AIX-MARSEILLE UNIVERSITE

INSTITUT MEDITERRANEEN DE BIODIVERSITE ET D'ECOLOGIE MARINE ET CONTINENTALE

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT
SPECIALITE ECOLOGIE

Thèse présentée pour obtenir le grade universitaire de Docteur d'Aix-Marseille Université

Sophie PLUMEJEAUD

Evaluation des potentiels génotoxiques de particules atmosphériques et de poussières de sols dans les Observatoires Hommes – Milieux du Bassin Minier de Provence et d'Estarreja

Soutenue le 19/01/2016 devant le jury :

M. le Docteur Ludovic Le Hegarat	Rapporteur
Mme le Docteur Anne-Marie Guihard Costa	Rapporteure
M. le Professeur Thierry Tatoni	Examinateur
Mme le Docteur Paula Marinho	Examinatrice
M. le Docteur Yves Noack	Co-directeur de thèse
M. le Docteur Thierry Orsière	Directeur de thèse

Thèse réalisée à l'IMBE, dans l'équipe de Biogénotoxicologie, Santé Humaine et environnement.

Financements

Bourse doctorale

Ce travail de thèse a été financé par le Labex DRIIHM (Laboratoire d'excellence, Dispositif de Recherche Interdisciplinaire sur les Interactions Hommes-Milieux) et par le réseau des OHM (Observatoire Hommes-Milieux).

Financement du travail de thèse

ECCOREV 2012

ECCOREV 2013

PRSE (Plan Régional Santé Environnement) ARS-DREAL-CR 2014

Remerciements

Je souhaite remercier l'Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie marine et continentale (IMBE) de m'avoir acceuillie dans l'équipe de Biogénotoxicologie, Santé Humaine et Environnement pour y effectuer mes travaux de thèse. Je remercie également le Labex DRIIHM de m'avoir permis de réaliser ces trois années de thèse grâce à la bourse doctorale dont j'ai bénéficiée.

A Monsieur le Docteur Thierry Orsière,
Je te remercie de m'avoir encadré dans la réalisation de ce travail, non seulement pour tes connaissances dans le domaine de la toxicologie génétique mais aussi pour tes qualités humaines. Merci pour ta disponibilité, tes conseils et pour m'avoir permis d'évoluer librement.

A Monsieur le Docteur Yves Noack,
Je vous remercie d'avoir co-encadré ma thèse et de m'avoir permis de découvrir le domaine des géosciences, jusqu'alors inconnu. Je me rappelle avec grand plaisir certains moments de « terrain » comme la collection de feuilles et de poussières au Portugal.

A Monsieur le Docteur Ludovic Le Hegarat,
Tu me fais l'honneur d'avoir accepté de rapporter mon travail de thèse et je t'en remercie ainsi que pour nos échanges constructifs lors des congrès de la SFTG. Je regrette de ne pas avoir pu venir à Fougères apprendre à me servir de l'Array-Scan.

A Madame le Professeur Anne-Marie Guihard Costa,
Je vous remercie d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse, de m'avoir permis de valoriser mon manuscrit et de me faire l'honneur de siéger dans ce jury. Veuillez croire en mes sentiments les plus respectueux.

A Monsieur le Professeur Thierry Tatoni,
Vous me faites l'honneur de siéger dans ce jury et ce malgré vos multiples responsabilités. Je vous en remercie vivement.

A Madame le Docteur Paula Marinho,
I would like to thank you for being present during my thesis defense and for giving me useful and constructive advises. It has always been a pleasure to meet you either in Portugal or in France.

A special thanks to Carla Patinha who taught me the UBM method, for her kindness and generosity.

Je souhaite remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont participé à ce travail. Je pense aux personnes de l'équipe BSHE bien sûr, mais aussi à Aurélie Bonnefoy, à l'équipe d'AirPaca, l'équipe ESPACE, et enfin aux membres d'ECCOREV, des OHM BMP et Estarreja. Je tiens également à remercier Kankoé Sallah pour son aide précieuse dans traitement des données statistiques.

Merci à toute l'équipe de Biogénotoxicologie (Thierry, Blandine, Jeanne, Xavier, Vincent, Irène, Isabelle, Joss, Claire, Chiara et Virginie) et aux étudiants, présents et passés (Raphaël, Laure, Fanny, Lise, Eva, Lucie, Pierre et Mathieu), qui ont rendu ces quatre années passées au laboratoire des plus agréables, entre les pauses café et tous ces matins viennoiseries (mes cuisses s'en souviendront !).

A mes amis qui sont toujours présents. J'ai pu grâce à vous prendre des bols d'air dans mon quotidien et avoir des gens sur qui compter.

Je suis plus que reconnaissante envers ma mère qui a toujours été présente, pour son écoute et qui a, pour la seconde fois, relu et corrigé une thèse. A mes parents tout simplement…

A Bertrand qui m'a soutenu avec patience et amour.

A tous ceux qui ont croisé ma route durant ces trois ans et que je n'ai pas mentionné. Toute ma gratitude vous revient à tous, merci.

Sommaire

FINANCEMENTS **1**

LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES **I**

TABLEAUX I

FIGURES I

LISTE DES PAPIERS ET COMMUNICATIONS **I**

PAPIERS I

COMMUNICATIONS ORALES I

COMMUNICATIONS AFFICHEES II

ABREVIATIONS **IV**

PARTIE I. OBJECTIFS DE LA THESE **1**

PARTIE II. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE **6**

I. LES PARTICULES FINES 6

1.1 Généralités *6*

1.2 Caractéristiques physico-chimiques *7*

1.3 Impacts sanitaires liés à l'exposition aux $PM_{2.5}$ *12*

1.4 Toxicité des $PM_{2.5}$: mécanismes d'action *15*

1.5 Règlementation *21*

II. LES POUSSIERES DE SOLS INTERIEURS 22

2.1 Généralités *22*

2.2 Caractéristiques physico-chimiques *25*

2.3 Impacts sanitaires liés à l'exposition aux EPTs *28*

2.4 Toxicité des EPTs : mécanismes d'action *29*

III. GENOTOXICITE 33

3.1 Génotoxicité, mutagenèse et cancérogenèse *33*

3.2 Atteintes à l'ADN, la génotoxicité *35*

3.3 Les systèmes de réparation de l'ADN *40*

3.4 Mise en évidence de la génotoxicité *45*

PARTIE III. LES OBSERVATOIRES HOMMES-MILIEUX **52**

I. LES OBSERVATOIRES HOMMES-MILIEUX 52

II. BASSIN MINIER DE PROVENCE 53
III. ESTARREJA 55

PARTIE IV. MATERIELS ET METHODES 56

I. SITES DE PRELEVEMENTS 56
1.1 Etude des particules atmosphériques fines dans l'OHM-BMP : caractérisation et génotoxicité 56
1.2 Etude des poussières de sols, mise au point d'une approche méthodologique 58
1.3 Etude des poussières de sols intérieurs et extérieurs à Trets 59
II. CARACTERISATION CHIMIQUE 60
2.1. Fraction inorganique par ICP-MS 60
2.2 Fraction organique par GC-MS 61
III. METHODE UBM, EXTRACTION DES COMPOSES BIOACCESSIBLES 62
IV. CHOIX DES TYPES CELLULAIRES 63
4.1 Type cellulaire pulmonaire 63
4.2 Type cellulaire gastrique 63
V. TEST DE CYTOTOXICITE *IN VITRO* : XTT ET WST-1 64
5.1 Protocole 64
5.2 Quantification et analyse 65
VI. TEST DE GENOTOXICITE *IN VITRO* 65
6.1 Test du micronoyau avec marquage centromérique 65
6.2 Test des comètes en milieu alcalin 69
VII. TEST STATISTIQUES 71
7.1 ANOVA 71
7.2 Analyse de la composante principale (PCA) 71
7.3 Corrélation de Spearman 72

PARTIE V. RESULTATS ET DISCUSSION 73

I. PARTICULES ATMOSPHERIQUES FINES DANS L'ANCIEN BASSIN MINIER DE PROVENCE, FRANCE : CARACTERISATION ET GENOTOXICITE 73
1.1 Introduction 73
1.2 Résultats et discussion 100
1.3 Conclusion 104
II. POUSSIERES DE SOLS INTERIEURS ET ELEMENTS POTENTIELLEMENT TOXIQUES PROVENANT D'ESTARREJA, PORTUGAL : CARACTERISATION ET GENOTOXICITE DE LA FRACTION BIOACCESSIBLE 105
2.1 Introduction 105

2.2 Résultats et discussion *130*

2.3 Conclusion *133*

III. POUSSIERES DE SOLS INTERIEURS ET EXTERIEURS PROVENANT D'UNE ECOLE MATERNELLE DE TRETS : CARACTERISATION ET GENOTOXICITE DE LA FRACTION BIOACCESSIBLE – DONNEES PRELIMINAIRES 134

3.1 Introduction *134*

3.2 Matériel et méthodes *134*

3.3 Résultats *135*

PARTIE VI. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES **142**

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES **150**

SITES INTERNET 170

Liste des tableaux et des figures

Tableaux

Tableau 1. Démarche méthodologique de la thèse 5

Tableau 2. EPTs cancérogènes avérés pour l'Homme, organes cibles avec suffisamment de preuves ou des preuves limitées (IARC International Agency for Research on Cancer 2012) 29

Tableau 3. Coordonnées géographiques des sites de prélèvement 57

Tableau 4. Composition des fluides utilisés pour l'extraction gastrique 62

Tableau 5. Synthèse des données obtenues sur les concentrations en $PM_{2.5}$, métaux et HAPs sur les cinq sites au cours des deux saisons 100

Tableau 6. Récapitulatif des effets génotoxiques par site, en fonction des phases d'extraction et des saisons 102

Tableau 7. Récapitulatif des effets génotoxiques par sites en fonction des saisons 103

Tableau 8. Tableau récapitulatif des effets génotoxiques observés après exposition des cellules AGS aux extraits gastriques 137

Tableau 9. Concentration en composés inorganiques (mg/kg) dans les poussières de sols sur les sites de prélèvement dans l'école de Trets 142

Tableau 10. Concentration en composés inorganiques (mg/kg) dans les extraits gastriques et la fraction bioaccessible (%) 143

Tableau 11. Principaux résultats, conclusion et perspectives des trois études réalisées 150

Figures

Figure 1. Distribution des PM dans l'appareil respiratoire en fonction de leur granulométrie 9

Figure 2. Processus microphysiques influençant la formation de l'aérosol atmosphérique (Raes et al., 2000) 10

Figure 3. Composition chimique annuelle des $PM_{2.5}$ dans différents sites européens (Fin= Finlande, N = Norvège, CH = Suisse, A = Autriche, B = Belgique, D = Allemagne, I = Italie, E = Espagne) (Putaud et al., 2004) 12

Figure 4. Exposition aux polluants atmosphériques pro-oxydants et déséquilibres engendrés (Delfino et al., 2011) 17

Figure 5. Inductions intracellulaires liées au PM2.5 et mécanismes extracellulaires dans le poumon (Michael et al., 2013) 18

Figure 6. Bioaccessibilité orale suite à l'ingestion de poussières de sols (Gardeur-Algros, 2013) 26

Figure 7. Test *in vitro* de bioaccessibilité (Gardeur-Algros, 2013) 28

Figure 8. ERO induites par les EPTs et augmentation du risque carcinogène (Lee et al., 2012) 30

Figure 9. Modèles d'EPTs induisant un stress oxydant à l'origine du développement tumoral, interaction avec les structures protéiques sensibles à l'oxydo-réduction et conséquences cellulaires (Jomova and Valko, 2011) 32

Figure 10. Atteintes génotoxiques de l'ADN et conséquences (d'après Hoeijmakers, 2001) 35

Figure 11. Diversité des dommages à l'ADN et des mécanismes de réparation correspondants (http://www.snv...html) 44

Figure 12. Organites cellulaires et cibles des tests de cytotoxicité 47

Figure 13. Mécanisme de formation de micronoyaux et marquage centromérique 50

Figure 14. Principe général de la préparation de S9 mix 51

Figure 15. Sites de prélèvement des $PM_{2.5}$ au sein de l'OHM-BMP et sa localisation géographique 57

Figure 16. Sites de prélèvement des poussières au sein de l'OHM Estarreja et sa localisation géographique 59

Figure 17. Sites de prélèvement des poussières de sols extérieurs et intérieurs au sein de l'école maternelle de Trets 59

Figure 18. Principe de fonctionnement de l'ICP-MS Thermo Series II (Thermo-Electron, Les Ulis, France) 60

Figure 19. Principe de fonctionnement de la GC-MS (https://commons...gif) 61

Figure 20. Schématisation du protocole UBM pour la phase gastrique 63

Figure 21 : Configuration de la plaque 96 puits 64

Figure 22. Schéma du protocole du test du micronoyau 66

Figure 23. Schéma du protocole du test du micronoyau avec activation métabolique 66

Figure 24. Test du micronoyau avec marquage centromérique, contrôle négatif, cellules binucléées avec et sans marquage 69

Figure 25. Cellules observées au microscope à fluorescence, à gauche : cellule non lésée, sphérique ; à droite : dommages à l'ADN cellule en forme de comète 71

Figure 26. Carte de Trets avec l'école maternelle Les Colombes et l'école Edmond Brun situées en France 140

Figure 27. Viabilité des AGS après exposition aux extraits gastriques pendant 2 h et 24 h. Moyenne ± SEM du % de viabilité cellulaire, avec ¤ $p < 0,05$, ¤¤ $p < 0,01$ et ¤¤¤ $p < 0,001$ 145

Figure 28. Lésions primaires à l'ADN observées avec le test des comètes après 2 h d'exposition des cellules AGS aux extraits gastriques. Moyenne ± SEM du « *% Tail DNA* » de trois expériences indépendantes, avec ¤ $p < 0,05$; ¤¤ $p < 0,01$ et ¤¤¤ $p < 0,001$ 146

Liste des papiers et communications

Papiers

Fine atmospheric particles from PACA region: characterization and genotoxicity - Pactes-BMP project.

S. Plumejeaud[a], A. Bonnefoy[a], Y. Noack, D. Robin, P. Doumenq, F. Chaspoul, V. Tassistro, T. Orsière[*]

[a] Authors contributed equally

* Corresponding author

Article actuellement soumis dans le journal : « *Toxicological & Environmental Chemistry* ».

Potentially harmful elements of indoor dust from Estarreja, Portugal: characterization and genotoxicity of the bioaccessible fraction.

S. Plumejeaud, C. Patinha, V. Tassistro, A.P. Reis, Y. Noack, T. Orsière[*]

* Corresponding author

Article actuellement soumis dans le journal : « *Environmental Geochemistry and Health* ».

Communications orales

2 et 3 juillet 2015 - Forum annuel de la Société Française de Toxicologie Génétique (SFTG), Caen, France.

S. Plumejeaud, C. Patinha, A.P. Reis, V. Tassistro, Y. Noack, T. Orsière

« *Caractérisation chimique, bioaccessibilité et risques génotoxiques liés aux poussières de sol intérieurs* ».

17 et 18 juillet 2014 - Séminaire annuel réseau des OHM 2014, Montpellier, France.

S. Plumejeaud, Y. Noack, T. Orsière

« *Génotoxicité des particules de sols et atmosphériques dans les territoires des OHM-BMP et Estarreja* ».

Juin 2013 - Séminaire annuel OHM-BMP 2013, Gardanne, France.

S. Plumejeaud, Y. Noack, T. Orsière

Communication orale : « *Génotoxicité des particules de sols et atmosphériques dans les territoires des OHM-BMP et Estarreja* ».

Communications affichées

26 juillet au 1er août 2015 - 6th International Conference on Medical Geology (MEDGEO'15), Aveiro, Portugal.

S. Plumejeaud, C. Patinha, V. Tassistro, A.P. Reis, Y. Noack, T. Orsière

« *Chemical characterization, bioaccessibility and genotoxic risk assessment of indoor dust from Estarreja, Portugal* » - prix poster.

2 et 3 juillet 2015 - Forum annuel de la Société Française de Toxicologie Génétique (SFTG), Caen, France.

S. Plumejeaud, C. Patinha, A.P. Reis, V. Tassistro, Y. Noack, T. Orsière

« *Caractérisation chimique, bioaccessibilité et risques génotoxiques liés aux poussières de sol intérieurs* » - poster sélectionné pour communication orale.

Novembre 2014 - Journées Méditerranéennes de l'air, Marseille, France.

S. Plumejeaud, T. Orsière

« Equipe de Biogénotoxicologie, Santé Humaine et Environnement (BSHE) au sein de l'Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie marine et continentale (IMBE) ».

Février 2014 - Journée de restitution des projets lauréats 2012, Aix-en-Provence, France.

S. Plumejeaud, A. Bonnefoy, Y. Noack, D. Robin, P. Doumenq, F. Chaspoul, V. Tassistro, T. Orsière

« *Caractérisation chimique et dommages chromosomiques des extraits lipophiles de particules fines ($PM_{2.5}$) collectées dans le bassin minier de Provence* ».

Octobre 2013 - German – French Repair Meeting on Epigenetics and Genome Integrity, Illkirch, France.

S. Plumejeaud, A. Bonnefoy, Y. Noack, D. Robin, P. Doumenq, F. Chaspoul, V. Tassistro, T. Orsière

« *Chemical characterization and chromosome damaging effects of lipophilic fraction of fine particles ($PM_{2.5}$) collected in a past mining area in Provence* ».

Abréviations

AGS : adenocarcinoma gastric stomach

BARGE: bioaccessibility research group Europe

BMP : bassin minier de Provence

BNMN : cellules binucléées micronucléées

C-MN : micronoyaux acentromériques

C+MN : micronoyaux centromériques

CBMN: cytokinesis-block micronucleus

CBPI: cytokinesis-block proliferation index

CCE: complexe chimique d'Estarreja

CDB : cassures double-brin

CIRC : centre international de recherche contre le cancer

CSB : cassures simple-brin

CV : cardiovasculaire

EPTs : éléments potentiellement toxiques

ERO : espèces réactives à l'oxygène

FBa : fraction bioaccessible

GC-MS : gas chromatography-mass spectrometry

HAPs : hydrocarbures aromatiques polycycliques

ICP-MS : inductively coupled plasma-mass spectrometry

MN : micronoyaux

NHLF : normal human lung fibroblast

OHM : observatoire hommes-milieux

$PM_{2.5}$: particulate matter < 2.5 µm, particules atmosphériques fines

PACA : Provence-Alpes-Côte d'Azur

UBM: unified bioaccessibility method

Partie I. Objectifs de la thèse

En juin 1999 l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a déclaré lors de la Conférence Ministérielle Santé et Environnement : «*L'environnement est la clé d'une meilleure santé*», incluant dans ce terme des paramètres liés à la qualité des milieux (pollution de l'atmosphère, de l'eau, des sols, déchets mais aussi nuisances sonores, insalubrité) et à l'ensemble des activités humaines. Les risques sanitaires liés aux contaminants environnementaux dépendent de nombreux facteurs, parmi lesquels on peut citer : la durée et la fréquence d'exposition, la concentration en contaminant, et les caractéristiques du contaminant et du récepteur.

La qualité de l'air est une notion environnementale importante. Elle est impactée par les pollutions gazeuses et particulaires. La pollution atmosphérique particulaire est reconnue comme ayant un impact sanitaire important. L'origine de ces particules est multiple : certaines sont anthropiques (industries, trafic routier, secteur résidentiel, secteur agricole), et d'autres naturelles (érosion, incendies). Il apparait que, plus que les pics d'exposition, c'est la pollution chronique moyenne qui est le facteur sanitaire primordial. La protection des populations passe donc par une réduction du niveau moyen d'exposition par le biais d'une réduction des émissions qui exige une bonne connaissance des sources d'émissions.

Le comportement des particules atmosphériques est étroitement lié à plusieurs facteurs : leur taille, leur forme, leur composition chimique propre, la présence d'agents chimiques adsorbés à leur surface (notamment les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) et leurs dérivés nitrés), ainsi que la spéciation des éléments chimiques, c'est-à-dire la forme physico-chimique sous laquelle les éléments se trouvent (Brüggemann et al., 2009). La pollution de l'air par les particules fines, dont le diamètre est inférieur à 2,5µm ($PM_{2.5}$), est une problématique importante lors de l'estimation des risques sanitaires encourus par les populations. En effet, en 2013 les $PM_{2.5}$ ont été classées par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) comme cancérogènes avérés pour l'Homme (WHO, World Health organization, 2013). Les $PM_{2.5}$ représentent un facteur de risques sanitaires se traduisant, par une incidence accrue de pathologies cardiovasculaires et pulmonaires,

diminuant ainsi l'espérance de vie (Dockery and Pope, 1994; Simkhovich et al., 2008). A long terme, de nombreux travaux rapportent leurs propriétés inflammatoires et génotoxiques pouvant conduire à des cancers pulmonaires consécutifs à des altérations de l'ADN. L'évaluation des risques sanitaires liés aux expositions aux $PM_{2.5}$ comporte des incertitudes incluant la mauvaise connaissance de la nature et de l'importance des interactions entre les différents constituants complexes de ces mélanges.

La pollution atmosphérique particulaire impacte également la qualité de l'air intérieur. Nous passons en moyenne 14 heures par jour à notre domicile, et environ 7 heures de plus en intérieur pour ceux qui travaillent dans des bureaux ou autres lieux de travail clos. Si ces lieux ne sont pas suffisamment aérés, les polluants s'accumulent, en particulier l'hiver, où l'on ouvre moins les fenêtres. Les populations sont donc principalement exposées à des contaminants environnementaux à leur domicile et sur leur lieu de travail (exposition professionnelle).

L'Homme est exposé en permanence aux contaminants environnementaux par trois voies : cutanée, respiratoire et orale (Kang et al., 2011). Ces contaminants peuvent être absorbés directement après émission, ou remis en suspension après déposition sur une surface, ou encore ingérés *via* des sols contaminés. Les enfants sont doublement à risque vis-à-vis des pollutions environnementales. Ils sont non seulement plus vulnérables physiologiquement, mais également d'un point de vue comportemental. Ainsi, Glorennec et collaborateurs ont montré que les enfants en bas-âge (moins de 6 ans) présentent un développement physiologique et immunitaire incomplet qui les rendent plus vulnérables aux expositions cumulées de particules atmosphériques et de sols (Glorennec et al., 2012). De plus, en raison du portage mains/objets-bouches fréquents, les jeunes enfants sont particulièrement sujets à l'ingestion de poussières de sols. Sur des sites à forte pollution particulaire, chez les enfants, l'exposition aux particules a donc lieu par inhalation et par ingestion.

Les poussières intérieures sont un mélange de particules extérieures importées et de particules directement produites à l'intérieur (ex. fragments de peinture, chauffage au bois, cuisine, cigarette). Les éléments ingérés par les enfants peuvent contenir des éléments potentiellement toxiques (EPTs) : métaux et métalloïdes (ex. aluminium, arsenic, plomb, chrome) relargués dans les deux environnements (intérieur et extérieur). Ces EPTs ont un rôle soit prouvé, soit fortement suspecté, dans un certain nombre de maladies

neurologiques, digestives et dans la survenue de cancers. La toxicité de ces éléments est fonction de leur biodisponibilité, capacité d'un composé solubilisé dans les fluides digestifs ayant traversé la barrière épithéliale du tractus digestif et se trouvant dans la circulation systémique où il peut atteindre les tissus et organes cibles.

Les Observatoires Hommes-Milieux (OHM) sont consacrés à l'étude de socio-écosystèmes que l'Homme a fortement impactés sur les plans écologique, économique et social et qu'un évènement majeur brutal vient transformer profondément. Des études s'intéressant à l'impact sanitaire des modifications anthropiques de ces écosystèmes ont été menées dans le cadre de ces OHM. Cependant, à notre connaissance, aucune étude caractérisant les impacts génotoxiques des polluants particulaires atmosphériques et de sols n'y a été conduite.

L'objectif général de ce travail a donc été d'évaluer les potentiels génotoxiques des particules atmosphériques fines et des poussières de sols. Nous avons choisis des sites de prélèvements au sein des OHM du Bassin Minier de Provence (BMP) en France et d'Estarreja au Portugal. Ce sont des zones vulnérables subissant une forte pression environnementale résultant, respectivement, de la proximité d'industries minérales et d'un complexe chimique avec des zones habitées et protégées.

Tout d'abord, le premier objectif de ce travail de thèse était d'investiguer la génotoxicité de particules atmosphériques fines dans l'OHM-BMP à proximité d'industries minérales dont l'impact sanitaire n'a, à notre connaissance, pas encore été documenté. Ce travail a été mené dans le cadre d'un projet de recherche interdisciplinaire plus vaste PACTES-BMP (« Particules Atmosphériques dans le Bassin Minier de Provence : Caractérisation, Toxicité et Évaluation Sociétale ») qui a combiné des approches physico-chimique, toxicologique et socio-anthropologique de la pollution atmosphérique particulaire. Le projet PACTES-BMP et plus particulièrement le choix des sites se sont articulés autour de plusieurs interrogations concernant les sources émettrices de particules fines sur le territoire de l'OHM-BMP. Tout d'abord nous avons choisi le site de Fuveau pour avoir un signal « trafic routier » et le site de Trets qui est une petite ville sans source industrielle permettant de sortir le signal « urbain », considéré comme un bruit de fond ou un signal parasite, et donc de mieux caractériser le signal « industriel ». Ce signal « industriel » a été caractérisé à trois reprises : pour l'usine d'alumine de Gardanne imbriquée dans le tissu urbain et très visible dans le paysage, pour la

centrale thermique de Meyreuil, objet d'une contestation environnementale récurrente, et enfin pour la cimenterie de Bouc-Bel-Air.

Le second objectif de notre thèse a été de développer une nouvelle approche méthodologique permettant d'associer l'étude de la bioaccessibilité des EPTs à l'évaluation *in vitro* de leur génotoxicité. Les études documentant les effets des poussières de sols sur la santé humaine sont nettement moins fréquentes que celles relatives aux particules atmosphériques. Une étude réalisée dans le périmètre de l'OHM Esterraja, dont les sols contiennent de fortes concentrations en métaux lourds, a démontré que le pourcentage de bioaccessibilité du Mn contenu dans les poussières de sols était corrélé aux teneurs de Mn mesurées dans les ongles des pieds des femmes occupant 21 maisons ayant fait l'objet de prélèvements (Reis et al., 2015). La bioaccessibilité était ainsi montrée comme un élément clé dans l'évaluation de l'exposition. Nous avons de ce fait choisi de réaliser pour la première fois une évaluation de la génotoxicité de la fraction bioaccessible de 5 des prélèvements de particules de sols déjà documentées dans la publication de Reis et al., 2015. Ces 5 prélèvements ont été sélectionnés sur la base de leur différence de composition chimique.

Dans un troisième temps, nous nous sommes intéressés à l'exposition des enfants en bas-âge aux poussières de sols intérieures et extérieures d'une école maternelle de l'OHM-BMP. Ces enfants sont co-exposés aux particules atmosphériques et aux particules de sols. Le choix de l'école maternelle a été guidé par les résultats de notre étude PACTES-BMP, où nous avions mis en évidence la génotoxicité des particules atmosphériques collectées sur le site de Trets. Nous nous sommes donc questionnés sur la qualité chimique, la bioaccessibilité et la génotoxicité des poussières de sols prélevées dans l'école maternelle des Colombes à Trets.

