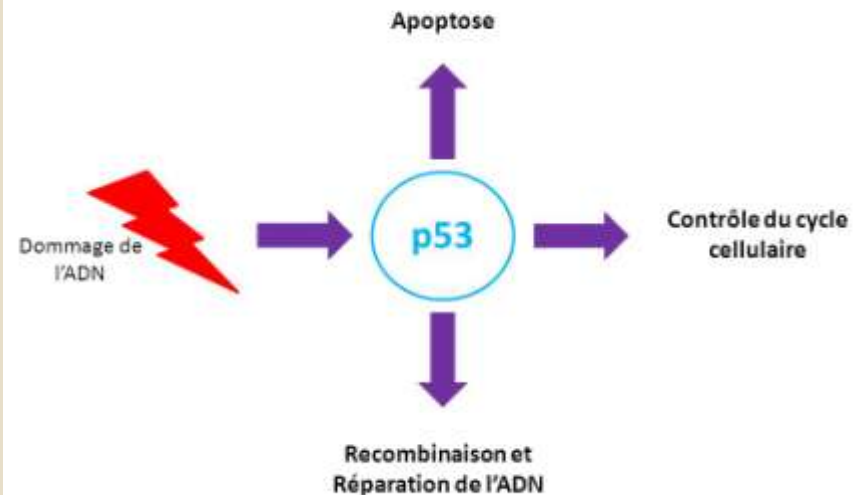
Étude toxicologique des PM

30

P53 capable :

- d'induire l'arrêt du cycle cellulaire
- d'initier l'entrée de la cellule sur la voie de l'apoptose si réparation inefficace

Rôle de p53

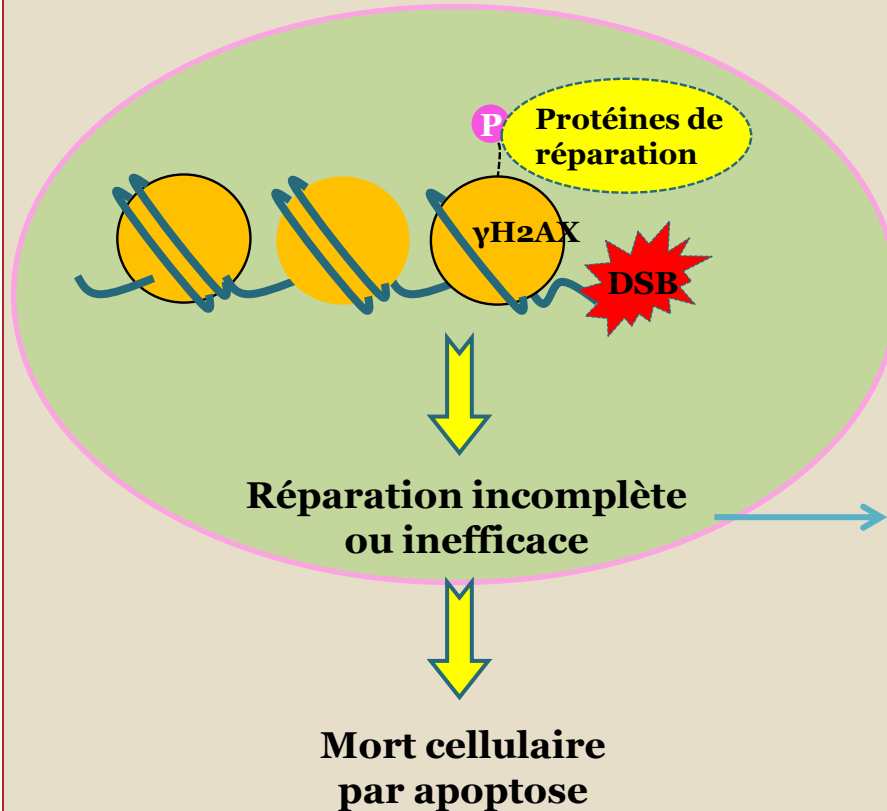


RÉSULTATS ET DISCUSSION

Phosphorylation de H2AX (rappel)

31

Étude toxicologique des PM



(Su, 2006)

- * γ H2AX : réponse précoce aux cassures double-brin de l'ADN (DSB)
- * Signal majeur pour le recrutement des protéines de réparation de l'ADN dans les régions endommagées

Mutations ou translocations chromosomiques

Instabilité génomique

développement du cancer

(Jeggo et Lobrich 2007 ; McKinnon et Caldecott , 2007)