Pour étudier l'impact génotoxique des particules atmosphériques fines et des poussières de sols, nous avons mis au point des tests de génotoxicité sur des types cellulaires représentatifs des tissus exposés après inhalation ou ingestion. Une caractérisation chimique des particules a systématiquement été associée de manière à tenter de déterminer la(es) source(s) émettrice(s). De même, la détermination des teneurs en composés solubles extraits à partir des matrices particulaires a été associée afin d'identifier les éléments potentiellement responsables de la génotoxicité observée. Les démarches méthodologiques appliquées pour ces trois études sont schématisées dans la Tableau 1.

Etude n°1	Etude n°2	Etude n°3
Observatoire Homme-Milieu		
Bassin Minier de Provence, région PACA, France	Estarreja, Portugal	Bassin Minier de Provence, région PACA, France
Cible particulaire d'intérêt		
Particules atmosphériques fines ($PM_{2.5}$)	Poussières de sols intérieures	Poussières de sols intérieures et extérieures
Sites de prélèvements		
3 sites industries minérales 1 site trafic routier 1 site urbain (petite ville)	5 maisons	Ecole maternelle de Trets
Extraction des composés		
Extraits hydrophiles & Extraits lipophiles	Extraction méthode UBM : Extraits gastriques	Extraction méthode UBM : Extraits gastriques
Caractérisation chimique		
Extraits hydrophiles : minéraux/métaux & Extraits lipophiles : 16 HAPs	Poussières de sols & Extraits gastriques → EPTs % de bioaccessibilité	Poussières de sols & Extraits gastriques → EPTs % de bioaccessibilité
Modèle cellulaire études *in vitro*		
Fibroblastes normaux de poumons humains : NHLF	Cellules gastriques humaines : AGS	Cellules gastriques humaines : AGS
Etude de cytotoxicité *in vitro* : détermination des concentrations optimales		
Extraits hydrophiles Extraits lipophiles ± S9 mix XTT	Extraits gastriques WST-1	Extraits gastriques WST-1
Etude de génotoxicité *in vitro*		
Extraits hydrophiles Extraits lipophiles ± S9 mix Test du micronoyau centromérique	Extraits gastriques Test des comètes Test du micronoyau centromérique	Extraits gastriques Test des comètes Test du micronoyau centromérique

Tableau 1. Démarche méthodologique de la thèse.

Partie II. Synthèse bibliographique

Ce premier chapitre est subdivisé en trois sous-parties. La première est consacrée aux particules atmosphériques fines et la seconde aux poussières de sols. Dans chacune de ces deux sous-parties, nous nous intéresserons à leurs sources d'émission, leurs caractéristiques physico-chimiques et enfin aux impacts sanitaires engendrés par ces expositions particulaires ainsi qu'aux mécanismes physiopathologiques sous-jacents. La troisième sous-partie vise à renseigner plus spécifiquement la génotoxicité, mécanisme physiopathologique potentiellement engendré à la suite de ces expositions particulaires. Dans cette dernière sous-partie nous nous sommes attachés à présenter la place de la génotoxicité les processus de mutagenèse et de cancérogenèse, ses diverses atteintes à l'ADN, les systèmes de réparation de l'ADN mis en place, et enfin le panel de tests permettant la mise en évidence de la génotoxicité.

I. Les particules fines

1.1 Généralités

La pollution de l'air, à l'intérieur des locaux comme à l'extérieur, est un problème majeur de santé environnementale touchant aussi bien les pays développés que ceux en développement. La pollution atmosphérique touche particulièrement les personnes vivant dans des pays à revenu faible ou intermédiaire, surtout dans les régions d'Afrique subéquatoriales et d'Asie du Sud-Est, qui enregistrent 88% des 3,7 millions de décès prématurés liés à l'exposition aux particules de diamètre inférieur ou égal à 10 microns (WHO, 2014). L'OMS estime que la majorité des décès prématurés liés à la pollution de l'air extérieur résultent de cardiopathies ischémiques et d'accidents vasculaires cérébraux, pour 14% de broncho-pneumopathies chroniques obstructives ou d'infections aiguës des voies respiratoires inférieures, tandis que les 6% restants sont imputables au cancer du poumon (WHO, 2014). Les conclusions d'une évaluation menée en 2013 par le Centre international

de recherche sur le cancer (CIRC) de l'OMS ont montré que la pollution de l'air extérieur était carcinogène, et que les matières particulaires étaient le polluant le plus étroitement associé à une incidence accrue de cancers, en particulier du poumon (WHO, 2014 ; IARC (International Agency for Research on Cancer), 2013).

Les particules atmosphériques autrement appelées particulate matter (PM) sont un mélange de particules solides et liquides en suspension dans l'air qui varient en taille, forme, surface, composition chimique, solubilité et origine (Pope III and Dockery, 2006). Dans la littérature on emploie indistinctement les termes « particules » ou « aérosols », cependant ces deux termes sont sensiblement différents en effet, un aérosol est un mélange de particules en suspension et de gaz.

Nous nous intéressons plus particulièrement aux particules atmosphériques fines, les $PM_{2.5}$ capables de pénétrer plus profondément dans le système respiratoire et de ce fait susceptibles d'être à l'origine d'effets délétères (WHO, 2014).

1.2 Caractéristiques physico-chimiques

1.2.1 Formation de l'aérosol atmosphérique

La génération d'aérosols peut être de nature primaire : la matière est directement introduite dans l'atmosphère sous forme de particule, au terme d'un processus de combustion, d'abrasion ou encore sous l'effet du vent (resuspension).

Les $PM_{2.5}$ proviennent de sources naturelles et/ou anthropiques. Parmi les sources naturelles on compte les éruptions volcaniques, l'érosion éolienne de sols, et les feux de forêts, de brousse ou de savane. Une plus faible partie est issue des embruns, du pollen, de spores, de divers micro-organismes et de plantes. En général, les sources naturelles produisent des particules grossières mais, sous l'effet de températures très élevées certaines peuvent produire des particules fines.

Les sources anthropiques produisent à la fois des particules fines et des particules grossières. Les $PM_{2.5}$ anthropiques sont principalement des particules carbonées provenant de la condensation de vapeurs très chaudes pendant la combustion de matières organiques fossiles ou de biomasse (Schwarze et al., 2006). On trouve d'une part des sources mobiles

comme les trafics : routier, aérien et fluvial ; et d'autre part des sources stationnaires, dont les plus importantes sont les installations de combustion et de chauffage puis, les processus industriels, les chantiers, les surfaces agricoles, et l'incinération des déchets agricoles.

Ces clarifications d'origine et de formation font apparaître que les particules mesurées ne sont pas nécessairement émises ou formées à l'endroit même où elles ont détectées, elles peuvent venir de très loin. On distingue : les particules endogènes, celles propres à une région et les particules exogènes, celles qui ont été transportées sur de grandes distances. Les particules fines peuvent demeurer dans l'atmosphère plus ou moins longtemps, selon leur taille et l'influence de facteurs atmosphériques tels que les précipitations qui accélèrent leur élimination de l'atmosphère (Brüggemann et al., 2009).

La génération d'aérosols peut également être de nature secondaire : dans ce cas, la matière est transformée dans l'atmosphère par des processus de conversion gaz-particule, à partir de différents gaz précurseurs. Les particules secondaires sont formées à partir de réactions chimiques en phase gazeuse dans des conditions météorologiques particulières : une température modérée (8-20°C) et une forte humidité relative (≃ 90%), corrélées à un vent faible (Sun et al., 2006).

1.2.2 Granulométrie

Pour caractériser les particules atmosphériques du point de vue de la qualité de l'air, on considère avant tout leur diamètre aérodynamique. Ce critère détermine en effet, leur comportement dans l'air, leur durée de séjour dans l'atmosphère, ainsi que leur mode de dépôt dans l'environnement et dans l'organisme. La limite de la définition de la taille des particules à partir de leur diamètre suppose qu'elles soient toutes sphériques, ce qui n'est pas toujours le cas. Par conséquent, on parle de diamètre équivalent, applicable à toutes les particules quelle que soit leur forme. Le diamètre le plus souvent utilisé est le diamètre aérodynamique (da) correspondant à celui d'une sphère ayant la même vitesse de chute que la particule et une masse volumique égale à 1 g/cm³ (Commission fédérale de l'hygiène de l'air (CFHA), 2013).

Différentes tailles de particules sont déterminées en fonction du diamètre aérodynamique :

- Particules grossières (PM_{10}) : les particules de diamètre < 10 µm ;
- Particules fines ($PM_{2.5}$) : les particules de diamètre < 2.5 µm ;
- Particules très fines (PM_1) : les particules de diamètre < 1 µm ;
- Particules ultrafines ou nanoparticules ($PM_{0.1}$) : les particules de diamètre < 100 nm.

Il est important de noter que les PM_{10} incluent les particules fines, très fines et ultrafines, les $PM_{2.5}$ incluent les particules très fines et ultrafines, de la même façon les PM_1 incluent les particules ultrafines. La granulométrie influence la distribution des particules atmosphériques qui pénètrent plus ou moins profondément dans le système respiratoire (Figure 1). Les particules de la fraction < 2.5 µm peuvent être acheminées jusqu'aux alvéoles pulmonaires où elles peuvent traverser la barrière épithéliale, rejoindre la circulation systémique et atteindre des tissus ou organes cibles (Wang et al., 2009).

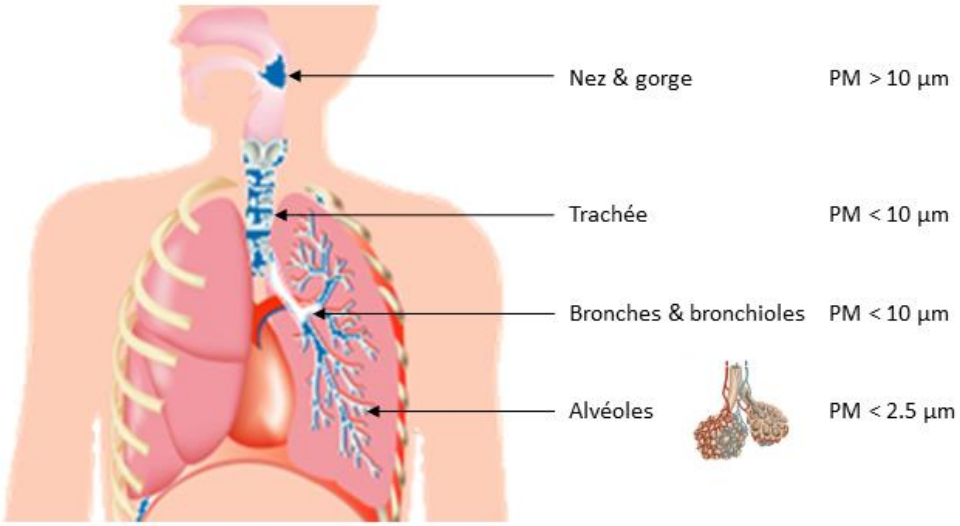


Figure 1. Distribution des PM dans l'appareil respiratoire en fonction de leur granulométrie.

Le comportement des particules est étroitement lié à leur granulométrie. Whitby, en 1978, a été le premier à proposer une classification modale basée sur la distribution des particules en fonction de leur taille (Whitby, 1978). Les trois modes sont les suivants : mode nucléation (< 0.01 µm), mode accumulation (0.01 - 1 µm) et le mode grossier (> 1 µm). Par la suite une distribution à quatre modalités prenant en compte les évolutions physique (nucléation, condensation et coagulation) et chimique (réactions homogènes et hétérogènes) a été définie (Figure 2) (Raes et al., 2000).

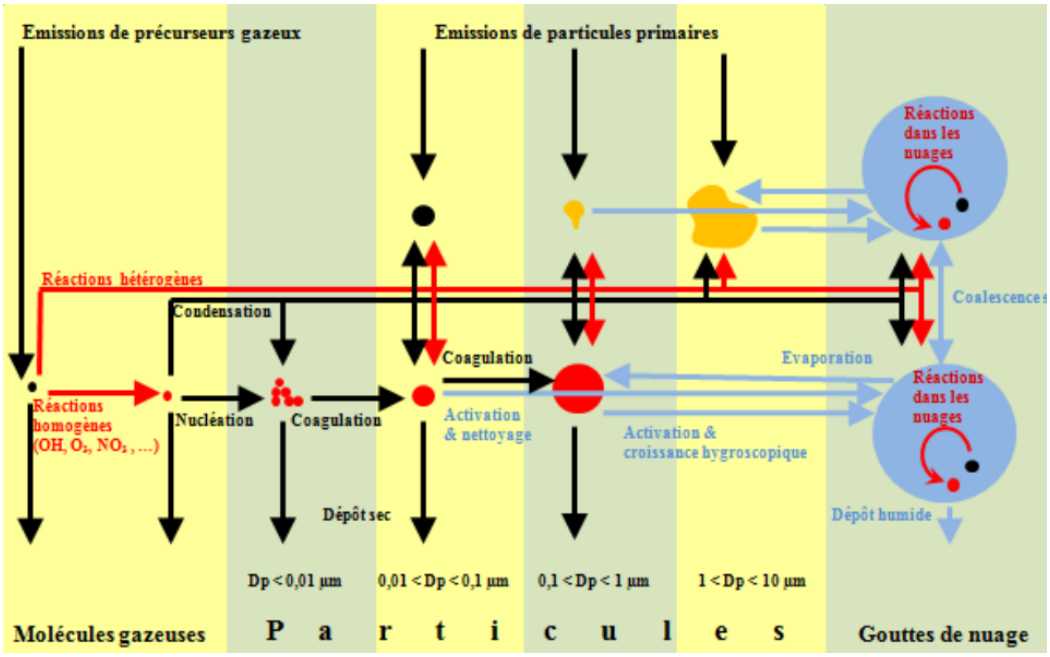


Figure 2. Processus microphysiques influençant la formation de l'aérosol atmosphérique (Raes et al., 2000).

Les modes choisis tiennent compte des différentes sources de productions qui déterminent la taille et la composition des particules ; on parle alors de nucléation, coagulation, et condensation. Le mode de nucléation est constitué de particules émises directement à partir de sources de combustion ou issues de la condensation de gaz refroidi peu de temps après l'émission. Elles ont une durée de vie courte (moins d'une heure) car elles coagulent rapidement pour former des particules plus grosses ou servir de noyaux précurseurs à la formation de gouttelettes. Le mode d'accumulation est celui des particules fines résultant principalement de la coagulation de particules plus petites, de la condensation des espèces volatiles, des processus de conversion gaz-particule et des particules de poussière finement broyées. Les particules grossières sont quant à elles produites par des processus mécaniques ou de remise en suspension (Cubison et al., 2006).

Les particules fines secondaires solides sont formées à partir de processus de conversion gaz-particules au travers des phénomènes de nucléation homogène ou hétérogène, de condensation ou de coagulation puis d'agglomération (Raes et al., 2000). Les gaz précurseurs sont l'ammoniac (NH_3), les oxydes d'azote (NOx), le dioxyde de soufre (SO_2) ou des produits de dégradation de composés organiques volatils (COV), ils peuvent provenir d'émissions naturelles ou anthropiques.

1.2.3 Composition chimique

Une particule est généralement conçue comme un noyau composé d'ions, métaux et espèces carbonées inorganiques sur lequel, en fonction de la source et du mode de formation, diverses molécules organiques tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), les composés organiques volatils, ainsi que des éléments inorganiques et biologiques vont pouvoir venir se condenser (Lepers et al., 2014; Pope III and Dockery, 2006; Schwarze et al., 2006). Au cours du transport les aérosols voient leur composition chimique évoluer au travers de réactions chimiques homogènes et hétérogènes ; on parle alors de vieillissement chimique de l'aérosol (Brüggemann et al., 2009). De même les propriétés physiques de l'aérosol évoluent au travers de processus thermodynamiques. La texture et la morphologie de l'aérosol évoluent ainsi. Les réactions chimiques entre des gaz, des radiations ou d'autres particules peuvent avoir lieu dans l'atmosphère pour donner naissance aux particules secondaires.

La fraction carbonée peut représenter jusqu'à 80% de la masse totale des $PM_{2.5}$ dans les zones urbaines et industrielles (Nunes and Pio, 1993). Elle est constituée de carbone élémentaire également appelé carbone suie d'origine principalement primaire et de carbone organique d'origine primaire et secondaire.

Parmi les composants de la fraction inorganique, les plus fréquemment abondants sont les sulfates et nitrates. Ils proviennent majoritairement de la formation d'aérosols secondaires, respectivement par oxydation du SO_2 et du NO_2. La fraction inorganique peut également contenir des composés minéraux et des sels marins ($CaCO_3$, NaCl), issus de phénomènes érosifs et de remises en suspension de poussières ; de l'ammonium émis principalement par les activités agricoles ; des métaux provenant d'émissions industrielles, de phénomènes abrasifs et de la combustion ; des éléments de la croûte terrestre (silicates) et des composés biologiques comme par exemple les pollens, les spores et divers micro-organismes (champignons, bactéries).

Les particules sont également composées de particules terrigènes (alumino-silicates) ainsi que d'autres composés minoritaires (métaux et des métalloïdes) qui proviennent essentiellement de sources anthropiques essentiellement industrielles.

Pour appréhender la complexité de la composition chimique des particules, on peut, à titre d'exemple, considérer celle des $PM_{2.5}$ prélevées en Europe (Figure 3).

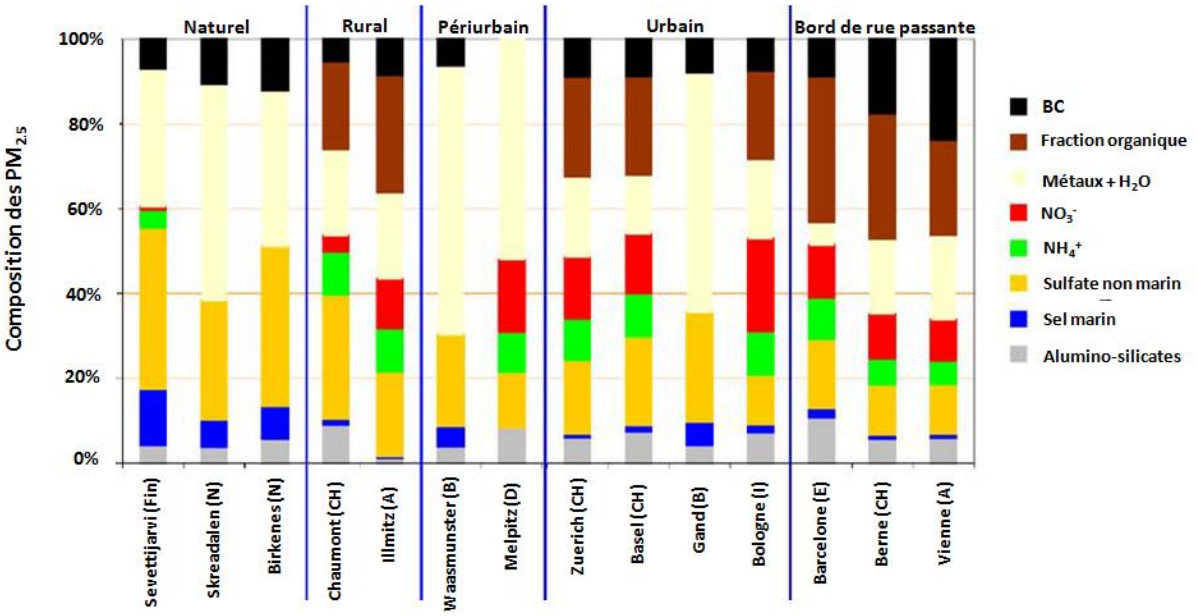


Figure 3. Composition chimique annuelle des $PM_{2.5}$ dans différents sites européens (Fin= Finlande, N = Norvège, CH = Suisse, A = Autriche, B = Belgique, D = Allemagne, I = Italie, E = Espagne) (Putaud et al., 2004).

Connaître la composition chimique des particules atmosphériques permet d'étudier les sources en un lieu donné et parallèlement de rechercher les raisons de la toxicité engendrée par celles-ci.

1.3 Impacts sanitaires liés à l'exposition aux $PM_{2.5}$

Les $PM_{2.5}$ représentent un facteur de risques sanitaires se traduisant, entre autres, par une incidence accrue de pathologies cardiovasculaires, de phénomènes d'altération des fonctions pulmonaires, et de cancers du poumon, diminuant ainsi l'espérance de vie (INVS, Institut de Veille Sanitaire, 2011; Kok et al., 2006; Pope III C et al., 2002; Schwarze et al., 2006). Selon l'étude rétrospective menée par Lepeule et al., les $PM_{2.5}$ constituent le meilleur indicateur du risque de décès à long terme dû aux particules atmosphériques : un accroissement de l'exposition annuelle de 10 $\mu m/m^3$ augmenterait le risque de décès d'environ 14% et augmenterait de 26% et 37% la mortalité respectivement due à des cancers cardiovasculaires et pulmonaires (Lepeule et al., 2012). De plus, l'étude APHEKOM réalisée dans 25 villes européennes, totalisant près de 39 millions d'habitants, a montré qu'une diminution de l'exposition à long terme aux $PM_{2.5}$ jusqu'à 10 $\mu g/m^3$ pourrait ajouter

jusqu'à 22 mois d'espérance de vie pour les personnes âgées de 30 ans ou plus, selon la ville et son niveau moyen de pollution en $PM_{2.5}$ (INVS, Institut de Veille Sanitaire, 2011).

Selon l'OMS, il n'est pas possible d'établir un seuil en dessous duquel on n'observerait aucun effet néfaste sur la santé. Ceci peut être lié à l'hypothèse du rôle de la pollution atmosphérique dans la survenue des pathologies tumorales, réputées sans seuil. L'objectif est donc d'atteindre la plus faible concentration possible (WHO, 2014). L'OMS a néanmoins préconisée une valeur seuil de 10 $\mu g/m^3$ pour la concentration annuelle moyenne des $PM_{2.5}$.

1.3.1 Impacts sur l'appareil respiratoire

L'appareil respiratoire est la principale cible des particules atmosphériques inhalées. Les PM sont fractionnés au cours de la pénétration dans les voies respiratoires. L'efficacité de pénétration est fonction de nombreux paramètres physiques et physiologiques. En général, elle croît lorsque la dimension des particules décroît. Seule une partie de l'aérosol ambiant « total » est inhalée et seules les particules les plus fines, les $PM_{2.5}$ atteignent le poumon profond le pénétrant jusqu'aux alvéoles pulmonaires (Figure 1). Lors d'exposition répétées et chroniques aux particules fines il existe un risque de translocation, c'est-à-dire le passage des particules fines au travers de l'épithélium alvéolaire pour parvenir dans les systèmes sanguins et lymphatiques avec un risque important d'accumulation pulmonaire (MacNee and Donaldson, 2000).

Une exposition aiguë aux poussières fines entraîne des inflammations des voies respiratoires et des poumons, une augmentation des bronchites, des crises d'asthme, des hospitalisations pour problèmes respiratoires et du nombre de décès (Li et al., 2015; MacNee and Donaldson, 2000).

Une exposition chronique aux particules fines entraîne une détérioration de la fonction pulmonaire, une moindre croissance pulmonaire chez les enfants, une augmentation du nombre de personnes souffrant de bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), une baisse de l'espérance de vie en raison de mortalité respiratoire et de cancers du poumon. L'étude ISAAC-2 réalisée en France a mis en évidence le rôle causal des $PM_{2.5}$ dans le développement de l'atopie, de l'hyperréactivité bronchique et de l'asthme (Annesi-Maesano et al., 2008). Une étude prospective réalisée en Californie du sud sur 1 759 enfants suivis de l'âge de 10 à 18 ans, a permis de montrer que la pollution atmosphérique liée aux

$PM_{2.5}$ réduit le développement de la fonction pulmonaire des enfants. La proportion estimée de jeunes de 18 ans avec un VEMS faible est 4,9 fois plus élevée les jours où l'exposition aux $PM_{2.5}$ est la plus forte, par rapport aux niveaux les plus bas (7,9% contre 1,6% représentant un écart de 22,8 µg/m^3) (Gauderman et al., 2004). Les données d'une étude réalisée par *American Cancer Society* sur 1,2 millions d'adultes en 1982 a permis de montrer une corrélation entre des expositions prolongées aux $PM_{2.5}$ et des cancers du poumon (Pope III C et al., 2002). En 2004 l'équipe d'Harrison, en se basant sur cette même étude, a suggéré qu'il était possible que ces cancers soient dus à la présence de molécules adsorbées sur les particules et reconnues comme carcinogènes (As, Ni, Cr et HAPs). Cependant, elle émet aussi l'hypothèse que les $PM_{2.5}$, indépendamment de leurs compositions, pourraient entraîner des cancers du poumon (Harrison et al., 2004)

1.3.2 Impacts sur le système cardiovasculaire

L'exposition aiguë aux particules peut précipiter la mortalité et la morbidité cardiovasculaire (CV) en causant des ischémies du myocarde, des infarctus du myocarde, des insuffisances cardiaques, des arythmies et des accidents ischémiques cérébraux principalement chez les personnes sensibles (personnes âgées, maladies coronariennes préexistantes, diabétiques et personnes obèses). Une augmentation de 10 µg/m^3 en $PM_{2.5}$ augmente de 0,5% à 1% le risque d'hospitalisation CV, de 0,4% à 1% le risque de mortalité CV et contribue à la mort prématurée d'une personne sensible par jour (1 pour 5 millions de personnes aux Etats-Unis) (Brook et al., 2010).

L'exposition chronique aux particules augmente le risque de mortalité CV réduisant ainsi l'espérance de vie de façon plus importante que l'exposition à court terme. Une augmentation de 10 µg/m^3 en $PM_{2.5}$ augmente le risque relatif de mortalité CV de 3% à 30%. Une réduction des niveaux en $PM_{2.5}$ pourrait diminuer la mortalité CV en seulement quelques années (Brook et al., 2010). De plus, à long terme les $PM_{2.5}$ favorise le développement de plaques d'athérosclérose, soit mécaniquement en se déposant au niveau des lésions d'athérosclérose, soit en perturbant les fonctions endothéliales (par inhibition de la synthèse de NO responsable de la vasodilatation, et, par activation de la synthèse d'endothéline générant une vasoconstriction) favorisant ainsi le développement de plaques d'athérosclérose (Hoffmann et al., 2007; Kunzli et al., 2005).

1.4 Toxicité des $PM_{2.5}$: mécanismes d'action

La recherche des mécanismes d'action des $PM_{2.5}$ a fait l'objet de nombreuses études *in vitro* réalisées sur différents modèles cellulaires (ex. cellules épithéliales, macrophages alvéolaires humains issus de lavages broncho-alvéolaires) (Gábelová et al., 2007; Lepers et al., 2014; Longhin et al., 2013). Jusqu'alors la majorité des études ont supposé que 100% des contaminants contenus dans les particules atmosphériques étaient disponibles pour l'absorption conduisant de ce fait, à une surestimation des risques. La relation chimique entre les fluides pulmonaires et les particules, contrôle les propriétés de dissolution des composés et, par conséquent, leur biodisponibilité (fraction particulaire inhalée qui traverse l'épithélium pulmonaire pouvant de ce fait, atteindre les tissus et organes cibles).

1.4.1 Stress oxydant

Le stress oxydant est décrit comme un déséquilibre biochimique dans lequel la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) dépasse les capacités anti-oxydantes naturelles pouvant conduire à des altérations cellulaires. Ce déséquilibre peut se produire suite à une exposition à des polluants atmosphériques pro-oxydants, tel que les $PM_{2.5}$. Le stress oxydant est considéré comme provenant d'abord des particules elles-mêmes (par la libération locale de fortes concentrations de certains composés), puis lié à la libération d'ERO tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'ion superoxyde ($O_2\bullet^-$) et des radicaux hydroxyles (OH•) qui sont générées par des leucocytes inflammatoires migrant dans les espaces aériens suite à l'interaction primaire entre les cellules pulmonaires et les particules (Akhtar et al., 2010; Li et al., 2003). Les cytochromes (CYP) P450, enzymes de phase I, sont également importants dans la production d'ERO par l'activation des substances toxiques inhalées (Kumagai and Shimojo, 2002). Les réactions de phase I libèrent ou introduisent un groupement fonctionnel (-OH, -NH2, -SH, - COOH) permettant ainsi l'augmentation de la polarité du produit parent. Ces réactions métaboliques de phase I peuvent parfois être des réactions de bioactivation conduisant à des intermédiaires génotoxiques. C'est par exemple le cas du benzo[a]pyrène.

Lors de stress oxydant, les ERO libérées causent des lésions tissulaires et des dysfonctionnements physiologiques en attaquant et dénaturant des molécules structurales et fonctionnelles (ex. lipides, protéines, hydrates de carbone, ADN, et ARN (Kelly, 2003)) et en modulant l'activité de facteurs de transcription sensibles à l'oxydo-réduction (ex. le

facteur nucléaire NF-κB des cellules B activées, AP-1, et les signaux des voies de transduction). Leurs réactions avec l'ADN sont susceptibles de conduire à divers processus, tels que l'oxydation des bases et des résidus des sucres ou la formation de cassures de brin d'ADN. De plus, le radical OH• est responsable de la formation de pontages ADN-protéines à partir des nucléoprotéines (Guetens et al., 2002).

Certains métaux de transition (ex. Fe, Cu, Cr, Mn, Ni, Zn et V) et composés organiques (ex. quinones et HAPs) sont directement ou indirectement associés à la production d'ERO (DiStefano et al., 2009; Gualtieri et al., 2009). Les métaux de transitions solubles présents à la surface des particules peuvent générer des radicaux hydroxyles *via* la réaction de Fenton (Risom et al., 2005). Les composés organiques adsorbés sur les particules provoquent l'inflammation des cellules épithéliales de l'appareil respiratoire soit directement pour les quinones, soit médiée par CYP1A1 pour les HAPs nécessitant une bioactivation, en générant la production d'ERO qui active la transcription de facteurs et libère des cytokines (Baulig et al., 2003; Risom et al., 2005).

En général, la première ligne de réponse face au stress oxydant se fait *via* les enzymes anti-oxydantes et les protéines impliquées dans la phase II de détoxification. Cette réponse est régulée par le facteur nucléaire Nrf2 et la voie « *antioxidative responsive element* » (ARE). Lorsque ces mécanismes de défense sont submergés à cause de niveaux d'exposition à un stress oxydant trop élevé, des effets pro-inflammatoires s'en suivent *via* l'activation de NF-κB. L'activation de ce facteur nucléaire augmente la transcription des cytokines, des chimiokines, et des protéines de phase aiguë ce qui contribue à la prédiction du risque de maladies coronariennes (Delfino et al., 2011). Le stress nitrosant dû à des espèces réactives de l'azote (ERA) tels que le peroxynitrite ($ONOO^-$) peut également être un facteur important dans l'initiation de réponses inflammatoires.

D'autres enzymes anti-oxydantes telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et l'enzyme antioxydante la glutathionne S-transférase (GSTM1, GSTT1 et GSTP1) sont essentielles pour la détoxification des xénobiotiques, tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) et époxydes (réactions de phase I) (Michael et al., 2013).

Les différents mécanismes physiopathologiques mis en place suite à une exposition à des polluants atmosphériques pro-oxydants sont synthétisés dans la Figure 4 (Delfino et al., 2011). Ces mécanismes luttent pour conserver l'équilibre redox cellulaire.

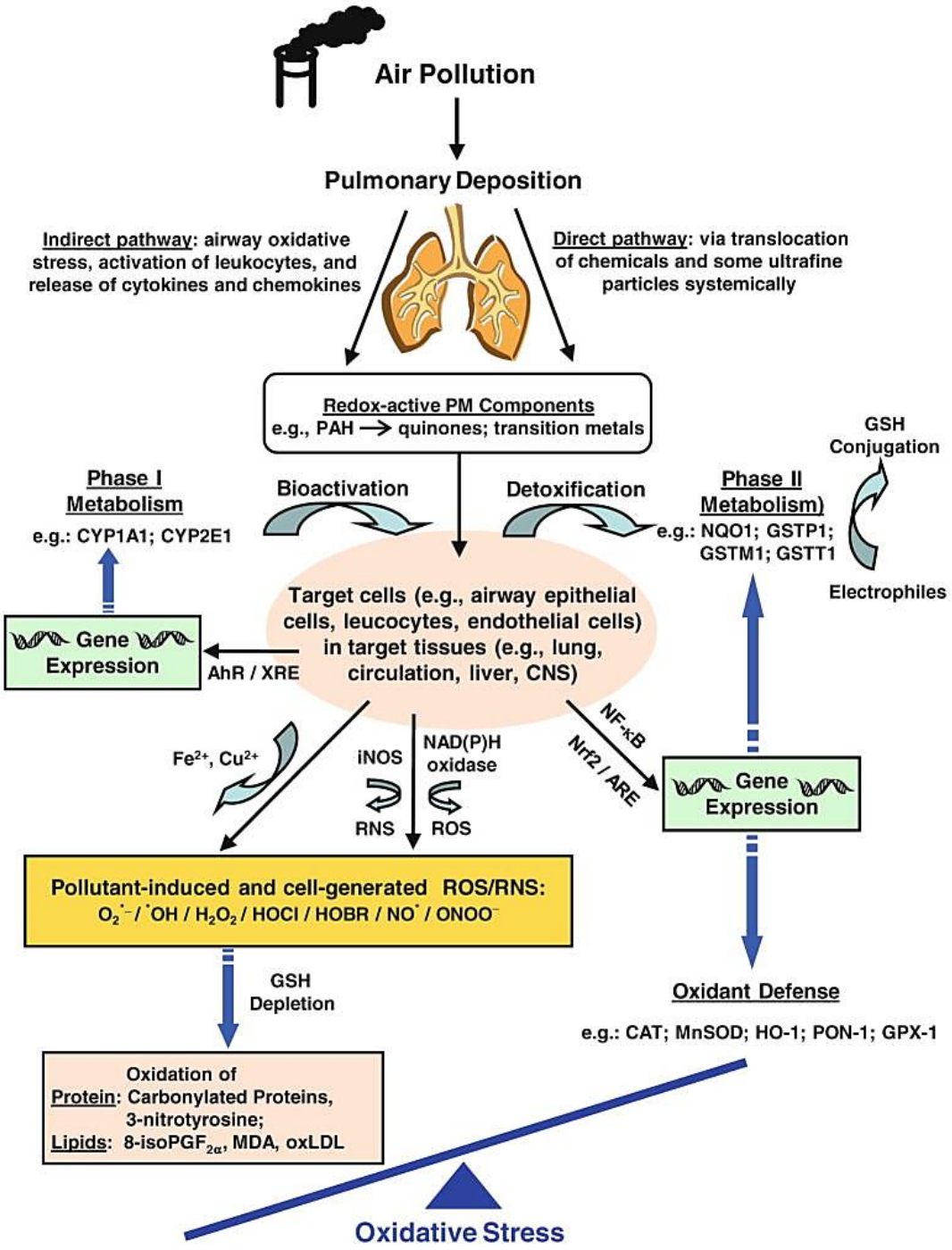


Figure 4. Exposition aux polluants atmosphériques pro-oxydants et déséquilibres engendrés (Delfino et al., 2011).

Le stress oxydant et les ERO peuvent mener à des modifications épigénétiques incluant la méthylation de l'ADN et des modifications post-traductionnelles des histones (ex. méthylation, nitration de la tyrosine, phosphorylation), qui peuvent alors avoir une incidence sur l'expression génique et donc sur l'expression des protéines (Delfino et al., 2011).

1.4.2 Inflammation

Les cellules épithéliales de l'arbre trachéo-bronchique agissent comme une première barrière face aux polluants inhalés. Elles sont ainsi la principale cible des effets toxiques et inflammatoires dus aux $PM_{2.5}$.

Les cellules épithéliales exposées aux $PM_{2.5}$ peuvent relâcher des médiateurs de l'inflammation tels que les cytokines chimiotactiques (ex. l'interleukine 8, IL-8, et « *regulated on activation normal T cell expressed and secreted* », RANTES) et les cytokines multifonctionnelles (les interleukines IL-1β et IL-6, et le facteur de nécrose tumorale : TNFα) qui peuvent conduire à l'afflux de leucocytes inflammatoires (Figure 5) (Calcabrini et al., 2004; MacNee and Donaldson, 2000). Les interleukines IL-6 et IL-8 sont reconnues comme des cytokines pro-inflammatoires.

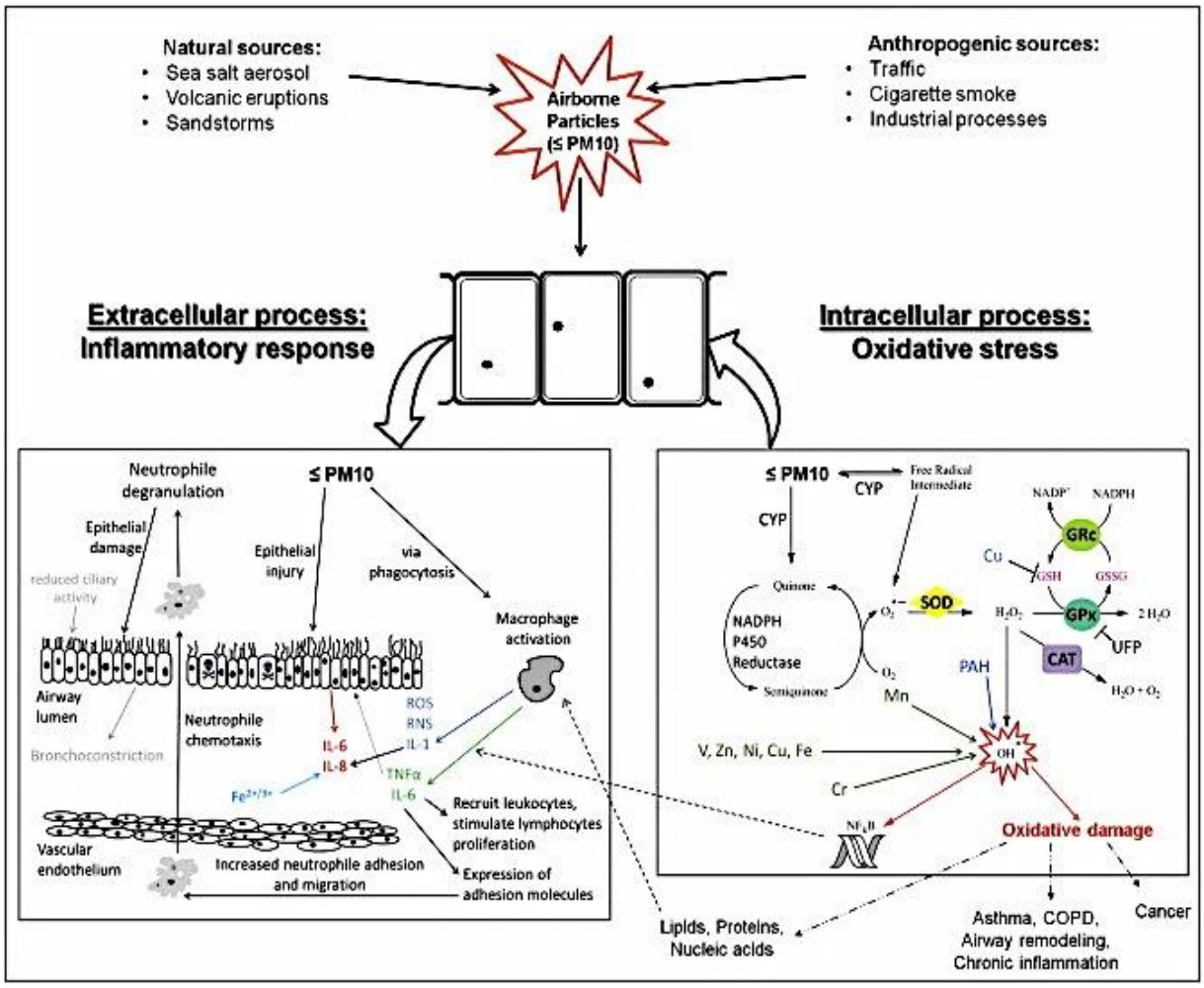


Figure 5. Inductions intracellulaires liées au $PM_{2.5}$ et mécanismes extracellulaires dans le poumon (Michael et al., 2013).

L'IL-8, régulée par NF-κB et AP-1, déclenche le recrutement de cellules immunitaires, en particulier les polynucléaires neutrophiles, basophiles et les macrophages sur le site de l'infection (Akhtar et al., 2010; Kocbach et al., 2008). L'IL-6 quant à elle est impliquée dans la régulation de la réponse aiguë aux lésions et à l'inflammation en induisant la maturation finale des cellules B et T productrices d'anticorps et la sécrétion par le foie de protéines de phase aiguë (Akhtar et al., 2010; Møller et al., 2014). La régulation d'IL-6 est réalisée par une voie moléculaire complexe qui implique l'activation d'autres médiateurs tels que le facteur de nécrose tumorale (TNFα) et l'interleukine-1β (IL-1β).

Les cytokines pro-inflammatoires activent les cellules endothéliales et mononucléaires entraînant la sécrétion de protéines de phase aiguë, notamment les protéines C réactive (PRC) et amyloïde A (SAA), et l'activation de l'expression par les cellules endothéliales de molécules d'adhésion cellulaire (ex. la molécule d'adhésion intercellulaire 1, l'E-sélectine et le facteur de Willebrand (fW)). Les protéines de phase aiguë ainsi que l'activation des cellules endothéliales augmentent à leur tour l'activité pro-thrombotique : augmentation des concentrations circulantes de protéines intervenant dans la coagulation (fibrinogène, facteur VII, prothrombine et D-dimère) et l'activation des processus de coagulation, incluant l'activation des plaquettes (Møller et al., 2014). Ces phénomènes associés à une instabilité des plaques d'athérome peuvent ultimement entraîner des événements coronariens adverses chez les patients vulnérables.

Ainsi, les médiateurs de l'inflammation, produits localement sont ensuite à même de déclencher une réponse inflammatoire systémique, avec notamment des altérations du système vasculaire, des modifications de la viscosité du sang et des processus de coagulation.

1.4.3 Génotoxicité

Des études toxicologiques ont largement décrit l'effet génotoxique des $PM_{2.5}$ (Billet et al., 2007; Borgie et al., 2015; Dominici et al., 2013; Lepers et al., 2014; Oh et al., 2011). En plus des impacts sanitaires liés à l'exposition à long terme des $PM_{2.5}$ mis en évidence par les études épidémiologiques, tels que la mortalité par cancer du poumon, ces résultats suggèrent l'implication de ces particules dans les dommages à l'ADN.

Les dommages à l'ADN dus aux $PM_{2.5}$ relèvent de divers mécanismes d'action, incluant le stress oxydant, la formation de métabolites organiques et l'interaction directe de composés avec l'ADN. La génération d'ERO est largement reconnue comme étant un mécanisme toxique important générant des cassures simple-brin et des oxydations de l'ADN. Bon nombre des constituants des PM peuvent générer des ERO, nous pouvons par exemple citer : la réaction de Fenton impliquant la réduction d'hydrogène peroxyde par un métal de transition, ou encore le cycle d'oxydo-réduction des composés organiques tels que les quinones. Les particules grâce à leurs propriétés de surface peuvent directement interagir avec les membranes cellulaires (Knaapen et al., 2002; Li et al., 2008, 2003).

En plus de la formation d'ERO, l'activation métabolique des HAPs par les cytochromes P450 (CYP1A1/B1) génère des espèces réactives ; des époxydes pouvant donner lieu à la formation d'adduits à l'ADN (Billet et al., 2008). Les métaux de transition (Cr, Cd, Ni et As) et aldéhydes constituant les $PM_{2.5}$ peuvent inhiber les mécanismes de réparation de l'ADN renforçant ainsi l'effet génotoxique et contribuant à la carcinogenèse du poumon (Mehta et al., 2008). En effet, lors des dommages à l'ADN divers systèmes de réparation de l'ADN sont mis en place. Après la perception d'un stress génotoxique, les protéines kinases ATM (« *Ataxia-telangiectasia-mutated* ») et ATR (« *Ataxia-telangiectasia Rad 53 related* ») sont activées pour reconnaître les types de dommages : les ATM sont plus spécifiques des cassures double-brin (CDB) et les ATR des cassures simple-brin (CSB) (Yang et al., 2004). Ces deux protéines phosphorylent l'histone H2AX présente dans le nucléosome induisant des changements de la chromatine autour du lieu de la lésion ce qui a pour conséquence de recruter de nombreux facteurs de la réparation. La présence de l'H2AX phosphorylée (γH2AX) visible sous forme de faucilles dans la chromatine est un marqueur quantitatif des CDB, lésion la plus dangereuse pour l'ADN car pouvant générer des anomalies génétiques précurseurs de cancers (Dickey et al., 2009).

La détection de dommages à l'ADN est suivie de l'activation de facteurs de transcription induisant l'expression de gènes de réparation de l'ADN, de l'arrêt cellulaire et éventuellement de mort cellulaire, tels que le gène suppresseur de tumeur p53, les kinases ChK1/ChK2 et les complexes kinases-dépendants (Yang et al., 2004).

Enfin, si les cellules ne sont pas en mesure de réparer les dommages à l'ADN tout en satisfaisant les divers points de contrôle, d'autres mécanismes de protection de l'organisme peuvent être déclenchés, le plus important étant la mort cellulaire (Yang et al., 2004).

1.4.4 Cytotoxicité

La mort cellulaire peut survenir à la suite de deux mécanismes distincts : la nécrose causée par des facteurs extracellulaires, et l'apoptose ou mort cellulaire programmée. Les mécanismes spécifiques déclenchés dépendent des propriétés chimiques et de la dose d'exposition aux $PM_{2.5}$. En effet, les mêmes stimuli qui induisent l'apoptose à faibles doses peuvent aboutir à une nécrose à des doses plus élevées (Elmore, 2007).

La nécrose est un phénomène passif caractérisé par l'échec du maintien de l'homéostasie par la cellule, ayant pour conséquence la lyse cellulaire avec libération du contenu cytoplasmique dans l'espace extracellulaire (Fink and Cookson, 2005).

L'apoptose est une forme de mort cellulaire programmée médiée par des caspases. Les caspases effectrices activées (ex. caspases 3, 6 et 7) clivent l'ADN et les protéines du cytosquelette responsables des caractéristiques morphologiques typiques de l'apoptose qui sont : fragmentation nucléaire, rétrécissement cellulaire, bourgeonnement de la membrane, condensation de la chromatine, et formation de corps apoptotiques avec membrane intacte (Fink and Cookson, 2005).

Les processus nécrotiques et apoptotiques ont largement été rapportés dans les cellules exposées aux $PM_{2.5}$; la nécrose est souvent liée à une sévère inflammation et/ou un stress oxydant caractérisé par des niveaux élevés de cytokines, par la formation d'ERO et par la présence de divers métabolites participant aux lésions épithéliales (Kok et al., 2006; Schwarze et al., 2006).

1.5 Règlementation

Au terme d'une évaluation exhaustive des études épidémiologiques sur les poussières fines et la santé, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a défini en 2005 les valeurs limites en $PM_{2.5}$: 10 $\mu g/m^3$ en moyenne annuelle et 25 $\mu g/m^3/j$ en valeur seuil journalière (WHO, 2014).

En 2010, la France est poursuivie en justice par l'Union Européenne pour efforts insuffisants. Après une phase de précontentieux, la Commission européenne a adressé à l'état français un avis motivé de mise en demeure le 28 octobre 2010 pour non-respect de cette valeur limite (directive 2008/50/CE du 21 mai 2008 concernant la qualité de l'air ambiant et un air pur pour l'Europe) dans 16 zones administratives de surveillance.

La région Provence-Alpes-Côte d'Azur est particulièrement visée avec six zones présentant des dépassements fréquents des valeurs limites. Ces zones sont les suivantes : Fos-Berre, Aix-Marseille, Toulon, Avignon, Arles et Nice (DREAL, Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement, n.d.). De plus, dans le département des Bouches-du-Rhône, plus de 50% de la totalité des particules fines de la région sont émises, principalement par l'industrie et le traitement des déchets (61%) (DREAL, Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement, n.d.). C'est dans ce contexte que s'est inscrite notre recherche sur la génotoxicité des particules atmosphériques fines émises dans le Bassin Minier de Provence, au cœur des Bouches-du-Rhône, par divers pollueurs potentiels dont trois industries minérales : une cimenterie, une centrale thermique et une usine d'alumine.

II. Les poussières de sols intérieurs

2.1 Généralités

Les poussières de sols font références aux fragments de matières solides déposés sur les surfaces de contact dans les milieux intérieurs. Leur composition est variable et leur origine multiple. Les poussières intérieures sont constituées de particules directement produites à l'intérieur, de terres extérieures et de particules atmosphériques apportées dans les bâtiments par les chaussures, les animaux ou encore par le vent (Glorennec et al., 2012).

L'exposition humaine aux poussières de sols a été identifiée comme étant une source importante d'exposition humaine dans les environnements intérieurs. Ces dernières entraînent des effets délétères sur la santé parmi lesquels figurent allergies, effets sur les systèmes immunitaire et nerveux, problèmes respiratoires et cancers (Maertens et al., 2004; Maroni et al., 1995). Les enfants en bas-âge (enfants de moins de 6 ans), du fait de leurs

caractéristiques physiologiques (fragilité des systèmes immunitaires, digestifs et nerveux) et comportementales sont particulièrement touchés par l'ingestion des poussières de sols. La mise en bouche d'objets, de nourriture ou de leurs mains sales, est un élément important dans le développement de la petite enfance. En effet, lors du développement des enfants le mâchonnement, en combinaison avec la vue et le toucher, permet aux enfants d'explorer et d'enquêter sur leur environnement (N. Tulve et al., 2002). Les jeunes enfants sont particulièrement vulnérables à l'empoisonnement par des métaux, en effet la petite enfance est la période de croissance et de différenciation cérébrale maximale (Faiz et al., 2009). L'US-EPA a défini 60 mg/j comme étant la valeur moyenne de poussières ingérées par jour par les enfants, sauf en cas de géophagie ou pica où cette valeur est largement augmentée (U.S. Environmental Protection Agency, 2008).

L'abondance en poussières intérieures dépend de l'interaction entre déposition de la phase aéroportée, resuspension due aux activités, accumulation directe et infiltration (U.S. Environmental Protection Agency, 2008). La composition d'un échantillon de poussières intérieures est fonction de multiples facteurs, notamment de l'environnement alentour, des facteurs saisonniers, de la ventilation et filtration de l'air, et des productions anthropiques liées aux diverses activités. Les particules intérieures sont issues de résidus de peau et cheveux, d'acariens, de fibres de vêtements et meubles, d'émissions de cuisine et de chauffage et de la fumée de cigarette. Ces différentes sources productrices de particules conduisent à des matrices hétérogènes variables dans le temps et l'espace ; elles varient aussi de composition chimique, de forme et de granulométrie. Les poussières intérieures sont donc variables d'un bâtiment à l'autre et en fonction de la position géographique de la zone étudiée (Lioy et al., 2002). De plus, la pénétration de particules extérieures dans l'air intérieur est une source importante de poussières intérieures (McKone et al., 2002). Les sources extérieures naturelles et anthropiques émettrices de particules atmosphériques ont été citées précédemment (cf. partie 1.2.1).

Les contaminants présents dans l'environnement intérieur peuvent inclure des contaminants biologiques (ex. bactéries, moisissures, virus et acariens), des réactifs chimiques (ex. pesticides, métaux, HAPs, retardateurs de flamme et plastifiants), et des produits de combustion (ex. fumée de tabac, CO et NO_2) (Butte and Heinzow, 2002; Cooke, 1991). Dans nos travaux, nous nous sommes particulièrement intéressés aux éléments potentiellement

toxiques (EPTs), composés de métaux et métalloïdes d'origine anthropique contenus dans les poussières de sols. Présents en faibles concentrations, certains EPTs tels que Cu, Co, Cr, Mn, Ni et Zn sont essentiels pour les organismes vivants, alors que d'autres comme As et Sn ont été reconnus comme polluants majeurs dès 1979 par l'US-EPA à cause de leur contribution aux phénomènes de génotoxicité, d'apoptose et de développement de cancers (Anetor et al., 2007; De Boeck et al., 2003; Denys et al., 2012; Gebel, 1997).

Les EPTs possèdent des sources multiples, elles peuvent être endogènes, on parle d'EPTs hérités du matériau parental et constituant le fond pédogéochimique. Quant aux sources exogènes, elles peuvent être d'origine naturelle (érosion, émissions volcaniques, feux de forêt) ou anthropiques. Les métaux lourds, naturellement présents dans l'écorce terrestre, se retrouvent concentrés dans les environnements intérieurs (Rasmussen, 2004). Les pigments contenus dans d'anciennes peintures murales (jusqu'en 1949) sont également des sources importantes de métaux lourds retrouvés dans les poussières intérieures ; la peinture jaune est associée à des niveaux très élevés de Cd, Cu, Pb et Zn, la couleur violette, quant à elle, est liée à des concentrations de Zn et Pb élevées et la couleur verte est associée à des teneurs élevées en Cu (Chattopadhyay et al., 2003; Tong and Lam, 2000). Bien que souvent recouvertes par d'autres revêtements (peintures, papier peint) ne contenant pas de Pb, ces peintures peuvent, en cas de dégradation du support, se disséminer dans un logement, sous forme d'écailles ou de poussières. Le Cd est utilisé dans certains procédés industriels tels que dans les alliages, la production du verre, de pigments, et de conservateurs.

Trois principaux types de pollutions anthropiques sont responsables de l'augmentation des flux de métaux et métalloïdes exogènes : (1) la pollution industrielle qui émet dans l'environnement de nombreux EPTs provenant principalement des activités métallurgiques telles que le traitement des minerais, le recyclage du plomb des batteries ou la fabrication de peintures ; (2) la pollution liée aux activités agricoles *via* l'application de produits ou substances destinés à améliorer les propriétés physico-chimiques du sol (ex. Cd dans les engrais phosphatés (Hamon et al., n.d.)), et l'utilisation de produits phytosanitaires (ex. Cu dans la bouillie bordelaise (Morgan and Taylor, 2004)), les lisiers (Cu, Zn, Cd (Gimbert, 2006)) ; (3) la pollution urbaine qui regroupe des émissions atmosphériques liées au trafic routier et à l'incinération des ordures ménagères (Gimbert, 2006).

Jusqu'alors, de nombreux modèles utilisés pour évaluer les risques sanitaires de populations vivant dans des zones contaminées ont supposé que 100% des contaminants contenus dans les poussières ingérées étaient biodisponibles, conduisant de ce fait, à une surestimation des risques. En effet, les contaminants peuvent être adsorbés à des espèces minérales ou organiques et co-précipiter, ou encore faire partie de la fraction minérale non-réactive de la matrice solide, les rendant ainsi non disponible à l'absorption (Rasmussen et al., 2008). La relation chimique entre les fluides digestifs et le solide, contrôle les propriétés de dissolution d'un élément et, par conséquent, sa biodisponibilité (fraction de poussière ingérée qui traverse l'épithélium gastro-intestinal, pouvant de ce fait, atteindre les tissus et organes cibles) et sa bioaccessibilité (fraction de poussière qui est extraite de la phase solide par les sucs gastrique et intestinal).

De précédentes études ont donc montré l'intérêt de prendre en compte, en plus des concentrations en EPTs dans les poussières de sols, la proportion de leurs formes mobiles et bioaccessibles ; ainsi la biodisponibilité est un élément essentiel dans l'étude des risques sanitaires (Chang et al., 2001; Poggio et al., 2009).

2.2 Caractéristiques physico-chimiques

2.2.1 Généralités

Les particules atmosphériques ainsi que le dioxyde de soufre (SO_2) et les oxydes nitriques (NOx) sont les principaux polluants atmosphériques. Ils se déposent par la suite sur les surfaces et forment la poussière (Chen et al., 2014). La poussière contient des niveaux élevés de métaux toxiques et de contaminants organiques tels que les HAPs (Lu et al., 2010).

Les EPTs considérés sont les métaux et métalloïdes suivants : Al, V, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, As, Mo, Cd, Sn, Sb, Ba, and Pb. Certains sont des oligo-éléments bénéfiques à faibles doses mais qui deviennent toxiques à doses trop élevées ; c'est le cas du Cu, Zn, et Mn. Les métaux non essentiels, à l'inverse des précédents, n'ont aucun rôle biologique actuellement connu ; c'est le cas entre autres du Cd et du Pb (Mason & Jenkins, 1995). Ils sont considérés comme néfastes dès qu'ils sont présents dans le milieu et entraînent des effets biologiques délétères à de très faibles concentrations. De plus, les métaux, non-dégradables, peuvent s'accumuler dans les tissus adipeux et dans les organes internes par ingestion, inhalation ou contact dermique (Lu et al., 2010), causant un risque sanitaire en raison de leur toxicité notamment chez les jeunes enfants plus sensibles que les adultes (Meza-Figueroa et al., 2007).

2.2.2 Bioaccessibilité

Dans le cadre de l'étude de l'ingestion de poussières, on considère que la bioaccessibilité est la fraction de contaminant qui est relarguée en solution par les poussières *via* l'action des sucs digestifs (salive, suc gastrique, suc duodénal, et bile) et par des actions mécaniques (mastication, et péristaltisme gastro-intestinal) (Figure 6). Elle représente la quantité maximale de contaminant disponible pour l'absorption intestinale. Une fraction de ces contaminants bioaccessibles peut être absorbée par l'épithélium intestinal et est alors transportée jusqu'au foie par la veine porte en vue d'une biotransformation. La fraction de contaminant initial qui atteint la circulation systémique est la fraction biodisponible, qui est donc directement dépendante de la fraction bioaccessible (Figure 6) (Wragg et al., 2011).

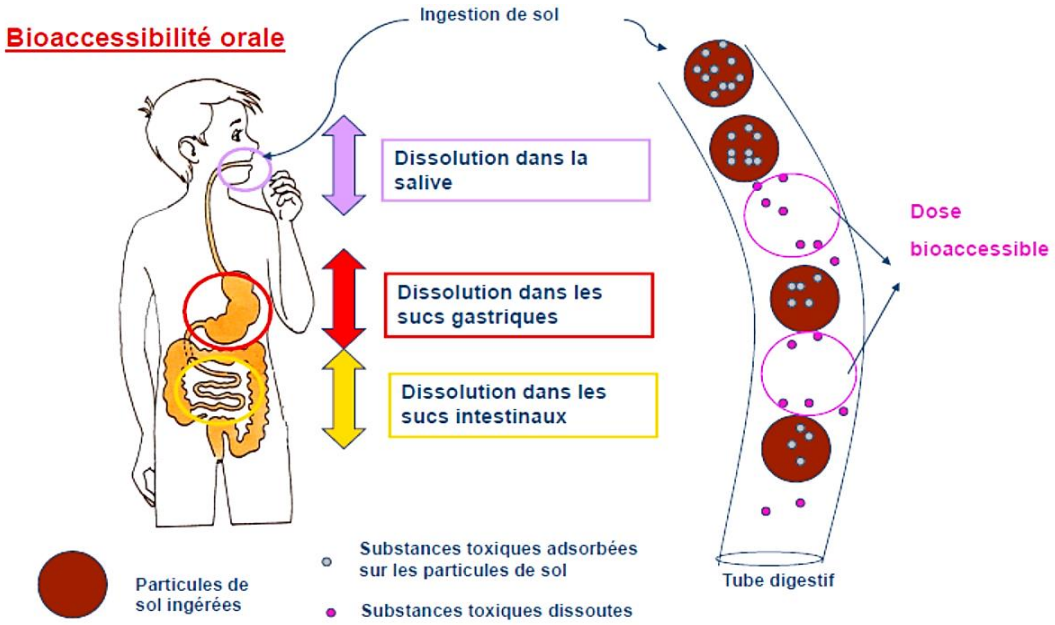


Figure 6. Bioaccessibilité orale suite à l'ingestion de poussières de sols (Gardeur-Algros, 2013).

La bioaccessibilité d'une substance est fonction du type de sol (nature, granulométrie) et de ses caractéristiques physico-chimiques (ex. pH), et de la forme et spéciation de la substance (origine anthropique, naturelle) (Denys et al., 2009; Ruby et al., 1999).

Pour un composé donné, la fraction bioaccessible (FBa) du polluant présent dans les poussières peut se définir comme le ratio de la fraction soluble de cet élément dans une solution donnée sur la concentration totale dans la matrice, selon l'équation suivante (Oomen et al., 2002).

$$FBa\ \% = \frac{\text{concentration extraite}}{\text{concentration totale dans les poussières de sols}} \times 100$$

En accord avec les directives européennes en vue de réduire, raffiner et remplacer l'expérimentation animale *in vivo*, des tests *in vitro* de bioaccessibilité ont été développés. Ces méthodes d'estimation de la bioaccessibilité peuvent être regroupées en deux catégories : les études utilisant des tests d'extraction chimique et celles utilisant des analogues physiologiques (gastro-intestinaux), imitant ainsi les conditions biologiques (Denys et al., 2009; Ruby et al., 1999). Les tests de bioaccessibilité ont été développés depuis le début des années 1990, principalement par des équipes nord-américaines et européennes. Ils diffèrent entre eux notamment par le nombre de compartiments digestifs simulés, les temps de contact entre la matrice et les extractants, et les conditions de pH et Eh (potentiel d'oxydo-réduction) utilisées.

La méthode UBM (« *Unified Bioaccessibility Method* ») conçue par le groupe européen BARGE (« *BioAccessibility Research Group Europe* ») est celle présentant la meilleure corrélation entre bioaccessibilité *in vitro* de certains métaux (As, Cd, Pb, et Sb) et résultats *in vivo* de biodisponibilité (Gardeur-Algros, 2013). De plus, la méthode UBM est considérée comme étant la plus représentative des conditions physiologiques du tractus digestif (Wragg et al., 2011). En effet, cette technique vise à mimer les processus de solubilisation ayant lieu dans la bouche, l'estomac et l'intestin tout en respectant les temps de solubilisation dans les 3 compartiments (Figure 7) (Denys et al., 2009; Wragg et al., 2011).

Plusieurs études comparant bioaccessibilité *in vitro* et biodisponibilité *in vivo* ont montré que la fraction gastrique est plus proche des concentrations en contaminants observées *in vivo* que la fraction gastro-intestinale (Wragg et al., 2011). En effet, la bioaccessibilité gastro-intestinale sous-estime la biodisponibilité des contaminants à cause de la précipitation des composés suite à la basification du pH des solutions utilisées.

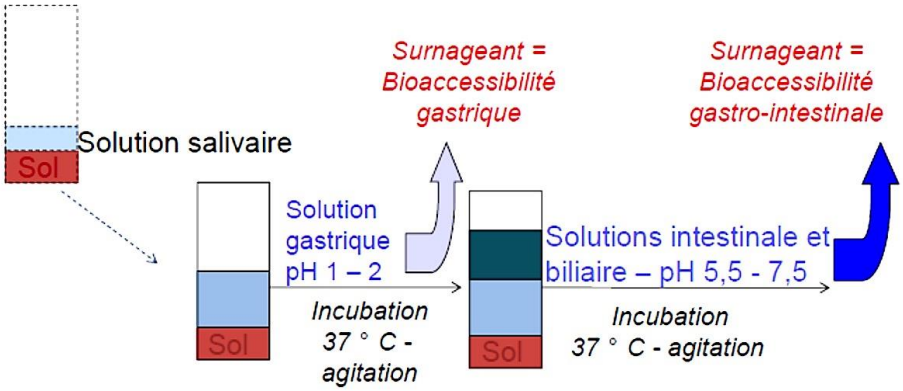


Figure 7. Test *in vitro* de bioaccessibilité (Gardeur-Algros, 2013).

2.3 Impacts sanitaires liés à l'exposition aux EPTs

Les impacts sanitaires liés à l'ingestion de poussières de sols sont fonctions de la composition chimique des poussières ainsi que de la dose ingérée. Elles peuvent être responsables de troubles digestifs, neurologiques, rénaux, immunitaires, et de cancers. De plus, les métaux lourds s'accumulent dans les tissus adipeux et le système vasculaire (Nriagu, 1988).

L'arsenic classé comme cancérogène avéré pour l'Homme par le Centre international de Recherche sur le Cancer (CIRC) est responsable, en plus de ses effets cancérogènes connus (Tableau 2), de désordres cardiovasculaires, de maladies coronariennes, de neuropathies périphériques et d'anémies (Lee et al., 2012).

Le CIRC a classé le plomb et ses dérivés inorganiques dans les produits cancérogènes probables (groupe 2A) pour l'homme. Le risque d'intoxication saturnique est plus élevé chez les jeunes enfants, plus particulièrement de 1 à 3 ans. Le système nerveux central des enfants est particulièrement sensible à l'action toxique du Pb, il provoque des encéphalopathies aiguës convulsivantes, le coma, et même la mort. Les enfants qui survivent à une intoxication aiguë au Pb risquent de souffrir de retards mentaux et de troubles du comportement (http://www.senat...html). À des niveaux d'exposition plus faibles, le Pb affecte le développement du cerveau, ce qui entraîne une baisse du QI, des changements comportementaux (ex. réduction de la faculté de concentration et hausse des comportements antisociaux) et une baisse des résultats scolaires. L'exposition au Pb peut aussi être responsable d'anémie. Une exposition aiguë à des doses élevées de Pb provoque un syndrome « *Fanconi-like* » avec protéinurie, glycosurie et hyperphosphaturie. A ce stade,

les lésions sont réversibles. Une exposition chronique évolue progressivement vers une néphropathie interstitielle irréversible. De plus une intoxication chronique au Pb a des effets délétères sur l'appareil reproducteur pouvant entraîner la stérilité, enfin il engendre des troubles métaboliques.

L'aluminium joue un rôle clé dans les troubles neurologiques tels que la perte de mémoire, l'épilepsie, et l'encéphalopathie ; par ce fait son rôle dans la maladie d'Alzheimer est fortement suspecté (Bhattacharjee et al., 2013; Yang et al., 2014). De plus, l'Al contribue à l'apparition d'anémie, d'insuffisance cardiaque, de dyslipidémie, de psoriasis, et favorise le développement d'ostéomalacie (Yang et al., 2014).

Les EPTs responsables d'effets cancérigènes (sans seuil) après ingestion sont les suivants : As, Cd, Cr (VI) et Ni. Les EPTS suivants : Mn, Cd, Cu, Pb, et Zn sont quant à eux des initiateurs ou promoteurs d'activités carcinogènes (Kurt-Karakus, 2012; Nriagu, 1988). Les organes cibles de cancers induits par les EPTs classés dans le groupe 1 (cancérogènes avérés pour l'Homme) par le CIRC sont répertoriés dans le Tableau 2.

EPT groupe 1	Localisations avec des indications suffisantes chez l'Homme	Autres localisations avec des indications limitées chez l'Homme
Arsenic (As)	Poumon, peau, vessie	Rein, foie, prostate
Cadmium (Cd)	Poumon	Prostate, rein
Chrome (Cr)	Poumon	Fosses nasales et sinus de la face
Nickel (Ni)	Poumon, fosses nasales et sinus de la face	

Tableau 2. EPTs cancérogènes avérés pour l'Homme, organes cibles avec suffisamment de preuves ou des preuves limitées (IARC, International Agency for Research on Cancer, 2012).

2.4 Toxicité des EPTs : mécanismes d'action

2.4.1 Généralités

Pour la plupart des EPTs, l'interaction directe avec l'ADN ne joue qu'un rôle mineur dans la carcinogenèse, à l'exception du Cr(VI) qui une fois réduit en Cr(III) entre dans les cellules où il est à nouveau converti en Cr(VI) et interagit avec l'ADN.

L'augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les atteintes oxydantes de l'ADN, des protéines et des lipides sont les mécanismes les plus fréquemment évoqués dans l'induction par des EPTs de diverses pathologies chroniques et dégénératives (Figure 8) (Jomova and Valko, 2011, Lee et al., 2012). La réduction du Cr(VI) en Cr(V) par les réducteurs cellulaires (ex. GSH, ascorbate et NADPH) génère des ERO participant à la carcinogenèse (Figure 10) (Lee et al., 2012).

La perturbation de l'homéostasie des ions métalliques (Ca^{2+}, Fe^{2+}) peut conduire à un stress oxydant (Han et al., 2013), un état où la formation d'ERO augmente (Figure 8). Une fois les systèmes de protection antioxydants submergés, des dommages de l'ADN apparaissent : peroxydation lipidique, modification des protéines et bien d'autres encore, tous initiateurs de nombreuses maladies dont des cancers, des maladies cardiovasculaires, le diabète, l'athérosclérose, des troubles neurologiques (types maladie d'Alzheimer et maladie de Parkinson), des inflammations chroniques et d'autres pathologies (Jomova and Valko, 2011).

En présence de métaux de transitions, tels que le Ni, Co, Cu ou Fe, le peroxyde d'hydrogène est converti en radical hydroxyle très réactif via les réactions d'oxydo-réduction suivantes :

- La réaction de Fenton majoritairement : métaln+ + H_2O_2 → métaln+1 + OH- + $OH^{\cdot}$;
- La réaction d'Haber-Weiss réaction : O2. - + H_2O_2 $\xrightarrow{\text{métal}^{n+} / \text{métal}^{n+1}}$ O2 + OH- + $OH^{\cdot}$.

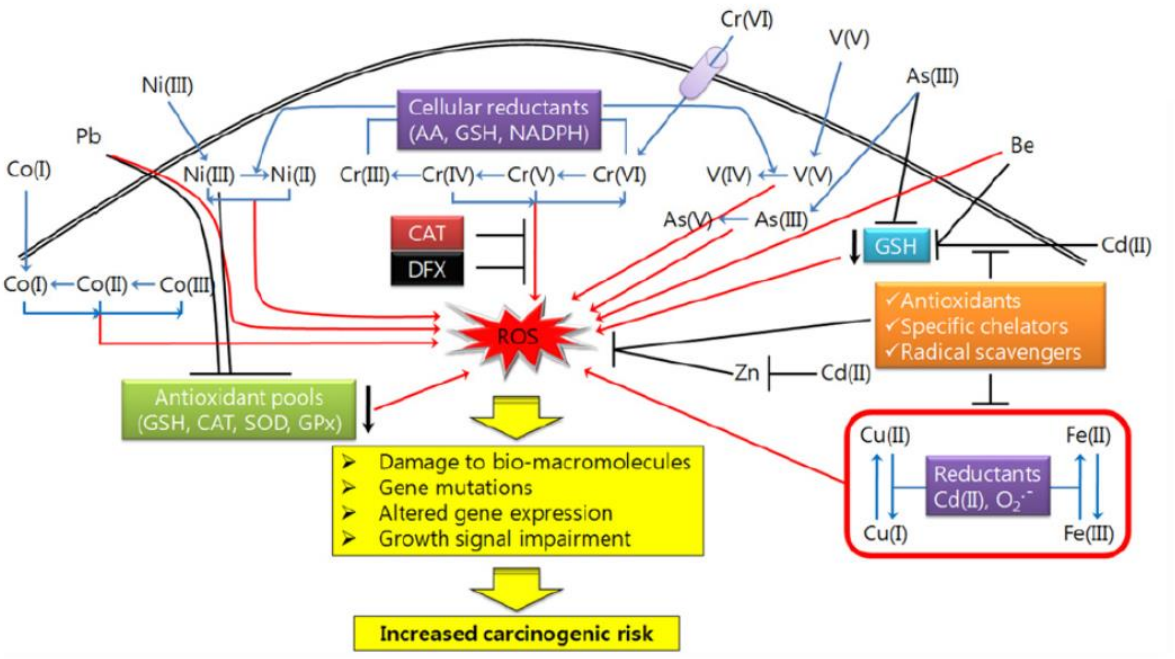


Figure 8. ERO induites par les EPTs et augmentation du risque carcinogène (Lee et al., 2012).

D'autre part, certains EPTs comme le Cd, l'As et le Pb n'ont pas de pouvoir d'oxydo-réduction ; ils contribuent cependant aussi à l'augmentation de dommages oxydants à l'ADN en empêchant la détoxification d'ERO, par exemple, par inhibition de la superoxyde dismutase (Figure 8) (Jomova and Valko, 2011). Ils présentent également des effets toxiques en se liant à des groupements sulfhydryles de protéines (Duker et al., 2005). Par exemple, l'As(III) est la forme la plus toxique, elle se fixe directement sur les groupements thiols des protéines (Lee et al., 2012; Hartwig, 2013). De plus, un mécanisme alternatif générant la formation d'H_2O_2 lors de la réduction du As(III) en As(V) dans les conditions physiologiques a aussi été mis en évidence (Lee et al., 2012; Hartwig, 2013)

Les EPTs, par la production d'ERO, sont connus pour moduler l'expression génique en interférant avec les signaux de transduction impliqués dans la croissance, le développement cellulaire et l'apoptose (Jomova and Valko, 2011). Différentes structures intracellulaires sont régulées par oxydo-réduction (Figure 9) (Hartwig, 2013) :

- Groupements thiols d'enzymes essentielles (ex. phosphatases) ;
- Groupements thiols des structures en doigts de zinc de facteurs de transcription (ex. facteurs nucléaires NF-kB, AP-1, NFAT), de protéines de réparation de l'ADN (poly(ADP-ribosyl)polymerase1 (PARP 1), xeroderma pigmentosum A (XPA)), et de protéines suppresseur de tumeur (ex. p53) ;
- Groupements thiol en tant que capteurs d'H2O2 (ex. Nrf2) ;
- Groupements sélénols (SeH) en tant que capteurs d'H2O2 (ex. thioredoxine reductase).

L'oxydation des résidus cystéine des groupements thiols au sein des structures en doigt de zinc conduit à la libération de Zn, à l'effondrement de la structure, et finalement à l'inactivation de ses protéines sur lesquelles elles se trouvent (Jomova and Valko, 2011). Enfin il a été démontré que l'épuisement de Zn peut favoriser des dommages à l'ADN par l'intermédiaire d'une déficience en mécanismes de réparation de l'ADN (Jomova and Valko, 2011).

Les ERO induites par les EPTs sont donc impliquées dans l'initiation de dommages cellulaires, la stimulation de processus inflammatoires pouvant conduire à l'apparition de cancers (Figure 9) (Lee et al., 2012). De plus, le stress oxydant cause des modifications génétiques et épigénétiques, des croissances cellulaires incontrôlées, des signaux cellulaires anormaux, tous ces changements étant impliqués dans la carcinogenèse (Lee et al., 2012).

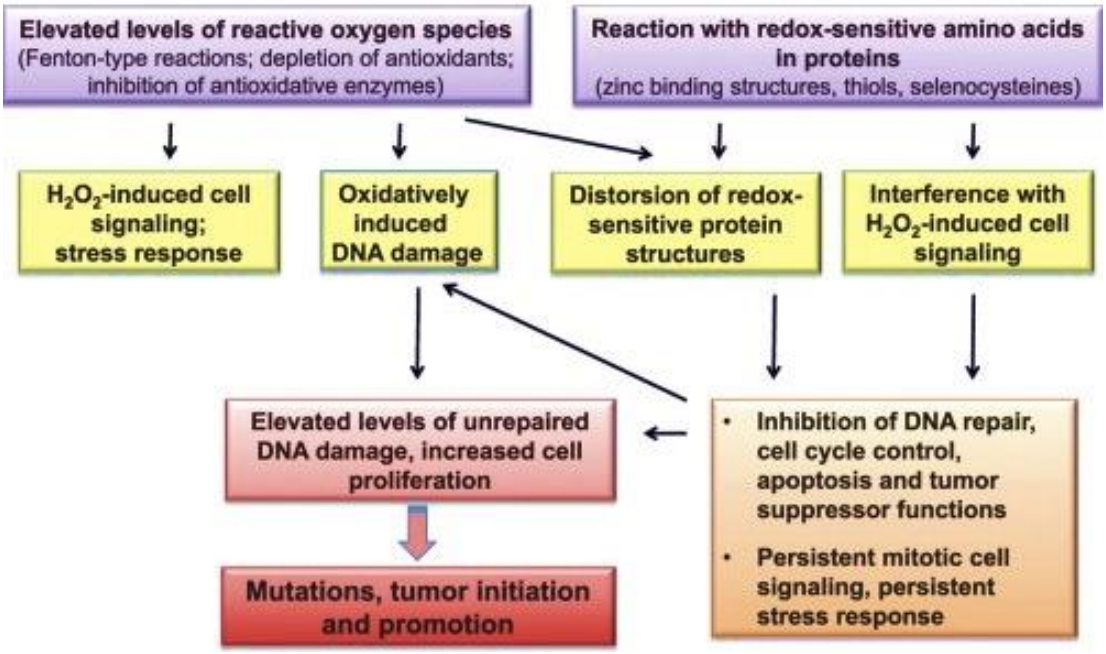


Figure 9. Modèles d'EPTs induisant un stress oxydant à l'origine du développement tumoral, interaction avec les structures protéiques sensibles à l'oxydo-réduction et conséquences cellulaires (Jomova and Valko, 2011).

Les dommages oxydant à l'ADN induisent des cassures simples- et double-brins, des modifications de bases et du désoxyribose, des mutations, des erreurs de réplication, une instabilité génomique et éventuellement la mort cellulaire (Lee et al., 2012).

Les altérations génétiques, les inflammations chroniques et les transformations malignes sont les principaux évènements précurseurs de cancers, et tous sont associés à une génération excessive d'ERO et à ses conséquences. Les patients atteints de colites ulcéreuses ont un risque accru de développer un cancer colorectal ; c'est un bon exemple de l'association entre inflammation chronique, production d'ERO et cancérogenèse (Kim et al., 2012; Lee et al., 2012).

Le plomb inhibe trois enzymes essentielles pour la synthèse de l'hème : l'acide delta-aminolévulinique déhydrase, la coproporphyrinogène oxydase et la ferrochélatase. Par ailleurs, le Pb altèrerait la membrane des globules rouges, entraînant une diminution de leur durée de vie (IARC, International Agency for Research on Cancer, 2012). Le Pb exerce un effet toxique sur l'axe rénine-angiotensine, ce qui accentue l'effet de la toxicité rénale (hypertension artérielle) (IARC, International Agency for Research on Cancer, 2012). Il

interfère dans le métabolisme de la vitamine D provoquant une diminution de la formation de vitamine D3 et une altération de la croissance des os et des dents. Le Pb possède un potentiel génotoxique indirect. En effet, en plus de la synthèse de radicaux libres générés lors d'une exposition au Pb, il a été montré que le Pb se substitue au Ca et Zn constitutifs d'enzymes impliquées dans la réparation de l'ADN, l'inhibant ainsi (García-Lestón et al., 2010).

III. Génotoxicité

3.1 Génotoxicité, mutagenèse et cancérogenèse

La molécule d'ADN est une macromolécule se présentant sous la forme de 2 chaînes complémentaires enroulées l'une autour de l'autre pour former une structure bicaténaire hélicoïdale. L'ADN est le support de l'information génétique de la plupart des êtres vivants ; il a longtemps été supposé que cette macromolécule devait être extraordinairement stable afin de maintenir le haut degré de fidélité lors de la transmission des caractères héréditaires. Force a été de constater que la structure primaire de la molécule d'ADN est une structure dynamique sujette à de constants changements (ex. transposition de gènes, altération de bases ou de nucléotides). Ces modifications peuvent être endogènes, liées à l'activité normale de la cellule ou exogènes, dues à des agents génotoxiques capables de générer une action toxique au sein du génome.

Un agent physique, chimique, nano particulaire ou biologique est dit génotoxique lorsqu'il possède une toxicité directe ou indirecte vis-à-vis du génome. La génotoxicité directe résulte de l'interaction entre un composé électrophile (avec ou sans métabolisation préalable par les cytochromes) et les sites nucléophiles des bases de l'ADN, générant des dommages à l'ADN (ex. adduits, cassures de brins, produits d'oxydation) avec blocage de la transcription et/ou de la réplication de l'ADN. De façon indirecte, la génotoxicité d'un composé se manifeste par une atteinte des protéines de la réparation et/ou de l'appareil mitotique. Les systèmes de réparation de l'ADN entrent alors en jeu. La réparation peut être : (1) fidèle ; (2) erronée en cas de défaillance héréditaire ou de débordement des systèmes de réparation conduisant à des mutations ; (3) ou encore des dommages cellulaires peuvent s'avérer être trop important alors la cellule s'engage vers un processus apoptotique.

Les mutations géniques ou chromosomiques produites sont des modifications stables et héritables du patrimoine génétique pouvant être à l'origine de modifications des caractéristiques phénotypiques. Un agent génotoxique peut être considéré comme un agent mutagène lorsque par son action, il fait augmenter significativement l'apparition de mutations.

La mutagenèse est considérée comme une étape initiale de la cancérogenèse. C'est un processus multiphasique associant mutations et mécanismes épigénétiques. La mutation de trois groupes de gènes critiques semble être au carrefour entre mutagenèse et cancérogenèse : les gènes clés du contrôle du cycle cellulaire, les proto-oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs. L'hérédité ainsi que les facteurs environnementaux jouent un rôle important dans ce phénomène.

La relation entre génotoxicité, mutagenèse et cancérogenèse peut être simplifiée de la manière suivante : (1) les agents environnementaux exogènes initiant des dommages directs ou indirects vis-à-vis du génome sont la clé de la génotoxicité ; (2) la réparabilité des lésions de l'ADN est la clé de la mutagenèse ; et enfin (3) l'accumulation d'altérations génétiques modifiant l'activité de gènes bien spécifiques impliqués dans le contrôle de la prolifération, la différenciation, la sénescence cellulaire, la réparation de l'ADN, la surveillance du génome et l'apoptose est la clé de la cancérogenèse (Hoeijmakers, 2001) (Figure 10).

Le domaine de la toxicologie génétique s'est révélé être essentiel à la détermination des facteurs environnementaux susceptibles d'interagir, directement ou non, avec le patrimoine génétique des cellules.

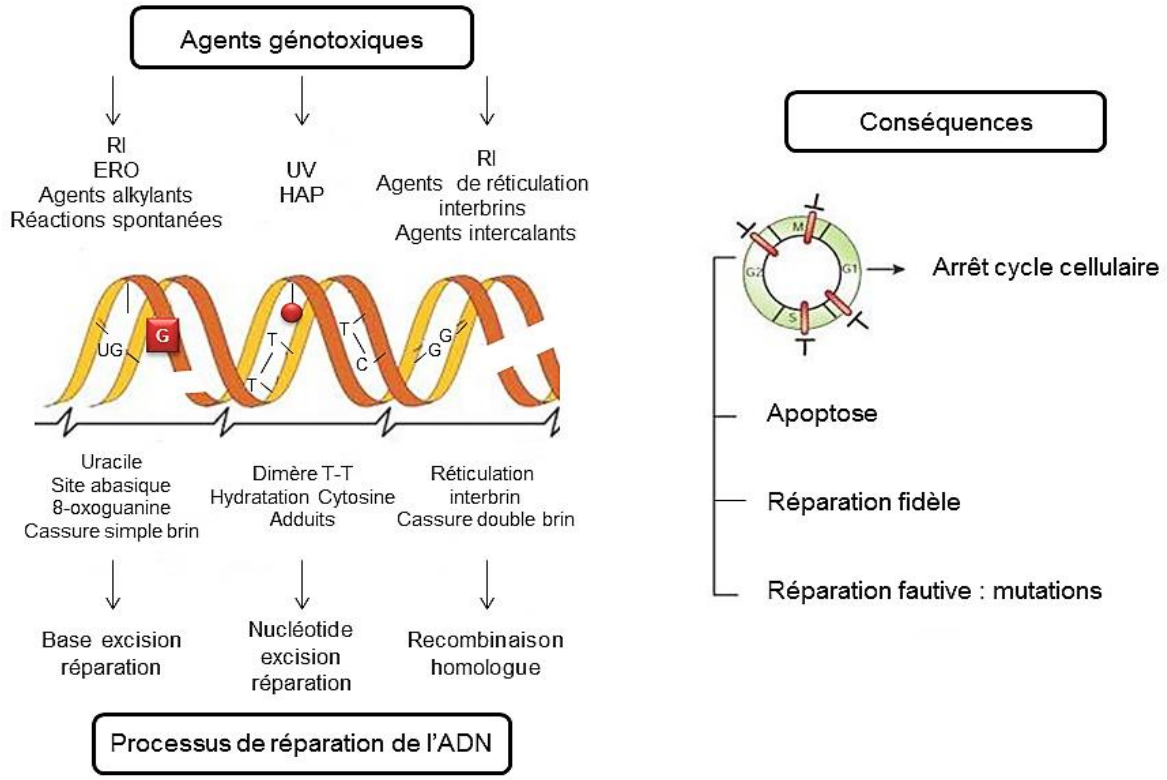


Figure 10. Atteintes génotoxiques de l'ADN et conséquences (d'après Hoeijmakers, 2001).

3.2 Atteintes à l'ADN, la génotoxicité

Toute modification de la structure moléculaire du matériel génétique est considérée comme une lésion primaire de l'ADN. Par définition, les lésions de l'ADN doivent être considérées comme transitoires, c'est à dire comme pouvant faire l'objet d'une réparation parfaite. Il existe une très grande diversité dans les lésions de l'ADN dont nous présentons ici la nature et l'origine, spontanée ou induite par des agents environnementaux.

3.2.1 Lésions primaires à l'ADN

3.2.1.1 Mésappariement des bases de l'ADN

Les atteintes des bases de l'ADN peuvent provenir d'une non-fidélité de la réplication, ainsi que d'une modification chimique, spontanée ou non, d'une base. Plusieurs processus peuvent être responsables :

- La tautomérisation de bases est un phénomène spontané modifiant la complémentarité des bases résultant de la transformation d'un groupement

fonctionnel en un autre (ex. les formes amino des bases A et C peuvent donner des formes imino). Non corrigés ces mésappariements peuvent conduire à des mutations de transition (Suen et al., 1999).

- L'alkylation de bases est dû au transfert de groupements alkyles (ex. méthyle) par des agents alkylants sur des bases ou des phosphates de l'ADN. Ces alkylations peuvent entraîner des ruptures de liaisons hydrogène et des mésappariements pouvant former des pontages intra- ou inter-brins rendant impossible la réplication et la transcription de l'ADN. Le blocage de la mitose a pour issue la mort cellulaire (Wyatt and Pittman, 2006).
- La désamination de bases est une réaction simple découlant de l'hydrolyse d'une base ; elle entraîne l'apparition de bases modifiées (ex. transformation de la cytosine en uracile) n'ayant plus les mêmes spécificités d'hybridation que les bases dont elles dérivent. Non corrigés ces mésappariements peuvent conduire à des mutations spontanées (Bonnefoy, 2010).
- La perte d'une base résulte d'une hydrolyse spontanée ou de l'action d'ERO générant toutes deux la formation de sites abasiques. En cas de non-réparation ces sites abasiques peuvent conduire à des erreurs de transcription, et à la formation spontanée de cassures simple-brin ou à des mutations (Nakamura and Swenberg, 1999).

3.2.1.2 Modifications de structure de l'ADN

Les modifications de structure sont dues à divers mécanismes, parmi lesquels on peut citer :

- Des pontages inter-brins ou « crosslinks » entre bases puriques et pyrimidines peuvent se produire après l'action d'anti-tumoraux (ex. mitomycine C), alors que des pontages intra-brins sont créés suite à une exposition à des rayons UV ou après l'action d'anti-tumoraux entraînant la formation d'un dimère de pyrimidine. Ces pontages ont pour effet le blocage de la transcription et de la réplication de l'ADN (Orsière and De Méo, 2005).
- Les pontages ADN-protéines se créent suite à l'exposition de nombreux agents génotoxiques (ex. radiations UV, cis-platine), ils agissent comme des adduits volumineux, bloquant la réplication et la transcription de l'ADN (Bonnefoy, 2010). La formation d'adduits résulte de la formation de liaisons covalentes entre les

sites nucléophiles de l'ADN et des protéines. Elles sont souvent dues à des composés bioactivables (ex. HAPs) transformés en époxydes très réactifs au cours de leur métabolisation (Xue and Warshawsky, 2005).

- Les cassures simple-brin d'ADN sont dues à la rupture des liaisons phosphodiester au niveau de la liaison base-désoxyribose. Ce sont des évènements très fréquents, les deux sources majeures étant les attaques par les ERO et l'instabilité intrinsèque de l'ADN.

Lorsque les lésions primaires ne sont pas ou mal réparées, elles vont être fixées définitivement sous forme de mutations dans le génome de la cellule après réplication de l'ADN. Ces mutations seront transmises aux cellules filles lors de la division cellulaire.

3.2.2 Mutations géniques

Les mutations géniques portent soit sur une seule paire de nucléotides (mutations ponctuelles), soit sur une délétion ou une addition de quelques paires de bases (mutations par décalage du cadre de lecture) (Hanna et al., 2005).

Les mutations ponctuelles sont des substitutions de bases consistant soit en des transitions lors du remplacement d'une purine par une autre, ou d'une pyrimidine par une seconde, soit en des transversions lorsque qu'une purine est remplacée par une pyrimidine et inversement. Ces mutations sont souvent silencieuses au niveau du phénotype du fait de l'importante fraction non exprimée du génome et de la redondance du code génétique. Les mutations peuvent aussi être de type « faux-sens » résultant du remplacement d'un acide aminé par un autre, pouvant modifier considérablement son activité, ou « non-sens », elles s'accompagnent de l'apparition d'un codon stop écourtant prématurément la protéine.

Des délétions (perte d'une ou plusieurs bases) et/ou des additions (insertion d'une ou plusieurs bases) entraînant un décalage du cadre de lecture (« *frameshift* ») aboutissent à un changement complet de la séquence en acides aminés après le point de mutation provoquant le plus souvent une protéine tronquée par l'apparition d'un codon-stop prématuré (UAA, UAG ou UGA) (Orsière and De Méo, 2005).

3.2.3 Mutations chromosomiques

L'exposition aux agents environnementaux peut conduire à la survenue de mutations chromosomiques qualitatives et/ou quantitatives, visibles au niveau du caryotype, elles ont des conséquences beaucoup plus sévères de par leur impact sur plusieurs gènes. Il s'agit de modifications de séquences susceptibles de se traduire par des anomalies chromosomiques de structure ou de dysfonctionnement de la répartition des chromosomes à la mitose engendrant des anomalies chromosomiques de nombre.

Les mutations chromosomiques quantitatives sont consécutives à des dysfonctionnements des structures cellulaires impliquées dans la disjonction et la migration des chromosomes (Orsière and De Méo, 2005).

Les mutations chromosomiques qualitatives surviennent suite à une grande diversité de lésions de l'ADN et sont associées de manière causale à l'induction de cancer, à des phénomènes d'infertilité et de stérilité ainsi qu'à une part importante de pertes fœtales.

Ainsi, il apparaît que les mécanismes conduisant à des aberrations chromosomiques quantitatives diffèrent de ceux induisant des anomalies de structure.

3.2.3.1 Mutations chromosomiques de nombre : effet aneugène

Les mutations chromosomiques quantitatives consistent en des modifications du nombre de chromosomes et sont induites par des agents aneugènes. Elles correspondent à une perte ou à un gain d'un ou de plusieurs chromosomes. Plusieurs mécanismes conduisent à des mutations chromosomiques de nombre (Iarmarcovai et al., 2006; Orsière and De Méo, 2005; Yamamoto et al., 2014) :

- Le premier consiste en une non-disjonction, c'est-à-dire en une mauvaise ségrégation d'un chromosome du fait d'un défaut de séparation des chromatides à l'anaphase. Ce phénomène conduisant à la formation d'une cellule trisomique et d'une autre cellule monosomique.
- Le second consiste en une perte d'un ou de plusieurs chromosomes entiers due à un défaut d'attachement d'un ou plusieurs chromosomes au fuseau mitotique. Ces dysfonctionnements sont supposés être dus à des défauts des kinétochores (lieux de fixation des microtubules sur les centromères lors de la migration des chromosomes).

- Le troisième est connu sous le terme anglo-saxon « mitotic slippage », il est observé lors d'un long blocage des cellules en métaphase. Les cellules sortent brutalement de la mitose sans division nucléaire ni division cellulaire, elles sont alors tétraploïdes.
- Le quatrième consiste en un nombre anormal de centrosomes conduisant à des mitoses unipolaires ou multipolaires.
- Le cinquième consiste à une absence de cytodiérèse après division des noyaux, du fait d'un défaut d'assemblage des microfilaments (Fenech, 2002).

Ces mutations peuvent être consécutives à une action toxique exercée sur toute une variété de cibles cellulaires, notamment par altération des structures protéiques impliquées dans la division cellulaire et dans la migration des chromosomes : centrosome, fuseau mitotique, kinétochore et membrane cellulaire (Mateuca et al., 2006). Ainsi, les chromosomes, mais également un grand nombre de structures protéiques constituent les cibles des agents aneugènes.

Les chromosomes entiers contenus dans des micronoyaux peuvent être pulvérisés et être alors à l'origine d'aberrations chromosomiques. Ces résultats ont démontré que les micronoyaux résultant d'erreurs de ségrégation peuvent non seulement induire des aberrations chromosomiques numériques, mais également des aberrations chromosomiques structurelles ; ce qui suggère que les composés aneugènes peuvent être à l'origine de réarrangements génomiques initiant le développement de cancer (Yamamoto et al., 2014).

3.2.3.2 Mutations chromosomiques de structure : effet clastogène

Les mutations chromosomiques qualitatives sont directement ou indirectement consécutives à des lésions de l'ADN. Leur survenue est liée à la présence de cassures de brins directement causées par l'agent environnemental (ex. radiations ionisantes), ainsi qu'à la mise en œuvre des systèmes de réparation de l'ADN (ex. agents pontant). L'apparition de cassures double-brins dépend également de la position de la cellule dans le cycle cellulaire au moment où survient l'événement génotoxique. Les cassures chromosomiques, consécutives à des cassures double-brins de l'ADN, peuvent faire l'objet d'une non-réparation, de recombinaison homologue ou d'un raboutage de brin. Seul le processus de réparation par recombinaison homologue conduira à l'absence de mutations chromosomiques (Bignold, 2009).

- Les anomalies chromosomiques de structure résultent de cassures et d'échanges à l'intérieur du même chromosome ou entre des chromosomes différents. Ces remaniements chromosomiques peuvent être classés de la façon suivante (Orsière and De Méo, 2005) :
- Délétions : (i) terminales se présentant comme des paires de fragments de chromatides acentromériques ; (ii) interstitielles apparaissant comme des petites sphères (minutes) ou, si elles sont plus importantes, sous forme d'anneaux acentromériques.
- Échanges inter-chromosomiques : (i) asymétriques aboutissant à la formation de chromosomes dicentriques ou polycentriques, formés par la réunion de deux ou plusieurs portions de chromosomes portant chacun un centromère ; (ii) symétriques, n'impliquant qu'un seul centromère et aboutissant à des translocations réciproques.
- Echanges intrachromosomiques : (i) asymétriques consistant en un remaniement de la portion centromérique aboutissant à un anneau centromérique accompagné d'une paire de fragments ; (ii) symétriques correspondant à une inversion péricentromérique (retournement d'un fragment centromérique suivi de sa réinsertion dans le chromosome) ou à une inversion paracentromérique (retournement d'un fragment acentromérique suivi de sa réinsertion dans le chromosome).

Du fait de leur difficulté de transmission en fin de division cellulaire, les chromosomes dicentriques, en anneaux et les fragments acentromériques sont dits « instables » car ils provoquent la disparition de 50 % des cellules entre la première et la deuxième interphase. Par opposition, les inversions et les translocations, qui ne présentent pas cette difficulté, sont dites « stables » et sont censées se perpétuer sans changement au cours des divisions cellulaires successives (Iarmarcovai et al., 2006 ; Orsière and De Méo, 2005).

La distinction entre aberrations chromosomiques de structure et celles de nombre apporte des informations sur l'importance respective des phénomènes clastogéniques et aneugéniques dans le risque génotoxique et, à terme, vis-à-vis du processus cancérogène.

3.3 Les systèmes de réparation de l'ADN

En raison de l'existence de mécanismes de réparation, la majorité des lésions peut être réparée. Il existe plusieurs types de systèmes de réparation. Les mécanismes conservatifs, tel

que le processus d'excision-resynthèse qui garantissent une réparation fidèle et les systèmes dits fautifs qui interviennent dans un second temps lorsque les mécanismes conservatifs sont dépassés par l'abondance des lésions de l'ADN. Ces systèmes fautifs permettent une réparation d'urgence qui autorise alors la reprise de la réplication de l'ADN mais qui ne garantit pas le maintien de l'intégrité de cet ADN.

3.3.1 Réparation par excision de bases (BER)

La réparation par excision de bases (« *base excision repair* », BER) intervient pour des dommages n'entraînant pas de modifications importantes dans la conformation de l'ADN, ce sont des lésions endogènes, des bases modifiées (alkylées, désaminées ou oxydées), des sites abasiques, ou encore des cassures simple-brin survenues après une agression de type oxydatif (Krokan et al., 2000). Le processus de réparation est initié par une ADN glycosylase qui élimine la base endommagée, puis par l'endonucléase APE 1 qui clive l'ADN en 5' du site abasique, et s'achève par l'action conjointe d'une polymérase et d'une ligase, selon la voie « longue » ou la voie « courte » (la plus fréquente). Ces deux voies requièrent l'action d'enzymes différentes (Akbari et al., 2015).

3.3.2 Réparation par excision de nucléotides (NER)

La réparation par excision de nucléotides (« *nucleotide excision repair* », NER) intervient majoritairement pour les adduits à l'ADN volumineux formés à la suite d'expositions à des mutagènes environnementaux (ex. rayonnements UV) ou à des anticancéreux (Schärer, 2013). La NER est un système ubiquitaire dans laquelle une trentaine de protéines sont impliquées. Le processus est initié par un complexe protéique reconnaissant la lésion, suivi par les endonucléases ouvrent la double hélice et excisent le fragment d'ADN lésé, ensuite une ADN polymérase synthétise la séquence manquante à partir du brin d'ADN complémentaire, et enfin une ADN ligase reforme la double hélice. La NER peut se faire par deux voies, se recouvrant partiellement : la réparation couplée à la transcription (TC-NER) et la réparation globale du génome (GG-NER) ; chacune possédant des protéines spécifiques de reconnaissance du dommage (Evdokimov et al., 2014).

3.3.3 Réparation des mésappariements (MMR)

La réparation des mésappariements (« *mismatch repair* », MMR) intervient lors de mauvais appariements de nucléotides ainsi que des boucles d'insertion/délétion de quelques nucléotides, générées lors de la réplication de l'ADN (Kunkel and Erie, 2005).

Ce système a été bien étudié chez *Escherichia coli* alors que chez l'homme, ce mécanisme n'est pas encore clairement identifié. La première étape est la reconnaissance et l'excision du brin d'ADN portant la lésion par deux hétérodimères : hMutSα et hMutSβ (Pieniazek et al., 2011). Un long fragment d'ADN, de plusieurs centaines de nucléotides, contenant la ou les base(s) mal appariée(s) est alors éliminé sous l'action de l'exonucléase I. Le fragment manquant est resynthétisé par complémentarité sous l'action d'ADN polymérases, et finalement l'action d'une ADN ligase assure la continuité du brin (Kunkel and Erie, 2005; Pieniazek et al., 2011).

3.3.4 Réparation par recombinaison homologue (HRR)

La réparation par recombinaison homologue (« *homologous recombination repair* », HRR) intervient lors de dommages très sévères impliquant les deux brins de l'ADN, tels que les cassures double-brins radio-induites ou les pontages inter-brins induits par des agents thérapeutiques (Averbeck, 2000; Renkawitz et al., 2014).

Ce processus fait appel à la région chromosomique homologue et non endommagée qui sera utilisée comme matrice. Il se forme une interaction entre les deux double-hélices impliquant la formation d'un hétéroduplex, suivie de la resynthèse de l'ADN du brin endommagé à partir de la matrice intacte. Il s'agit d'un mécanisme de réparation fidèle faisant intervenir plusieurs complexes enzymatiques. Les dernières étapes de cette recombinaison homologue sont catalysées par l'action successive d'ADN hélicases, d'ADN résolvases, d'ADN polymérases et d'ADN ligases ; ceci conduit à des échanges génétiques et à des recombinaisons inter-géniques de type « *crossing over* » (Bonnefoy, 2010; Renkawitz et al., 2014).

3.3.5 Réparation par religation non homologue (NHEJ)

La réparation par recombinaison homologue (« *non homologous end-joining* », NHEJ) intervient lors de cassures double-brins, c'est une réparation simple mais imparfaite (Averbeck, 2000).

Ce processus ne nécessite pas d'homologie avec un autre duplex de l'ADN et n'utilise pas, ou très peu, de paires de bases homologues entre les extrémités de l'ADN cassé. Il fait intervenir les protéines Ku qui interagissent avec les extrémités libres des brins de l'ADN, puis qui se complexent à une protéine kinase ADN-dépendante. Les brèches sont ensuite comblées par une polymérase, et enfin l'étape de ligation est effectuée par un hétérodimère constitué du complexe ligase IV/protéine XRCC4 (Lehmann, 2005).

En résumé, une grande variété d'agents cause différents dommages à l'ADN. Pour chaque type de lésion, des mécanismes de réparation spécifiques sont mis en place, et les conséquences cellulaires sont variables en fonction de la lésion initiale et de la fidélité du système de réparation correspondant (Figure 11).

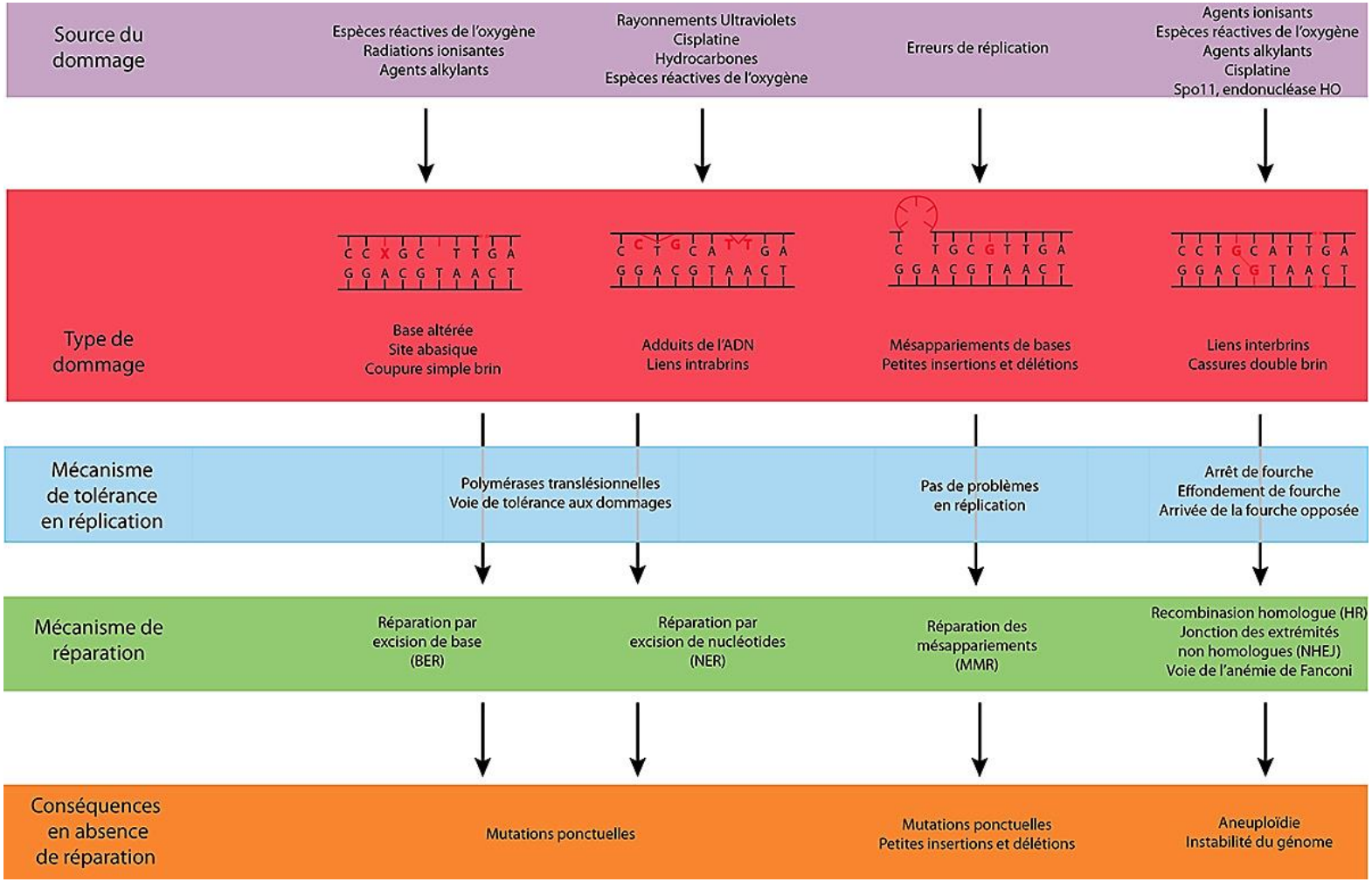


Figure 11. Diversité des dommages à l'ADN et des mécanismes de réparation correspondants (http://www.snv...html).

3.4 Mise en évidence de la génotoxicité

3.4.1 Etude préliminaire de la cytotoxicité

Les tests de cytotoxicité permettent la recherche d'un effet toxique sur un type cellulaire par une méthode évaluant un paramètre donné (ex. croissance cellulaire, intégrité cellulaire, activité fonctionnelle cellulaire). Le but est de déterminer la concentration inhibitrice de 50% (IC 50) qui est la concentration qui inhibe de moitié la prolifération cellulaire globale.

L'évaluation de la toxicité d'un agent exogène doit suivre un plan bien établi. Il faut définir le type cellulaire utilisé (généralement les cellules testées sont les plus proches des cellules cibles *in vivo*) et la durée de l'exposition, en fonction de la durée du test de génotoxicité appliqué ultérieurement.

Plusieurs méthodes d'étude de la cytotoxicité existent à ce jour; dont des méthodes fondées sur des perturbations de la perméabilité membranaire et sur des altérations de la prolifération cellulaire (Figure 12) :

- Le test LDH (lactate déshydrogénase) est un test de détection colorimétrique de la sécrétion de LDH, enzyme exclusivement cytoplasmique et stable. La LDH transforme le lactate en pyruvate, en réduisant le NAD en NADH. En présence de NADH le colorant jaune INT (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium) est transformé en formazan de couleur rouge. L'augmentation de cette enzyme LDH dans le milieu de culture cellulaire permet de détecter une altération de la perméabilité membranaire et par conséquent mesure le potentiel cytotoxique d'un composé.
- Le test NR (« neutral red », NR) mesure la diminution, en fonction de la concentration, de la fixation du colorant vital rouge neutre (NR), un colorant cationique qui pénètre facilement dans les membranes cellulaires par non-diffusion et qui s'accumule dans les lysosomes. Des concentrations élevées en NR peuvent être dues à une atteinte des membranes lysosomales ou à une diminution de la fixation du NR induites par l'action de xénobiotiques. La quantité de NR est proportionnelle à la quantité de cellules mortes ou abîmées.
- Le test MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium, MTT) est un test de détection colorimétrique qui mesure l'activité de la succinate

déshydrogénase mitochondriale, responsable de la réduction du MTT jaune en formazan violet. La quantité de formazan est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes.

- Le test XTT est un test de détection colorimétrique consistant lui aussi à mesurer l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes. Elle est responsable de la réduction du XTT jaune en formazan orange, proportionnel à la quantité de cellules vivantes.
- Le test WST-1 est un test de détection colorimétrique (4-(3-(4-iodophényl)-2-(4-nitrophényl)-2H-5-tétrazolio)-1,3-benzène disulfonate) c'est un composé jaune, qui peut lui aussi être réduit par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes en formazan bleu.

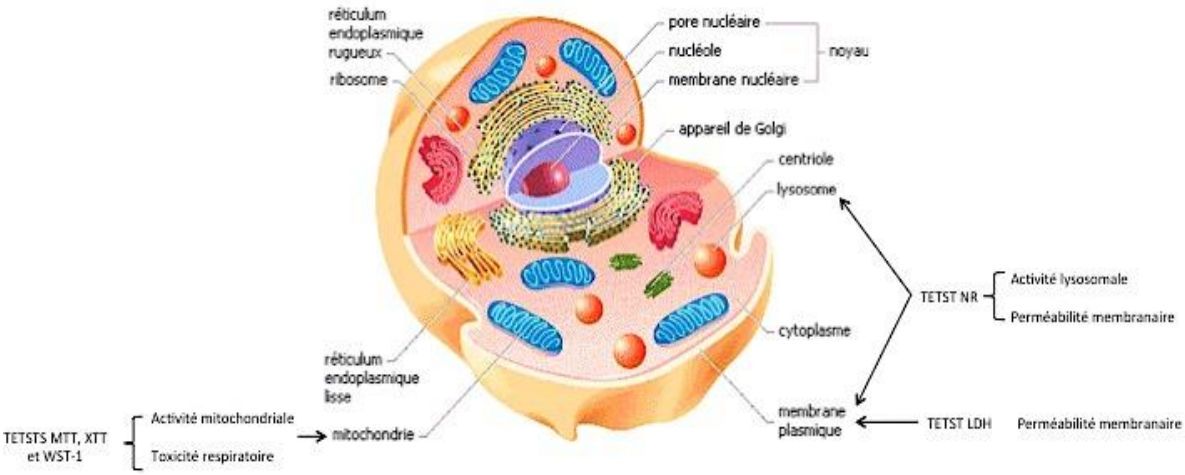


Figure 12. Organites cellulaires et cibles des tests de cytotoxicité.

3.4.2 Lésions primaires à l'ADN

3.4.2.1 Détection des adduits et bases modifiées de l'ADN

Différentes techniques ont été mises en place pour détecter les adduits et bases modifiées de l'ADN (Bonnefoy, 2010) :

- Le post-marquage au 32P associé à une chromatographie sur couche mince permet la quantification des adduits à l'ADN par comptage radioactif.
- Les techniques physico-chimiques font intervenir des méthodes de séparation couplées à la spectrométrie de masse (MS) : la chromatographique en phase

gazeuse (GC-MS) ou encore la chromatographie liquide haute pression (HPLC-MS) ; elles permettent de détecter des adduits par comparaison de la masse moléculaire des bases avec un étalon interne.

- Les techniques radio-immunologiques, immunohistochimiques et immuno-enzymatiques dont l'ELISA (« enzyme like immunosorbent assay ») par compétition de liaison sont basées sur l'affinité antigène/anticorps et nécessitent l'utilisation d'anticorps mono ou polyclonaux dirigés spécifiquement contre des nucléosides ou des bases modifiées.
- L'échange de chromatides sœurs (« sister chromatid exchange », SCE) mesure le taux d'échanges entre les chromatides sœurs survenu durant la mitose.
- La synthèse non programmée d'ADN (« unscheduled DNA synthesis », UDS) standardisée (OCDE 482) révèle la présence de lésions simples brins à l'ADN prises en charge par le système de réparation par excision-resynthèse de nucléotides.

3.4.2.2 Détection des cassures

Le test des comètes en conditions alcalines (« *single cell gel electrophoresis* », SCGE) est une technique basée sur l'électrophorèse permettant de détecter des cassures simple- et double-brins de l'ADN et des sites alcali-labiles. Ces dommages primaires à l'ADN résultent d'interactions directes avec l'ADN ou de cassures transitoires liées à des mécanismes de réparation des dommages à l'ADN par excision (BER ou NER) et par des processus secondaires de fragmentation de l'ADN tels que l'apoptose (OCDE, 2014; Phillips et al., 2009). Les cellules lysées ayant perdues leurs membranes cellulaires et nucléaires subissent une électrophorèse en milieu alcalin (pH > 13) afin de relaxer et de détendre l'ADN superenroulé. L'électrophorèse produit des structures ressemblant à des comètes qui, si on utilise des colorants fluorescents appropriés, peuvent être observées par microscopie à fluorescence. Les fragments d'ADN migrent de la « tête » vers la « queue » de la comète. L'ampleur des cassures de l'ADN est fonction de la taille de la queue de l'ADN et de l'intensité de fluorescence de la queue par rapport à l'intensité totale (tête plus queue) (OCDE, 2014). Le protocole opératoire est détaillé dans la partie IV « Matériel et méthodes ».

La détection des cassures double-brins peut aussi être réalisée par immunocytochimie en quantifiant la phosphorylation de l'histone H2AX.

3.4.3 Mutations géniques

Le test d'Ames consiste à évaluer la capacité d'un agent exogène à induire des mutations dans différentes souches de Salmonella typhimurium (Maron and Ames, 1983) portant des mutations dans les gène nécessaires à la synthèse de l'histidine. Ainsi, ces souches sont incapables de pousser sur un milieu sans histidine, elles sont dites auxotrophes pour l'histidine (His -). Le test évalue alors la capacité d'une substance à induire une mutation réverse dans cette même région de l'ADN conduisant à un retour vers le phénotype sauvage (souches prototrophes). Le nombre de clones bactériens His +, dits révertants, ayant poussé au bout de 48h sur le milieu de culture contenant uniquement des traces d'histidine, est proportionnel au pouvoir mutagène de la substance testée. Le test d'Ames a été standardisé (OCDE n°471), de plus il donne une réponse semi-quantitative permettant des études comparatives ainsi que des indications mécanistiques en fonction des souches de S. typhimurium utilisées (Oecd / Ocde, 1997). Ce test de mutagénécité *in vitro* est le plus communément utilisé dans le monde.

Le test du lymphome de souris (« *mouse lymphoma assay* », MLA) standardisé (0CDE 476) évalue le potentiel génotoxique d'un agent par la perte d'hétérozygotie d'une lignée cellulaire hétérozygote (cellules de lymphome de souris L5178Y) au locus thymidine kinase $TK^{+/-}$, enzyme impliquée dans l'incorporation de thymidine dans l'ADN située sur le chromosome 11. Les cellules devenues $TK^{-/-}$ suite à l'action d'un génotoxique sont résistantes aux effets cytotoxiques de la trifluorothymidine (TFT), un analogue de la thymidine. Les cellules mutantes peuvent proliférer en présence de TFT, tandis que des cellules normales qui contiennent de la TK ne le peuvent pas. L'interprétation du test MLA tient compte de la distribution bimodale des tailles des colonies mutantes. En effet les colonies de grande taille résulteraient de mutations ponctuelles, et les petites colonies témoigneraient de dommages chromosomiques induits par des clastogènes (Moore et al., 1985).

Le test de mutation du locus de l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase (HGPRT), enzyme localisée sur le chromosome X permettant le recyclage des bases issues de l'ADN dégradé, évalue les mutations induites par un agent génotoxique sur ce gène. La mise en contact des cellules avec la 6-thioguanine (toxique) favorise la croissance exclusive des cellules mutées ce qui permet de les identifier et de les dénombrer.

3.4.4 Mutations chromosomiques

3.4.4.1 Test d'aberration chromosomique

Le test d'aberration chromosomique standardisé (OCDE n°473) permet de mettre en évidence les propriétés clastogéniques des agents, c'est-à-dire leur aptitude à induire des mutations chromosomiques structurelles ; et des anomalies numériques peuvent aussi être décelées (Albertini et al., 2000). Ce test permet la détection des aberrations chromosomiques produites suite à des cassures de double-brins de l'ADN, directes ou indirectes, observables après coloration des cellules en métaphase.

3.4.4.2 Test du micronoyau (CBMN)

Le test du micronoyau *in vitro* (« *cytokinesis-blocked micronucleus assay* », CBMN) permet la détection des micronoyaux dans le cytoplasme de cellules en interphase. Les micronoyaux sont des entités nucléaires distinctes du noyau principal formées au cours de la division cellulaire. Ils constituent un dommage stable et persistant, puisqu'on les retrouve dans la cellule pendant la durée de vie de celle-ci. Les micronoyaux peuvent contenir des chromosomes entiers perdus au cours de la mitose précédente le plus souvent lié à un dysfonctionnement du fuseau mitotique, perturbant la ségrégation et la migration des chromosomes, révélant un mécanisme aneugène ou des fragments chromosomiques acentriques consécutifs à des cassures double brin de l'ADN (c'est-à-dire sans centromère) dus à un mécanisme clastogène (Figure 13) (Fenech, 2002; Kirsch-Volders et al., 2002).

Afin de distinguer un évènement clastogène d'un évènement aneugène, le test du micronoyau est couplé à un marquage des centromères soit par hybridation *in situ* de sondes pancentromériques fluorescentes (technique FISH), soit grâce à des anticorps anti-centromériques synthétisés par des patients atteints du syndrome de CREST (forme particulière de sclérodermie) couplés à des anticorps secondaires marqués Alexa 488® (OECD, 2014a). L'apparition d'une fluorescence signe la perte d'un chromosome entier, par conséquent un évènement aneugène.

Le test du micronoyau nécessite l'emploi de cellules capable de se diviser après la mise en contact avec les agents à étudier. Le test peut se réaliser avec ou sans ajout de cytochalasine B qui est un inhibiteur de polymérisation de l'actine. L'ajout de la cytochalasine B permet de bloquer la cytodiérèse d'où le nom de «*Cytokinesis-Blocked Micronucleus Assay*» également

usité pour ce test, d'identifier et d'analyser la fréquence des micronoyaux dans les cellules binucléées, ayant donc effectué une mitose (OECD, 2014a). Le protocole opératoire utilisé est détaillé dans la partie IV « Matériel et méthodes ».

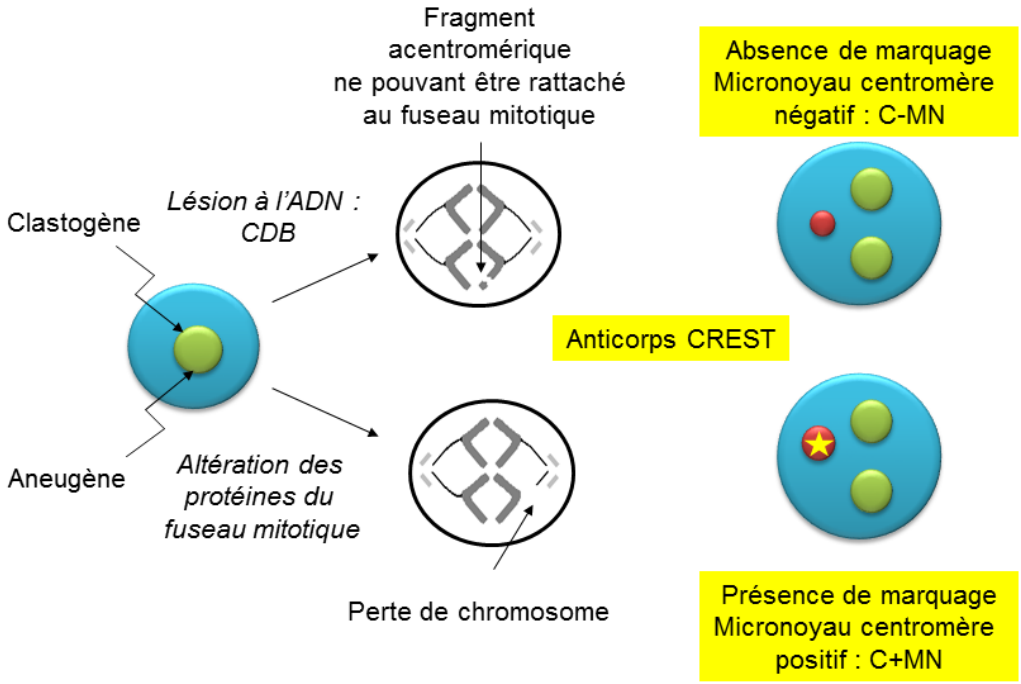


Figure 13. Mécanisme de formation de micronoyaux et marquage centromérique.

3.4.5 Système d'activation métabolique dans les tests in vitro

La plupart des composés cancérogènes nécessitent une bioactivation métabolique pour exercer leur action délétère sur l'ADN. Ils sont pris en charge par des enzymes du métabolisme (monooxygénases à cytochrome P450 notamment) afin d'être transformés en dérivés hydrophiles facilement éliminables. Cependant, au cours de cette métabolisation il peut se former des métabolites intermédiaires à caractère fortement électrophile (ex. benzo[a]pyrène). Ces métabolites peuvent former des liaisons covalentes avec les sites nucléophiles des macromolécules : ADN et protéines ; c'est alors un phénomène de biotoxification (Eisenbrand et al., 2002).

Or, les souches d'Ames et la plupart des cellules en primo culture (à l'exception des hépatocytes) ainsi que les lignées cellulaires sont dépourvues de capacités métaboliques. Les essais conduits *in vitro* requièrent une source exogène d'activation métabolique comme le S9 mix. Ce dernier est constitué de la fraction hépatique S9 obtenue à partir de foies de rats

prétraités par des inducteurs enzymatiques (ex. Arochlor 1254). Cette fraction très riche en CYP450 (enzymes impliquées dans le métabolisme de phase I) est additionnée de cofacteurs enzymatiques (Figure 14).

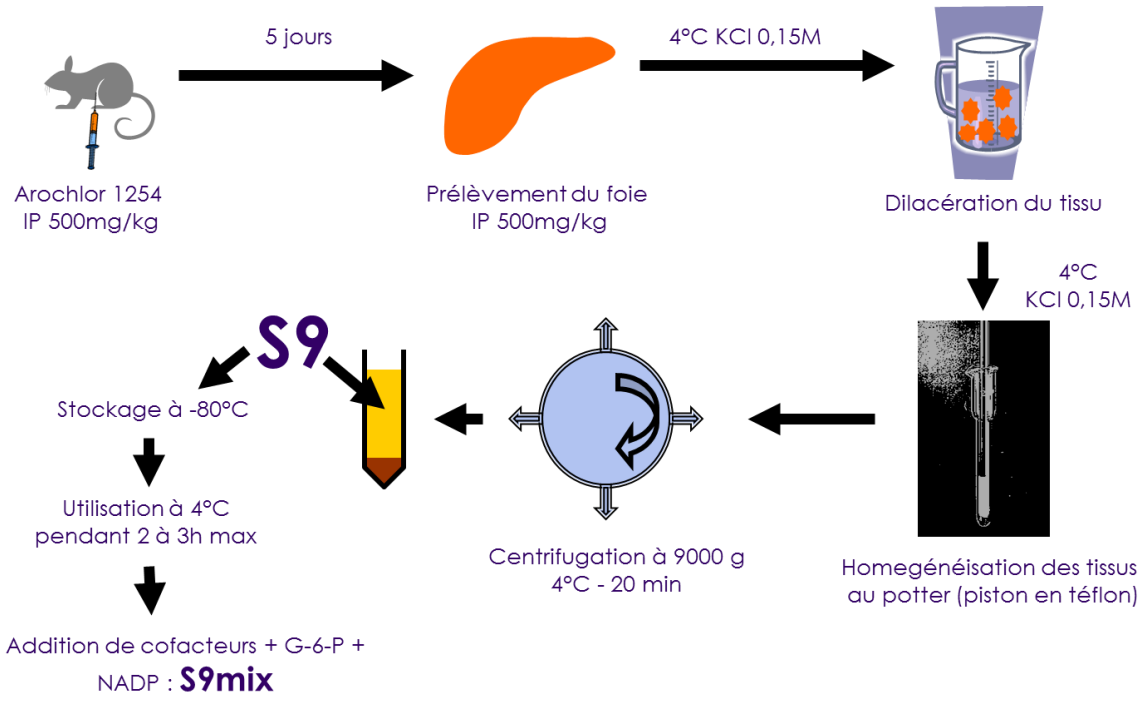


Figure 14. Principe général de la préparation de S9 mix.

Il existe diverses fractions de S9 préparées à partir de foie de hamster, souris, rat, cobaye, singe, ou d'homme, ainsi que différents inducteurs enzymatiques (ex. Arochlor 1254, Phénobarbital, 3-méthylcholanthrène) ; le S9 standard est un S9 de rat induit à l'Arochlor.

L'étude d'un agent génotoxique ou cancérogène nécessite l'utilisation d'une batterie de tests réalisés sur des cellules et des souches variables, afin d'évaluer de façon précise son mécanisme d'action. Ces tests sont réalisés avec et/ou sans activation métabolique.

Partie III. Les observatoires Hommes-Milieux

I. Les Observatoires Hommes-Milieux

Les Observatoires Hommes-milieux (OHM) sont un outil de l'Institut d'Ecologie et d'Environnement (INEE) du CNRS, destinés à favoriser une nouvelle forme d'interdisciplinarité scientifique au service de la connaissance des interactions hommes-milieux et des dynamiques des environnements fortement anthropisés. Ils sont regroupés en réseau (ROHM) et soutenus par le Labex DRIIHM (Dispositif de Recherche Interdisciplinaire sur les Interactions Hommes-Milieux). Ces OHM sont là pour répondre aux enjeux écologiques et sociétaux de notre planète dans le cadre du changement global pour un développement durable. Le ROHM se compose de 10 OHM qui ont vu le jour depuis 2007 : Bassin Minier de Provence (France), Oyapock (Guyane), Haut-Vicdessos (France), Téssékéré (Sénégal), Estarreja (Portugal), Bassin du Rhône (France), Littoral Méditerranéen (France), Nunavik (Québec), Pima County (USA) et Pays de Bitche (France). Les OHM s'attachent à l'étude des socio-écosystèmes fortement anthropisés (anthropo-construits). Ces systèmes complexes nécessitent une convergence interdisciplinaire pour être étudiés et interprétés dans une démarche d'écologie globale.

Chaque OHM est constitué autour d'un élément central marqué par un événement modificateur majeur d'origine anthropique (évènement fondateur) qui vient profondément perturber un cadre socio-écologique caractéristique (fait structurant) et dont les équilibres se trouvent ainsi totalement modifiés. Il peut s'agir d'un bassin minier (fait structurant) avec l'arrêt de l'exploitation de la mine (événement fondateur), par exemple. Le principe est d'encourager les recherches croisées sur un territoire marqué par un fait anthropique majeur, spatialement circonscrit, avec un très fort impact environnemental, économique et social et perturbé par un changement/une rupture de nature systémique (récent ou à venir).

A terme, les recherches menées sur les 10 OHM existants permettront d'apporter une réponse aux problématiques liées au changement global, à la mondialisation, aux conséquences des actions de l'homme sur l'environnement et sur la santé.

L'OHM favorise les échanges, suscite les rencontres et entretient des relations avec les acteurs du territoire (autorités locales, entreprises, services de l'Etat, etc.). Il gère et organise un système d'information et des bases de données en vue de capitaliser les connaissances et soutenir les travaux de recherche.

Les OHM, sont ainsi des outils qui répondent aux quatre fonctions : observation, expérimentation, modélisation et pérennisation des données. Ils ont pour objectifs de soutenir et développer les recherches fondamentales et appliquées, de prêter une attention particulière à la demande sociétale et de transmettre des éléments aptes à éclairer la décision politique. Dans ce but, ils sont co-construits en amont et co-développés ensuite avec les partenaires majeurs concernés par l'activité de l'OHM (recherche, société, politiques) et s'attachent à développer une communication en direction des toutes ces communautés.

C'est dans ces contextes de pluridisciplinarité et de volonté d'amélioration des connaissances que nos études ont vu le jour sur l'impact génotoxique des pollutions particulaires atmosphériques et/ou de sols dans les OHM Bassin Minier de Provence et Estarreja.

II. Bassin Minier de Provence

En Provence, l'ancien bassin charbonnier de Provence, également appelé bassin minier de Gardanne, constitue le territoire d'étude de cet observatoire. Situé dans l'est du département des Bouches-du-Rhône, entre Marseille et Aix-en-Provence, l'Observatoire Hommes-milieux du Bassin Minier de Provence (OHM-BMP) concerne 17 communes rassemblant un peu plus de 100000 habitants. Encadré au nord par le massif de la Sainte-Victoire et au sud par la chaîne de l'Étoile et par la montagne du Régagnas, cet espace est caractéristique des dynamiques périurbaines et industrielles en zone méditerranéenne (https://www.ohm-provence.org).

Durant près de 5 siècles, l'unité de cet espace s'est forgée autour de l'exploitation du lignite et de l'industrialisation induite par la mine. De taille relativement modeste à l'échelle française, le bassin minier a néanmoins produit un total d'environ 150 millions de tonnes de minerai. Il a joué un rôle essentiel dans l'essor de l'industrie provençale, en particulier à Marseille. Il a également fixé des activités structurantes sur le territoire, notamment des cimenteries qui se sont installées à proximité des puits (Cadolive, Trets, etc.), une importante unité de traitement de la bauxite et de fabrication d'alumine, et une centrale électrique thermique. Au plus fort de son activité, la mine a employé plus de 6 000 personnes (1945-1947). Mais le lignite local devient vite concurrencé par les charbons étrangers et des sources d'énergie alternatives à moindre coût. L'arrêt de l'exploitation minière en 2003 laisse donc un territoire en proie à de multiples enjeux environnementaux et sociétaux (https://www.ohm-provence.org).

Ce territoire connaît aujourd'hui une phase de transition. Il est confronté à des problèmes multiples : la gestion de l'héritage minier et la reconversion économique ; les dynamiques d'une urbanisation qui progresse d'ouest en est ; le maintien de l'agriculture et la préservation de l'environnement naturel ; les conflits pour l'usage de l'espace et les pressions sur la qualité des milieux et des paysages.

Dans ce contexte métropolitain, l'objet de l'OHM-BMP est d'étudier l'adaptation à la nouvelle donne créée par l'arrêt des charbonnages : conséquences environnementales et sociales de l'arrêt de la mine ; acceptabilité et devenir des grands établissements industriels ; habitabilité du territoire et santé ; gouvernance et gestion environnementale ; permanences et innovations en matière énergétique. Les principales questions soulevées par ces changements concernent l'environnement géo-physico-chimique, la biodiversité, la santé, les comportements économiques, la sociologie et les représentations que se font de leur milieu les différents acteurs. Le bassin minier est ainsi envisagé comme un système complexe d'interactions hommes-milieux.

III. Estarreja

Estarreja est une commune côtière proche de la lagune « *Ria d'Aveiro* », située dans le district d'Aveiro au nord du Portugal (Figure 16). La commune d'Estarreja s'étend sur 108,16 km^2 avec une population de 26 697 habitants (Instituto Nacional de Estatisticas, INE, 2011). La plaine côtière autour de la lagune soutient une agriculture intensive et diversifiée.

La région d'Estarreja est soumise à une pollution industrielle intense depuis le début des années 50. En effet, elle possède sur son territoire le deuxième plus important complexe d'industries chimiques du pays, produisant principalement du sulfate d'ammonium, de l'acide nitrique, du nitrate d'ammonium, et des résines synthétiques (PVC). Jusqu'en 1975, des effluents liquides chargés en éléments potentiellement toxiques pour les écosystèmes et pour la santé humaine étaient également rejetés dans les nombreux canaux de drainage de cette zone (http://www.ohm-estarreja...fr/).

Au cours des années 1990, d'importantes innovations technologiques ont permis de réduire considérablement les émissions de polluants rejetés par les usines chimiques locales. De même, au cours de cette décade, un certain nombre d'interventions de réhabilitation ont permis une réduction significative du passif environnemental, tant au niveau des résidus solides que des effluents liquides. Cependant, malgré ces changements, de nombreuses lacunes subsistent dans la connaissance de l'évolution de l'environnement. En effet, la « *Ria d'Aveiro* » est un milieu écologiquement riche, un habitat naturel pour de nombreuses espèces aquatiques et terrestres : elle est reconnue comme zone de protection spéciale (ZPS) dans la directive Européenne pour la protection des oiseaux. La présence de ce système lagunaire est largement prise en compte dans les études de l'Observatoire, en raison de sa sensibilité et de sa vulnérabilité.

L'OHM-Estarreja a pour objectif d'étudier les effets multiples de l'activité industrielle sur la relation homme-milieu, en prenant en compte la dimension temporelle, marquée par les changements de pratiques industrielles.

Partie IV. Matériels et méthodes

La partie « Matériels et méthodes » s'attachent à présenter les différentes techniques utilisées pour la caractérisation chimique des polluants particulaires brutes et leurs extraits, ainsi que celles employées pour évaluer la cytogenotoxicité pulmonaire ou gastrique *in vitro*. Ces techniques sont présentées en fonction de l'étude : (1) particules fines atmosphériques dans l'OHM-BMP ; (2) poussières de sols à l'intérieur de maisons dans l'OHM-Estarreja ; et (3) poussières de sols dans l'école maternelle de Trets.

I. Sites de prélèvements

1.1 Etude des particules atmosphériques fines dans l'OHM-BMP : caractérisation et génotoxicité

Le corridor industriel constitué autour de l'axe Bouc-Bel-Air/Meyreuil représente une zone d'étude particulièrement intéressante. A moins de 20 km du cœur d'Aix ou du centre de Marseille, la partie occidentale du bassin concentre une population grandissante et des zones d'emploi dynamiques, qui sont venues s'installer sur un espace historiquement marqué par la présence d'établissements industriels à fort impact environnemental. En effet, du Sud-Ouest au Nord-Est, se succèdent sur environ 10 km : une cimenterie, une usine de production d'alumine et une centrale électrique thermique au charbon. Ces établissements se situent à proximité, sinon au sein même, de zones d'habitations. La zone est aussi influencée par la circulation automobile sur la route qui relie l'Est du bassin minier à l'autoroute A8 au Nord de Marseille. Dépassant les 20 000 véhicules par jour, cet axe accueille un nombre élevé de navettes domicile-travail, caractéristique des espaces péri-urbains, auquel s'ajoute un important trafic de fret régional voire international.

L'étude de la caractérisation chimique et génotoxique des $PM_{2.5}$ fait partie d'un projet intégré dans l'OHM, le projet PACTES. Le projet consistait en une caractérisation physico-chimique fine des particules inhalables (PM_{10} et $PM_{2.5}$) émises par les principales sources industrielles et routières, une évaluation de la cytotoxicité et génotoxicité des $PM_{2.5}$ ainsi

qu'une évaluation de la perception par les populations riveraines de ces pollutions et du risque potentiel qu'elles représentent. Ce projet a été réalisé pour apporter aux populations et aux décideurs, une meilleure connaissance de la réalité pour une approche objective de risque éventuel.

Dans le cadre de cette étude, cinq sites caractéristiques de différents types d'émission particulaire définis ont été choisis sur ce territoire : trois sites à proximité d'industries minérales (une cimenterie, une usine d'alumine et une centrale thermique), un site de trafic routier intense et un site urbain (Figure 15).

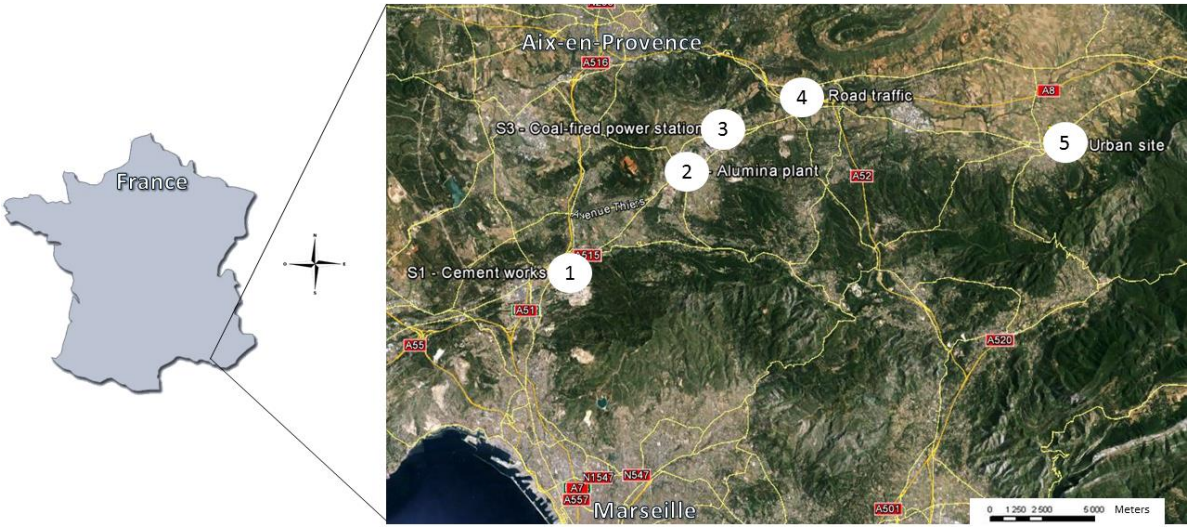


Figure 15. Sites de prélèvement des $PM_{2.5}$ au sein de l'OHM-BMP et sa localisation géographique.

Les emplacements exacts des sites de prélèvements (Tableau 3) ont été choisis en tenant compte de plusieurs contraintes : topologie, direction des vents dominants par rapport aux émetteurs visés et contraintes logistiques (alimentation électrique, sécurité, accès).

Site	Commune	Emetteur	Latitude (N)	Longitude (E)
S1	Bouc Bel Air	Cimenterie	43.42111	5.38403
S2	Gardanne	Usine d'alumine	43.45363	5.46672
S3	Meyreuil	Centrale thermique	43.46929	5.49844
S4	Fuveau	Trafic routier	43.47880	5.56662
S5	Trets	Urbain	43.44697	5.68693

Tableau 3. Coordonnées géographiques des sites de prélèvement.

Les cinq sites s'étalent d'Ouest en Est le long de la D6 (Figure 15 et Tableau 3) :

- Le site S1 à Bouc Bel Air est à environ 300 m à l'Nord/Nord-Ouest des cheminées la cimenterie et approximativement à 1 km au Sud de la carrière exploitée ; le préleveur est installé sur le toit-terrasse de l'agence commerciale régionale des Ciments Lafarge.
- Le site S2 à Gardanne est à 200 m à l'Est de l'usine d'alumine, du côté des stocks de bauxite ; le préleveur est installé dans le jardin de la Maison du Droit, à côté de la station fixe d'AirPACA.
- Le site S3 à Meyreuil situé à l'Est de la centrale thermique, est à environ 50 m de l'extrémité des tas de charbon ; le préleveur est installé dans un endroit isolé du parking d'une entreprise.
- Le site S4 à Fuveau est à environ 10 m de la D6, à 200 m de l'autoroute A52 et à 300 m de l'autoroute A8 ; le préleveur est installé sur le terrain de la station d'épuration de Fuveau.
- Le site S5 à Trets est à proximité du boulevard circulaire entourant le vieux village de Trets ; le préleveur est installé sur le toit de la cantine de l'école Edmond Brun.

1.2 Etude des poussières de sols, mise au point d'une approche méthodologique

Par le passé, le complexe chimique d'Estarreja (CCE) a produit de grandes quantités de déchets toxiques solides (incluant des cendres et poussières riches en As, Pb, Cu et Zn). Ces déchets ont été stockés jusqu'en 1986 à l'intérieur même du CCE. Cette zone industrielle de 2 km^2 est située à 1 km du centre-ville d'Estarreja. Même si la mise en application de normes a permis la régulation du stockage des déchets industriels, le CCE n'en reste pas moins de par sa taille et sa configuration une source majeure de pollution dans la région.

L'étude réalisée par Reis et al. (2015) s'est intéressée aux marqueurs d'exposition aux métaux et métalloïdes contenus dans les poussières de maisons (< 250 μm) et les ongles de pieds récoltés auprès de résidents d'Estarreja (Reis et al., 2015). Pour ce faire 21 maisons réparties sur le territoire d'Estarreja ont été prélevées. Parmi ces 21 sites, nous en avons sélectionné 5 (Figure 16) qui présentaient des compositions chimiques et des bioaccessibilités variables, afin d'élaborer une méthodologie qui permette d'évaluer le risque génotoxique de métaux et métalloïdes bioaccessibles contenus dans des poussières de sols.

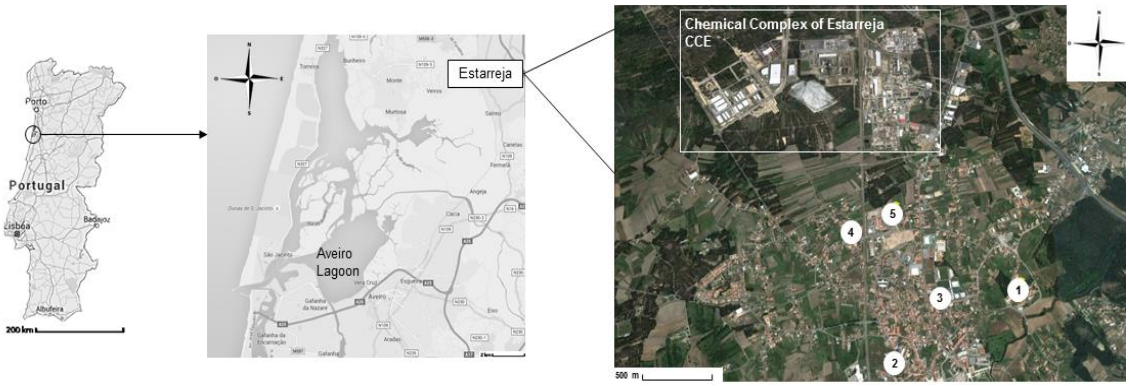


Figure 16. Sites de prélèvement des poussières au sein de l'OHM Estarreja et sa localisation géographique.

1.3 Etude des poussières de sols intérieurs et extérieurs à Trets

L'ingestion est une voie majeure d'exposition aux contaminants chez les enfants en bas-âge. Les particules ingérées par les enfants en intérieur et en extérieur dans des environnements qu'ils fréquentent régulièrement (crèches, écoles maternelles, aires de jeux) situés à proximité d'industries localisées dans la zone de l'OHM-BMP sont au cœur de notre projet.

L'étude des particules fines atmosphériques réalisée dans l'OHM-BMP a présenté des résultats de génotoxicité intéressants sur le site de Trets (voir l'article sur les $PM_{2.5}$). C'est pourquoi nous avons choisi l'école des Colombes à Trets pour commencer une campagne d'étude sur les poussières de sols intérieurs et extérieurs (Figure 17).



Figure 17. Sites de prélèvement des poussières de sols extérieurs et intérieurs au sein de l'école maternelle de Trets.

II. Caractérisation chimique

2.1. Fraction inorganique par ICP-MS

La spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif («*Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry* », ICP-MS) est une technique d'analyse permettant la quantification simultanée de nombreux éléments minéraux et métalliques.

Dans la caractérisation des $PM_{2.5}$, l'ICP-MS utilisé est le modèle Thermo Series II (Thermo-Electron, Les Ulis, France) équipé d'une Interface à collision et réaction afin de gérer les interférences par injection de gaz simples d'hydrogène (H_2), ou d'hélium (He) dans le plasma lors du passage à travers les orifices des cônes (Figure 18). L'étalonnage de l'appareil est réalisé à l'aide d'un mélange multi-élémentaire ajouté à de l'acide nitrique à 5%.

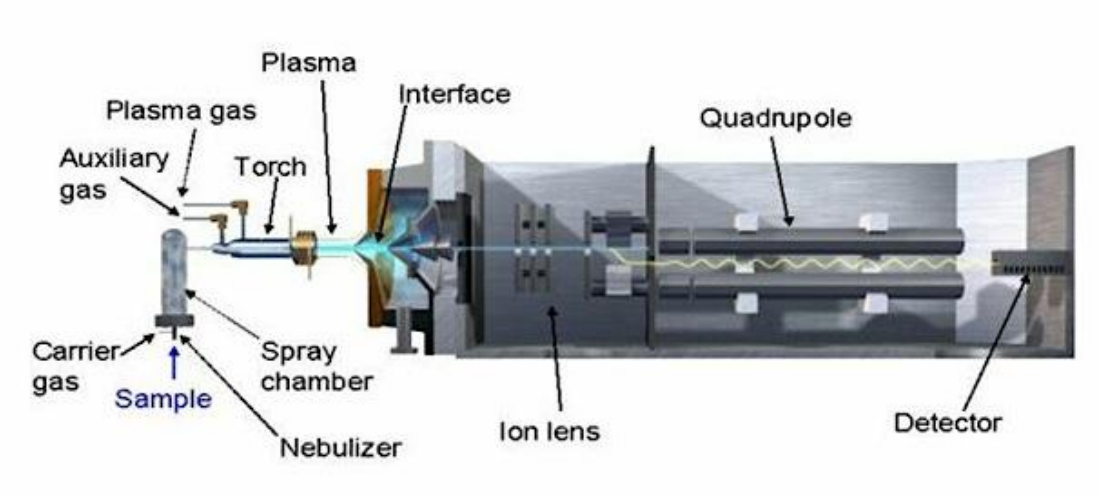


Figure 18. Principe de fonctionnement de l'ICP-MS Thermo Series II (Thermo-Electron, Les Ulis, France).

Une fois les échantillons traités, ils sont injectés dans le plasma sous la forme d'un fin aérosol, généré par un nébuliseur (dispositif pneumatique). Les ions formés sont capturés par un champ électrostatique puis canalisés vers le spectromètre de masse. Les ions capturés sont amplifiés par un multiplicateur d'électrons (Figure 18) puis quantifiés grâce au logiciel Plasmalab (Thermo-Electron, Les Ulis, France).

2.2 Fraction organique par GC-MS

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (« *gas chromatography-mass spectrometry* », GC-MS) est une technique d'analyse physique couramment employée. La combinaison d'une technique de séparation : la chromatographie alliée à une technique d'identification : la spectrométrie de masse, offre une bonne identification de la plupart des composés organiques.

Les analyses ont été réalisées à l'aide du chromatographe en phase gazeuse Autosystem XL (Perkin Elmer ; Norwalk, CT, USA), doté d'un injecteur automatique (30 s) et d'une colonne Elite 5 MS (30 m x 0,25 mm et de 0,25 µm d'épaisseur de film), couplés au détecteur de masse TurboMass (Perkin Elmer ; Norwalk, CT, USA) (Figure 19).

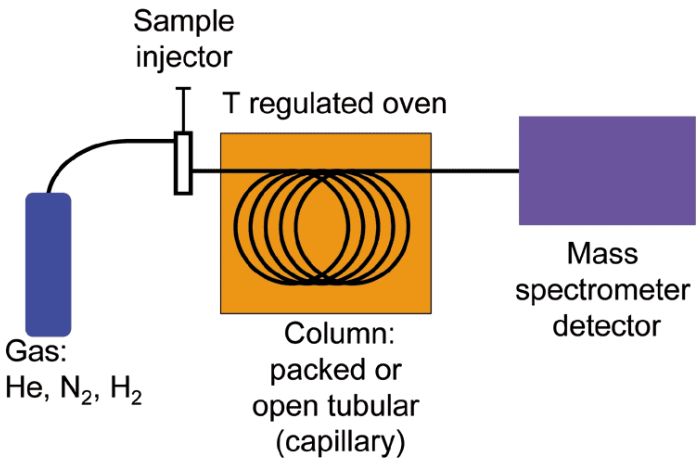


Figure 19. Principe de fonctionnement de la GC-MS (https://commons...gif).

Le gaz vecteur est l'hélium (1 ml/mn), il permet le maintien d'un flux constant. La température de l'injecteur est de 250 °C. La température du four de la GC a été programmée à 40°C (2 min), puis à 120°C (à raison de 45°C/min), et enfin à 310°C (à raison de 5°C/min), pour finalement se maintenir en iso-thermie pendant 20 min. Les molécules sont bombardées par un faisceau électronique de 70 eV. Les spectres de masse obtenus par impact électronique ont été acquis sur la gamme de masse 35-350 Da. Les HAPs sont identifiés par leur temps de rétention et leur ratio m/z, puis quantifiés par rapport aux standards internes utilisés (ex. chrysène d_{12} (m/z 240) et phénanthrène d_{10} (m/z 188)).

III. Méthode UBM, extraction des composés bioaccessibles

Le test de bioaccessibilité développé par le groupe de recherche BARGE est basé sur la physiologie digestive humaine (Wragg et al., 2011). C'est une technique d'extraction séquentielle comprenant trois phases : buccale, stomacale et intestinale. Nous nous sommes intéressés à la bioaccessibilité des EPTs dans la phase gastrique, plus représentative de l'exposition *in vivo* (Wragg et al., 2011)..

La composition des fluides salivaires et gastriques utilisés est récapitulée dans le Tableau 4, ainsi que les étapes d'extraction dans la Figure 20. Au cours du test la température est maintenue à 37 °C. Dans un tube 0,6 g de poussières sont mélangées avec 9 ml de salive (pH 6,5). La suspension est agitée pendant 5 minutes. Ensuite, 13,5 ml de solution gastrique (pH 1) est ajoutée à la suspension de poussières. Le pH de la solution est ajusté à 1,2 à l'aide d'HCl (37% g/g). La suspension est agitée pendant une heure. Suite à cette période, le pH est vérifié. S'il dépasse 1,7 alors la suspension est acidifiée en ajoutant de l'HCl, pour obtenir un pH compris entre 1,2 et 1,7. La fraction stomacale est alors extraite par centrifugation à 3000 g pendant 5 min et la concentration de l'élément est déterminée dans le surnageant, permettant d'obtenir la concentration dans la phase gastrique.

	Composés inorganiques	**Composés organiques**	**Autres composés**
Salive	10 ml KCl 89,6 g/l 10 ml KSCN 20 g/l 10 ml NaH_2PO_4 88,8 g/l 1,7 ml NaCl 175,3 g/l 1,8 ml NaOH 40 g/l	8 ml urée 25 g/l	145 mg amylase 15 mg acide urique 50 mg mucine
Phase gastrique	15,7 ml NaCl 175,3 g/l 3,0 ml NaH_2PO_4 88,8 g/l 9,2 ml KCl 89,6 g/l 18 ml $CaCl_2$-2 H_2O 22,2 g/l 10 ml NH_4Cl 30,6 g/l 8,3 ml HCl 37% g/g	10 ml glucose 65 g/l 10 ml acide glucuronique 2 g/l 3,4 ml urée 25 g/l 10 ml glucosamine hydrochloride 33 g/l	1 g albumine bovine 1 g pepsine 3 g mucine

Tableau 4. Composition des fluides utilisés pour l'extraction gastrique.

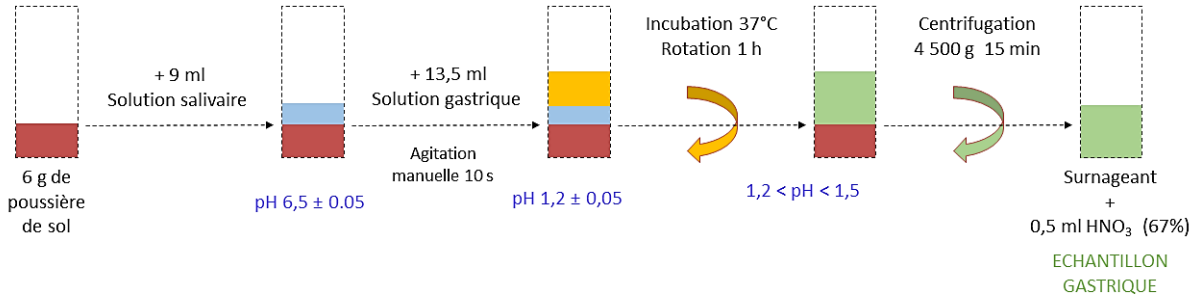


Figure 20. Schématisation du protocole UBM pour la phase gastrique.

IV. Choix des types cellulaires

4.1 Type cellulaire pulmonaire

Les particules atmosphériques fines sont fortement susceptibles d'être inhalées et les poumons sont les premiers organes exposés. Ces derniers sont constitués de plus de 40 types cellulaires différents. Nous avons choisi de réaliser l'étude toxicologique *in vitro* sur des cellules primaires : «*Normal Human Lung Fibroblasts*, NHLF». Ces cellules commercialisées par Lonza (Basel, Suisse) sont issues de tissus de poumons adultes obtenus par biopsies pulmonaires humaines. Les fibroblastes pulmonaires sont le type cellulaire le plus abondant dans l'interstice pulmonaire. Ces cellules jouent un rôle dans l'inflammation et le remodelage des voies aériennes.

4.2 Type cellulaire gastrique

Les particules de sols sont susceptibles d'être ingérées par les enfants, de par les contacts mains/objets-bouche, le tube digestif est ainsi le premier système exposé. Des études ont montré que la bioaccessibilité gastrique *in vitro* est plus représentative de la biodisponibilité *in vivo* que la bioaccessibilité intestinale *in vitro*. Nous nous sommes donc intéressés à la bioaccessibilité des composés dans les extraits gastriques, choisissant ainsi de réaliser l'étude toxicologique *in vitro* sur une lignée cellulaire : «*Human Stomach Adenocarcinoma*, AGS». Les cellules gastriques de la lignée AGS utilisées dans nos expérimentations sont commercialisées par la société CLS Cell Lines Service GmbH (Eppelheim, Allemagne). La lignée AGS est isolée après transfection par SV5 de cellules épithéliales gastriques humaines provenant de biopsies gastriques humaines.

V. Test de cytotoxicité *in vitro* : XTT et WST-1

5.1 Protocole

Les cellules sont mises en culture dans des plaques 96 puits, à raison de 10^5 cellules/puits, placées à l'étuve à 37°C sous 5% de CO_2 pendant 24 h. Elles sont ensuite exposées aux concentrations choisies de produit à tester pendant 24 h dans l'incubateur selon la configuration suivante (Figure 21) :

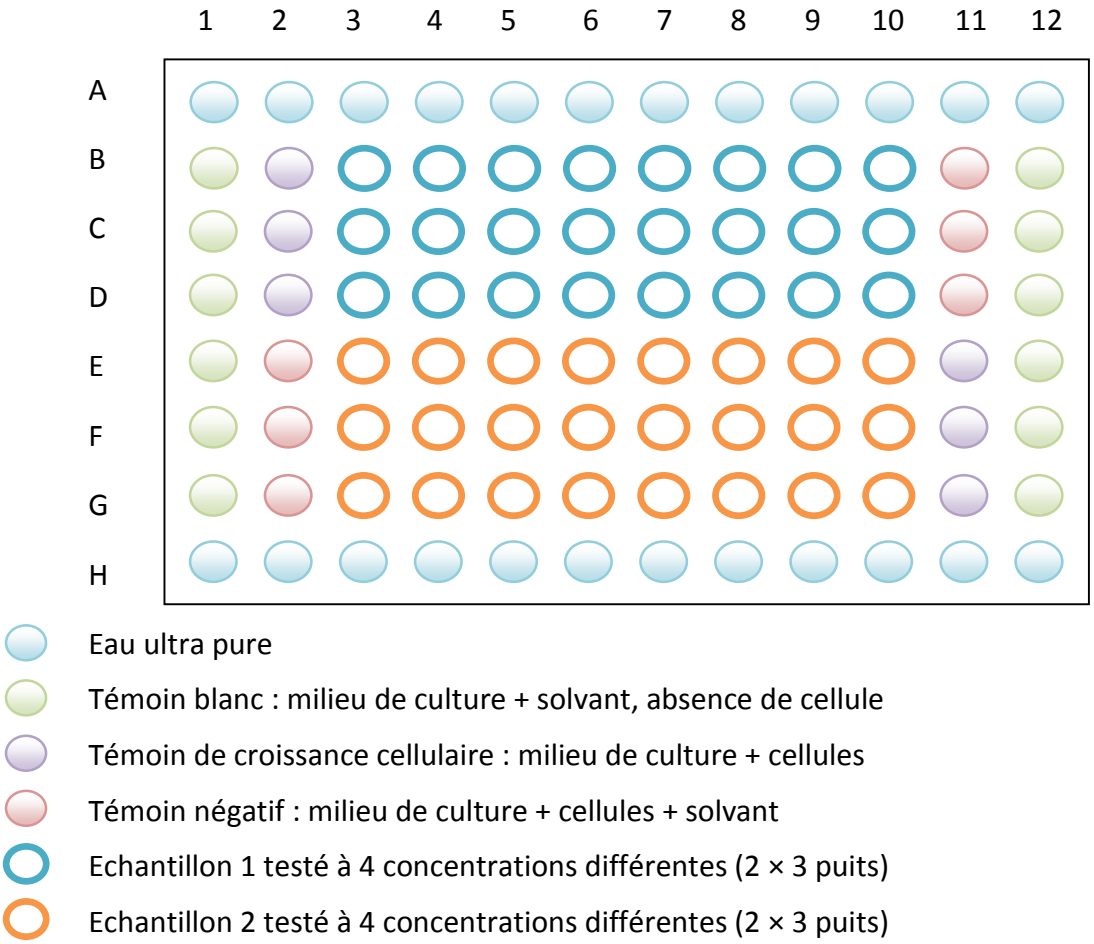


Figure 21 : Configuration de la plaque 96 puits.

Les cellules sont ensuite mises en contact avec une solution de sels de 2,3-bis [2-methoxy-4-nitro-5-sulfopheny]-2H-tetrazolium-5-carboxyanilide, fournie par Xenometrix (Switzerland).

5.2 Quantification et analyse

Après 3 h d'incubation pour le XTT ou 2 h d'incubation pour le WST-1, la viabilité cellulaire est quantifiée en mesurant l'absorbance à 450 nm, avec une longueur d'onde de référence de 690 nm grâce à un lecteur de microplaques (Multiskan FC, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

La longueur d'onde de référence est utilisée pour lire l'absorbance du bruit de fond afin de calculer ΔDO :

Différence de densité optique (ΔDO) = DO cellules ou surnageant – DO référence bruit de fond

Puis le ΔDO corrigé est calculé pour chaque composé testé aux différentes concentrations :

ΔDO corrigé = ΔDO échantillon ou contrôles - ΔDO blancs

Enfin, le % d'inhibition d'activité relatif est exprimé en pourcentage de solvant de contrôle :

% inhibition = 100 – (ΔDO corrigé échantillon × 100 / ΔDO corrigé contrôle)

La représentation graphique permet de déterminer la concentration entraînant une inhibition du paramètre suivi de 50%.

VI. Test de génotoxicité *in vitro*

6.1 Test du micronoyau avec marquage centromérique

- Durée du test : 4 jours
- Support de culture cellulaire : LabTek 4 puits
- Concentration cellulaire : 25000 cellules/puits
- Volume de culture cellulaire : 800 µl/puits

6.1.1 *En absence d'activation métabolique*

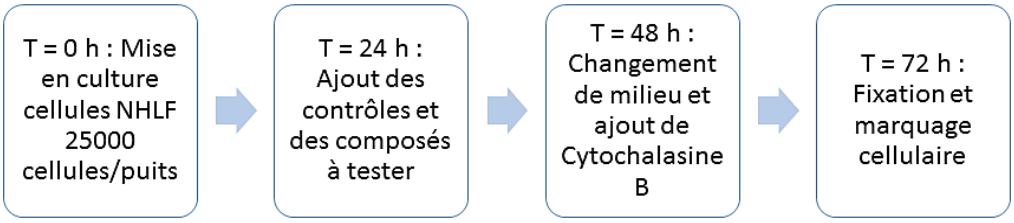


Figure 22. Schéma du protocole du test du micronoyau.

Les produits suivant ont été utilisés :

- Blanc : Milieu de culture ;
- Contrôle négatif solvant : milieu de culture + solvant de dilution des composés à 2% ;
- Composés à tester à différentes concentrations ;
- Contrôle positif clastogène : Mitomycine C (MMC, 10 ng/ml) ;
- Contrôle positif aneugène : Colchicine (25 nmol/l).

6.1.2 *En présence d'activation métabolique (uniquement sur les NHLF)*

Les composés des phases lipophiles des deux campagnes été et hiver ont été testés avec activation métabolique (Figure 23).



Figure 23. Schéma du protocole du test du micronoyau avec activation métabolique.

Les produits suivant ont été utilisés :

- Blanc : Milieu de culture = FBM ;
- Contrôle négatif solvant : DMSO ;
- Contrôle positif clastogène avec activation métabolique : Benzo[a]pyrène (BaP, 5 µg/ml) + S9 mix.

La fraction de S9 extraite de foie de rat contient des isoformes du CYP450 (phase I du métabolisme), des enzymes issues des microsomes, et des transférases (phase II du métabolisme) contenues dans le cytosol. Pour le S9 mix, les cofacteurs (G6P et NADP) ont été additionnés dans les proportions suivantes : 225 µl G6P ; 900 µl NADP ; 297 µl KCl ; 288 µl $MgCl_2$; 4,5 ml PBS ; 1,9 ml H_2O et 600 µl de S9 mix.

Le S9 mix est ajouté afin de simuler l'effet du métabolisme hépatique. En effet, certains composés (ex. benzo[a]pyrène) induisent la formation de produits cancérigènes une fois métabolisés.

6.1.3 Fixation et marquage cellulaire

A 78 h les cellules sont fixées grâce à du paraformaldéhyde (PAF) 4%. Elles sont ensuite traitées avec 0.5% de Triton X-100 et 2% de BSA en solution dans du PBS ce qui permet de perméabiliser les cellules.

Pour discriminer les pertes des cassures de chromosomes, les cellules sont incubées avec des anticorps anti-centromères (CREST : 1/1000ème - 2% BSA - PBS). Elles sont ensuite mises en contact avec des anticorps secondaires Alexa Fluor®488 anti-IgG humaines (1/200ème - 1% BSA - PBS). La phalloïdine-tétraméthylrhodamine B isothiocyanate (phalloïdine-TRITC, 0,06 µg/ml) est utilisée pour marquer les filaments d'actine et ainsi définir le compartiment cytoplasmique. Le marquage des noyaux est effectué grâce au 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1:50000), molécule qui s'intercale entre les paires de bases en se liant aux bases Adénine et Thymine et qui, de ce fait, émet une forte coloration bleu intense. Les lames sont finalement montées avec du Vectashield et conservées à 4°C dans l'obscurité jusqu'à l'analyse au microscope.

6.1.4 Quantification et analyse

Le comptage des cellules se fait au microscope à fluorescence Olympus BX60 (Rungis, France) équipé d'une caméra noir et blanc (Andor Luca S) avec 3 filtres appropriés pour la lecture du DAPI, de la phalloïdine-TRITC et de l'Alexa Fluor® 488 (Figure 24).

Les critères de comptage ont été établis en fonction de ceux définis par Fenech (Fenech, 2007). Les critères de sélection des cellules binucléées (BN) pour le comptage sont les suivants :

- Les cellules BN doivent avoir un cytoplasme intact et une morphologie nucléaire normale et les deux noyaux dans la cellule BN doivent avoir une membrane nucléaire intacte et être situés dans la même limite cytoplasmique
- Les deux noyaux dans la cellule BN doivent être approximativement de taille égale et avoir la même intensité de coloration
- Les deux noyaux dans la cellule BN peuvent se toucher mais ne doivent pas se superposer. On doit pouvoir distinguer les limites des membranes nucléaires des deux noyaux.

Les critères de sélection des micronoyaux (MN) pour le comptage sont les suivants :

- Les MN sont morphologiquement identiques mais plus petits que les noyaux principaux.
- Le diamètre des MN dans les lymphocytes humains varie entre 1/16ème et 1/3 du diamètre moyen des noyaux principaux ; ce qui correspond respectivement à 1/256ème et 1/9ème de l'aire de l'un des noyaux principaux dans une cellule BN
- Les MN sont non réfringents et peuvent facilement être distingués d'un artefact
- Les MN ne sont pas liés aux noyaux principaux : ils peuvent toucher les noyaux principaux mais on doit pouvoir distinguer clairement la limite entre la membrane des noyaux principaux et celle des MN
- Les MN ont la même intensité de coloration que les noyaux principaux

L'index de cytokinèse (« *Cytokinesis-Block Proliferation Index* », CBPI) indique le nombre moyen de cycles cellulaires réalisés durant la période d'exposition à la cytochalasine B, il est calculé sur 500 cellules par condition avant le comptage des micronoyaux (Kirsch-Volders et al., 2003; OECD, 2014a). La détermination du CBPI est utilisée pour calculer le % de cytostase (Benameur et al., 2011).

Les résultats de l'analyse des micronoyaux (MN) sont exprimés en fréquence de cellules binucléés avec des micronoyaux (CBMN) par 1 000 cellules binucléés, selon les critères précédemment décrits par Fenech (Fenech, 2007). Le marquage des centromères par les anticorps CREST permet de discriminer les micronoyaux contenant des chromosomes entiers positivement marqués (micronoyau centromérique, C+MN) de ceux contenant des fragments acentromériques non marqués (micronoyau acentromérique, C-MN) (Figure 24) (González et al., 2011; Iarmarcovai et al., 2006; Natarajan et al., 1996).

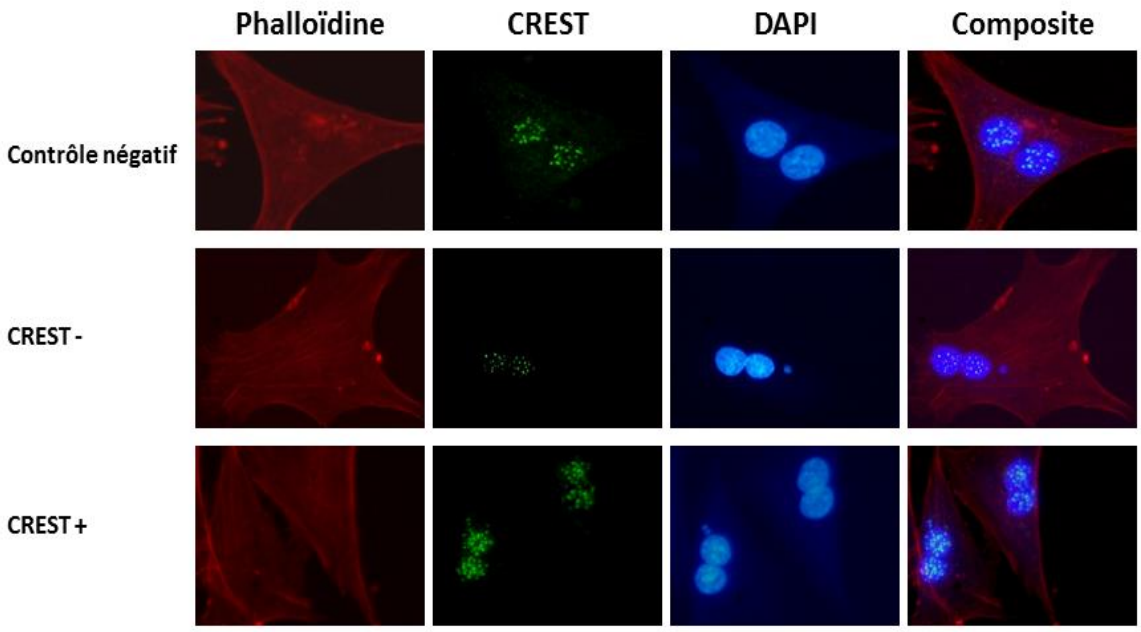


Figure 24. Test du micronoyau avec marquage centromérique, contrôle négatif, cellules binucléées avec et sans marquage.

6.2 Test des comètes en milieu alcalin

- Durée du test : 2 jours
- Support de culture cellulaire : plaque 12 puits
- Concentration cellulaire : 25000 cellules/puits
- Volume de culture cellulaire : 2 ml/puits

6.2.1 Préparation des réactifs

Solution mère de lyse

Solubiliser sous agitation et chauffage (≈ 100°C) :

- 900 ml d'EUP (eau ultra-pure) + agitateur
- NaCl (2,5 mol/l) : 146,4 g
- Na_2EDTA, 2 H_2O (0,1 mol/l) : 37,2 g
- Trizma base (10 mmol/l) : 1,2 g
- 5g de pastilles de NaOH

Quand tout est solubilisé, ajuster le pH à 10 avec des pastilles de NaOH, puis compléter à 1000 ml avec de l'EUP.

Tampons de dénaturation et d'électrophorèse

Solution 1 (300 mmol/l NaOH) : NaOH (pastilles), 10 N : 40 g + 100 ml d'EUP

Solution 2 (1 mmol/l EDTA) : Na_2EDTA, 2 H_2O (200 mmol/l) : 7,4 g + 100 ml d'EUP

Tampon de neutralisation

Dans 800 ml d'EUP, solubiliser 43,65 g de Trizma base (0,4 mol/l), puis compléter à 900 ml. Ajuster le pH à 7,5 avec du HCl concentré.

6.2.2 Protocole

Après 24 h d'incubation des cellules dans la plaque 12 puits, les cellules sont incubées 2 h avec les produits à tester. A la fin des 2 h d'incubation les cellules sont isolées (trypsinées puis centrifugées). Le culot est remis en suspension dans de l'agarose LMP 1% puis la suspension est déposée sur une lame préalablement « *precoated* » avec du NMP 1,6% et du NMP 0,8%. Les lames « témoins positifs » sont exposées à 125 µM de H_2O_2 pendant 5 min à 4°C. Après 1 h 30 de lyse (2,5 M NaCl ; 100 mM Na_2EDTA ; 300 mM NaOH ; 10 mM Tris à pH 10 supplémenté avec 10% DMSO et 1% Triton X-100) à 4°C les cellules sont immergées 20 min dans un tampon de dénaturation (300 mM NaOH et 1 mM EDTA) à 5°C. S'en suit une électrophorèse (27 V et 300 mA) de 20 min à 4°C. Les lames sont ensuite rincées avec un tampon de neutralisation (4 mM Tris à pH 7,5) avant d'être finalement déshydratées quelques secondes avec du méthanol.

6.2.3 Quantification et analyse

L'évaluation du « *% Tail DNA* » des comètes se fait au microscope à fluorescence BX 60 (Olympus; Rungis, France) avec un filtre approprié et le logiciel Komet 6.0 (Andor™ Technology; Belfast, UK), après avoir ajouté de l'iodure de propidium sur les lames (Figure 25). Pour chaque condition 100 cellules sont analysées.

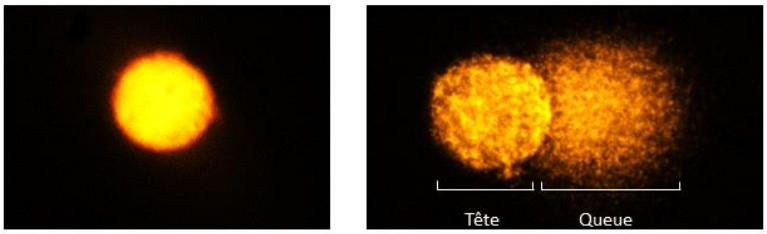


Figure 25. Cellules observées au microscope à fluorescence, à gauche : cellule non lésée, sphérique ; à droite : dommages à l'ADN cellule en forme de comète.

VII. Test statistiques

7.1 ANOVA

Les résultats de cytotoxicité et de génotoxicité sont exprimés en valeur moyenne et l'erreur standard à la moyenne (SEM) à partir de trois expériences indépendantes. Les données ont été traitées par ANOVA grâce au logiciel GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA). Ce logiciel a également été utilisé pour réaliser les graphiques.

L'objectif d'une analyse de variance (« *ANalysis Of VAriance* », ANOVA), vise à tester les différences significatives entre plusieurs moyennes quantitatives de groupes indépendants. Ce test présente l'avantage d'être assez robuste pour être utilisé même si les distributions s'écartent légèrement de la normalité.

Les analyses en composantes principales et les corrélations de Spearman ont été réalisées pour mettre en évidence des corrélations et des liens éventuels entre les composés chimiques présents dans les extraits et les cassures chromosomiques causées par l'exposition des cellules à ces extraits.

7.2 Analyse de la composante principale (PCA)

L'analyse en composantes principales (*« Principal Component Analysis »*, PCA) est une méthode fondamentale en statistique descriptive multidimensionnelle (Schilirò et al., 2015). Elle permet de traiter simultanément un nombre quelconque de variables quantitatives.

L'objectif de la PCA est de revenir à un espace de dimension 2 en déformant le moins possible la réalité. La matrice des variances-covariances permet de réaliser un résumé pertinent des données de dispersion. C'est l'interprétation des graphiques qui amène à comprendre la structure des données analysées (Schilirò et al., 2015).

7.3 Corrélation de Spearman

La corrélation de Spearman permet d'analyser les relations non-linéaires monotones. Le coefficient de Spearman, ou coefficient de corrélation de rang, examine s'il existe une relation monotone (croissante ou décroissante) entre les rangs des observations pour deux caractères définis, en l'occurrence composition chimique et dommages chromosomiques (http://grasland...htm).

Partie V. Résultats et discussion

Les parties précédentes nous ont permis, d'une part, de décrire les principales caractéristiques physico-chimiques des particules atmosphériques et des poussières de sols ainsi que leurs effets sur la santé humaine, et d'autre part, de présenter les sites étudiés, et les matériels et les méthodes utilisés dans notre étude afin d'évaluer la toxicité induite par les fractions particulaires des aérosols atmosphériques collectés. Nous allons maintenant aborder dans cette cinquième partie les résultats de ce travail et les discuter.

I. Particules atmosphériques fines dans l'ancien bassin minier de Provence, France : caractérisation et génotoxicité

1.1 Introduction

L'avis de l'AFSSET, en date du 23 Mars 2009, concernant la pollution atmosphérique par les particules, a confirmé, s'il en était besoin, l'importance de l'impact sanitaire de ce type de pollution tant en milieu urbain qu'à proximité de sites industriels. Cet avis a mis en évidence l'absence de seuil, la prépondérance de la chronicité de l'exposition, les inégalités d'exposition aux particules en fonction des lieux d'habitats et de sensibilités particulières, mais également le manque de données sur les caractéristiques physico-chimiques et les impacts sanitaires potentiels des particules émises par des sources autre que la combustion. Cet avis a donc mis en exergue la nécessité d'approfondir les connaissances des sources émettrices, tant quantitativement que qualitativement, si l'on veut mettre en place des actions de réduction des émissions qui soient efficaces sur le plan sanitaire et supportable économiquement.

Le corridor industriel constitué autour de l'axe Bouc-Bel-Air/Meyreuil intégré dans l'OHM-BMP représente une zone d'étude particulièrement intéressante. Cette zone concerne directement 4 communes (Bouc-Bel-Air, Simiane/Collongue, Gardanne et Meyreuil) totalisant une population de plus de 45 000 habitants en 2009 (en augmentation de près de 10% depuis 1999). Du Sud-Ouest en direction du Nord-Est, se succèdent sur environ 10 km : une cimenterie, une usine de production d'alumine et une centrale électrique thermique au

charbon. Ces établissements se situent à proximité, sinon au sein même, de zones d'habitations, d'équipements sportifs et d'espaces commerciaux. Très visibles dans le paysage et potentiellement générateurs de nuisances (particules, odeurs, bruits), les industriels sont pointés du doigt mais l'impact effectif sur la santé des populations dans la zone n'est pas connu.

L'étude, en termes de composition chimique et de potentiel génotoxique, de particules atmosphériques fines prélevées sur différents sites de l'OHM-BMP, présentée dans l'article suivant, s'inscrit dans un projet pluridisciplinaire, PACTES-BMP : « Particules Atmosphériques Caractérisation, Toxicité et Evaluation Sociétale dans l'OHM-BMP », qui a réuni des équipes de géochimistes, biologistes et sociologues, ainsi qu'un organisme de surveillance de la qualité de l'air. Ce projet visait à apporter aux populations et aux décideurs, une meilleure connaissance de la réalité objective et donc une meilleure approche du risque éventuel sur leur territoire.

Pour notre étude, cinq sites caractérisant des sources émettrices de $PM_{2.5}$ spécifiques ont été choisis dans l'OHM-BMP (Figure 15). Deux campagnes (été et hiver) de prélèvements ont été réalisées, à partir desquels nous avons extraits des phases hydrophiles et lipophiles. Les composés hydrosolubles (13 métaux et métalloïdes) et liposolubles (16 HAPs recommandés par l'US-EPA) ont été caractérisés par ICP-MS et GC-MS, respectivement. La cytogenotoxicité a été évaluée *in vitro* à l'aide de cellules pulmonaires humaines (NHLF), considérés comme représentatives de l'exposition humaine *in vivo*. La cytotoxicité a été évaluée à l'aide du test XTT, et la génotoxicité au moyen du test du micronoyau associé à un marquage centromérique. Les agents lipophiles étant les agents les plus susceptibles d'être métabolisés par des CYP450, la fraction lipophile a été testée en absence et en présence d'un facteur d'activation métabolique *in vitro* : le S9 mix. Les relations entre les données environnementales et les dommages chromosomiques évaluées *in vitro* sur les cellules NHLF ont été investiguées à l'aide de deux tests statistiques : l'analyse en composantes principales (PCA) et les corrélations de Spearman.

Les résultats de nos travaux ont été soumis pour publication sous la forme d'article scientifique dans le journal « Toxicological & Environmental Chemistry Journal » (Plumejeaud et al.). Dans la partie suivante les principaux résultats sont présentés et discutés.

Fine atmospheric particles emitted by industrial, traffic and urban sources in France: characterization and genotoxicity

Environmental Geochemistry and Health

Aurélie Bonnefoy[1a], Sophie Plumejeaud[1a], Yves Noack[2], Dominique Robin[3], Pierre Doumenq[4], Florence Chaspoul[1], Virginie Tassistro[1], Thierry Orsière[1*]

[1] *IMBE, Aix Marseille Université, CNRS, IRD, Avignon Université, 13005 Marseille, France*

[2] *Aix Marseille Université, CNRS, CEREGE UM34, 13545 Aix en Provence, France*

[3] *AirPACA, Air Quality Observatory in Provence Alpes Côte d'Azur, Marseille, France*

[4] *Aix Marseille Université, CNRS, Laboratoire Chimie Environnement, FRE 3416, équipe MPO, 13545 Aix en Provence, France*

[a] Authors contributed equally

* Corresponding author: Thierry Orsière: IMBE, Aix Marseille Université, CNRS, IRD, Avignon Université, 13005 Marseille, France. Phone: +33 491 324 571; email: thierry.orsiere@imbe.fr

Aurélie Bonnefoy: aureliebonnefoy@yahoo.fr - +33 491 324 548

Sophie Plumejeaud: sophie.plumejeaud@imbe.fr - +33 491 324 548

Florence Chaspoul: florence.chaspoul@univ-amu.fr - +33 491 809 469

Virginie Tassistro: virginie.tassistro@imbe.fr - +33 491 324 548

Yves Noack: noack@cerege.fr - +33 442 971 528

Dominique Robin: dominique.robin@airpaca.org - +33 491 323 800

Pierre Doumenq: pierre.doumenq@univ-amu.fr - +33 491 288 939

Fine atmospheric particles emitted by industrial, traffic and urban sources in France: characterization and genotoxicity

Health risks associated with fine particulate matter ($PM_{2.5}$) inhalation depend on their atmospheric levels and physicochemical properties. The relationships between chemical compositions and genotoxic activities of $PM_{2.5}$ emitted by mineral industries, traffic and urban sources during summer and winter in the PACA region (France) were investigated.

$PM_{2.5}$ were extracted in a hydrophilic and a lipophilic phases and water-soluble (13 minerals and metals) and organic-extractable (16 PAHs) components were quantified. The chromosome damaging properties of the $PM_{2.5}$ hydrophilic and lipophilic (with and without metabolic activation) extracts were assessed using centromeric micronucleus assay on human lung fibroblast cell line.

$PM_{2.5}$ composition was heterogeneous and influenced by the sources and seasons. The hydrophilic and lipophilic extracts induced chromosome damage. We have shown that (1) Ca and Zn influenced chromosome losses induction in hydrophilic extracts, (2) acenapthylene influenced chromosome damage (breakages and losses) induction and naphthalene influenced chromosome damage and losses induction in lipophilic extracts without metabolic activation, and (3) benzo[a]pyrene influenced chromosome losses induction in lipophilic extracts with metabolic activation. The coal-fired power station, road traffic and urban sites were the most efficient to induce chromosome breakages. Human activities, mainly related to combustion, appeared to be responsible of the observed $PM_{2.5}$ genotoxic properties.

Keywords: fine atmospheric particles ($PM_{2.5}$); particulate matter; mineral industries; polycyclic aromatic hydrocarbons; genotoxicity; cytokinesis-block micronucleus assay

1. Introduction

Health risks posed by environmental contaminants depend on their concentration, on the duration of exposure and on the physiological / behavioral characteristics of the target. Routes of human exposure to pollutants consist mainly of inhalation, non-dietary ingestion, and dermal adsorption (Kang et al., 2011). Health risks associated with fine atmospheric particulate matter ($PM_{2.5}$) exposure by inhalation depend on their aerodynamic size fraction, atmospheric levels, and also to their physical properties and chemical composition (Brüggemann et al., 2009).

$PM_{2.5}$ composition is heterogeneous and complex depending on their emission sources, the distance from their sources and the seasons during which they are generated (Brüggemann et al., 2009). $PM_{2.5}$ can be considered as an inorganic core made of ions, metals, and inorganic carbonaceous species, coated with organic compounds such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), volatile organic compounds (VOC), as well as crustal and biological elements (Lepers et al., 2014). André et al. (2011) reported that some VOC and PAHs (i.e. benzene, benzo[a]pyrene, naphthalene, benz[a]anthracene, fluoranthene) adsorbed onto $PM_{2.5}$ collected in the urbano-industrialized area of Dunkerque (France) were classified as carcinogenic agents by IARC, and many of them

act by inducing genotoxicity (Pope III C et al., 2002; Valavanidis et al., 2008). During the phase I of the metabolism (involving CYP450 isoforms), some of the lipophilic compounds are bioactivated in electrophilic metabolites that interact with different intracellular macromolecules such as DNA, proteins, or lipids (Zhang et al., 2009). In 2013, exposure to outdoor air pollution has been considered to cause lung cancer in human by IARC, and particulate matter, a major component of outdoor air pollution, was evaluated separately and was also classified as carcinogenic to humans (WHO, World Health organization, 2013).

Provence-Alpes-Côte d'Azur (PACA) region, in the southeastern part of France, is particularly affected by the procedure of litigation initiated by the European Commission due to frequent exceedances of $PM_{2.5}$ in six areas, including Aix-Marseille area (DREAL, Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement, 2010). The WHO 2005 guideline limits aimed to achieve the lowest $PM_{2.5}$ concentrations possible: 10 $\mu g/m^3$ annual mean and 25 $\mu g/m^3$ daily mean (WHO, 2014). Between Aix-en-Provence and Marseille is located the "Bassin Minier de Provence" (BMP), a former coal mining area. Even if the last mine pit closed in 2003, the region is still occupied by a coal-fired power station, a cement works and an alumina plant, industries generating particulate matter (Reis et al., 2014). As BMP constitutes a characteristic urban-industrialized territory where different pollution sources coexist: mineral industries, traffic road and domestic emissions, we choose this area for investigating relationships between origins, physicochemical characteristics and genotoxicity of $PM_{2.5}$.

Numerous studies investigating $PM_{2.5}$ genotoxicity mainly focused on the implication of organic compounds (i.e. polycyclic aromatic carbons, phthalates esters) in the mutagenic potentials of atmospheric fine particles (Borgie et al., 2015; Lepers et al., 2014; Líbalová et al., 2014; Oh et al., 2011). However, as far as we know, no study on $PM_{2.5}$ emitted by mineral industries genotoxicity was published; moreover most if not all the publications relative to $PM_{2.5}$ reported mutagenic and/or chromosome damaging effects without discriminating chromosome breakage and losses. The importance of such study is given by the fact that a very large proportion of carcinogens act through DNA or chromosome damaging properties. Additionally, a single gene or chromosome mutation is still considered to be able to give rise to a clonal expansion and to a tumor. No threshold value can be established for direct DNA damaging agents. Consequently, it appears necessary to evaluate the contribution of the different emission sources of $PM_{2.5}$ and the genotoxic potential of the $PM_{2.5}$ lipophilic and hydrophilic extracts to identify hazards that may lead to increased risk of cancer exposure effects through $PM_{2.5}$ inhalation.

The present work aimed at determining the relationship between the chemical compositions of five $PM_{2.5}$ samples collected under three main influences (industrial, traffic and urban) and during two seasons (summer 2010 and winter 2011), and their genotoxic activities. To this end, $PM_{2.5}$ were extracted in two phases (hydrophilic and lipophilic) and the objectives of this research were to: (1) quantify the concentrations of 13 inorganic elements (Na, Al, Ca, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Mo, and Pb) in the water-soluble fractions; (2) quantify the concentrations of the16 US-EPA recommended PAHs (acenaphthylene, acenaphthene, anthracene, chrysene, fluoranthene, fluorine, phenanthrene, pyrene, naphthalene, benz[a]anthracene, benz[a]pyrene, benzo[b+k]fluoranthene, benzo[g,h,i]perylene, dibenz[a,h]anthracene, indeno[1,2,3,c,d]pyrene) in the organic-extractable fractions; (3) assess the DNA-damaging ability of both hydrophilic and lipophilic (with and without metabolic activation) extracts obtained from the $PM_{2.5}$ collected on filters using the cytokinesis-block

micronucleus (CBMN) assay on the normal human lung fibroblast (NHLF) cell line, highly relevant to assess genotoxic effects induced in human through inhalation to human exposure; and (4) evaluate potential associations between the chemical compositions of the $PM_{2.5}$ and their genotoxicity.

2. Material and methods

2.1 Study area and $PM_{2.5}$ *sampling*

The western part of the BMP is still occupied by various industries known to emit particulate matter such as a coal-fired power station burning imported coal, an alumina plant, and a cement works (Figure 1). BMP has been affected by the dynamics of Aix-Marseille metropolitan area, due to the economic development of the region to new residential practices. As a result, urbanization has been spreading over forest and agricultural areas, and mineral industry, road traffic and urban pollutions are becoming the three main environmental issues among the new residents (Reis et al, 2014).

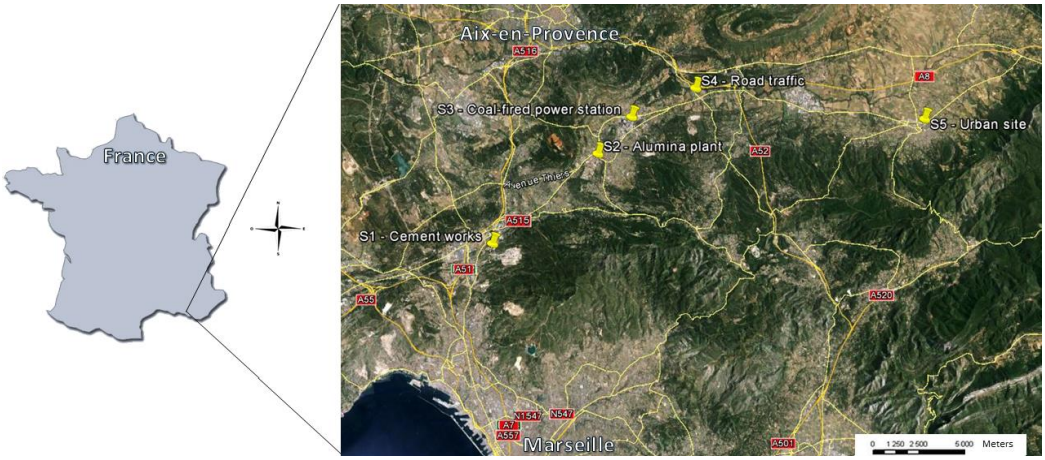


Figure 1. Map of the "Bassin Minier de Provence" (BMP) located in France with the five sampling sites.

Samplings were carried out within five sites related to a particular type of exposure close to, respectively, (a) three mineral industries (cement works, alumina plant and coal-fired power station), (b) a heavy traffic road, and (c) an urban site considered free of industrial influences. The geographical locations of the different sites were optimally defined according to the following criteria: site topology, prevailing wind direction, and logistical constraints such as electric power and accessibility. The locations of the five sites were described in Table 1.

	Site	Location	Description
S1	**Cement works**	43.4211°N, 5.3840°E	300 m north/northwest from factory chimneys; 1 km south from the quarry, in a very low urbanized area
S2	**Alumina plant**	43.4536°N, 5.4667°E	200 m east from the alumina plant close to bauxite stocks
S3	**Coal-fired power station**	43.4693°N, 5.4984°E	50 m east from coal piles
S4	**Road traffic**	43.4788°N, 5.5666°E	10 m from the heavy traffic highway and 200 m from a freeways junction
S5	**Urban site**	43.4470°N, 5.6869°E	Downtown in a city of a 10000 inhabitants

Table 1. Description of the sampling sites.

Samples were collected during seven consecutive days in summer (July) and in winter (January). A high-flow sampler (Digitel DA 80: 30 m^3/h) was used to collect $PM_{2.5}$ on 150 mm quartz fiber filters (ALBET QFH 150, untreated) and was programmed to collect samples for 24 h (00:00 – 23:59). Filters were weighed before and after collection and were stored protected from light at -20°C (avoiding photo degradation and evaporation losses) for further chemical and biological investigations.

2.2 Chemical characterization

2.2.1 Inorganic elements analysis

A quarter of filter was solubilized in 5 ml of HNO_3 ultrapure (Optima, Fisher Scientific), then sonicated before dilution to 50 ml with ultrapure water.

We analyzed by ICP-MS 13 inorganic elements: minerals and metals (Table 3) in triplicate by ICP-MS using a Thermo Series II ICP/MS apparatus (Thermo-Electron, Les Ulis, France). Operational parameters are given in Table 2. Calibration curves for the 13 individual elements were determined with a multi-elements solution in 5% HNO_3 to yield 1 to 500 µg/l of each element. The background level of each inorganic element was determined on blank filters and then subtracted from the level found for each sample. Minerals and metals concentrations were finally determined using Plasmalab software (Thermo-Electron, Les Ulis, France).

Parameter	**Argon gas flow rates**			**RF power**	**Sampling depth**	**Nebulizer**	**Spray chamber**	**Spray chamber temperature**	**Sample uptake**
	Plasma	Auxiliary	Carrier						
Value	14.8 l/min	0.9 l/min	1.1 l/min	1350 W	6.8 mm	Concentric	Cyclonic	2°C	1 ml/min

Table 2. ICP-MS analysis settings.

2.2.2 Organic elements analysis

All reagents used were of analytical grade. Acetone and n-hexane were purchased from VWR International (Fontenay sous bois, France). Merck (Darmstadt, Germany) provided the dichloromethane.

On dried filters we performed a pressurized liquid extraction using an accelerated solvent extraction system (ASE 350 - Dionex, Sunnyvale, CA, USA), with acetone / dichloromethane (50:50 v:v) at 100°C and 103 kPa. The extracts were then concentrated to 0.5 ml under N_2 stream at 25°C using a Turbovap II (Caliper Lifesciences, Hopkinton, MA, USA). Finally, the residues were adjusted to 1 ml using n-hexane.

In addition to the 13 water-soluble components, we further analyzed the 16 PAHs recommended by US-EPA (Table 4) in triplicate by GC-MS on an Autosystem XL GC and TurboMass from Perkin Elmer (Norwalk, CT, USA). Chromatographic conditions were as follows: splitless injection (30 s), Elite 5 MS column (30 m × 0.25 mm and 0.25 µm film thickness). The GC oven was temperature programmed from 40°C (2 min) then rose to 120°C (45°C/min) and up to 310°C (5°C/min) before holding isothermally for 20 min. The splitless injector was temperature programmed from 50°C (0.1 min) and rose to 250°C (200°C/min), before holding isothermally for 10 min. Helium (1 ml/min) was used as carrier gas in constant flow mode. The mass spectrometer was operated in the electron ionization mode (70 eV) and simultaneously scanned in both full scan and selected ion

monitoring (SIFI mode). PAHs were identified from retention time and m/z ratios of standards, and then quantified using deuterated internal standards as surrogates (chrysene d_{12} and phenanthrene d_{10}; CIL, Andover, MA, USA).

Calibration curves for the 16 individual PAHs were determined with a 16-PAHs mix solution (Supelco, Bellefonte, PA, USA). The blanks always returned results that were below the detection limit; and the coefficient of variation between the PAHs concentrations of duplicate samples was less than 10%.

2.3 Extraction of the hydrophilic and lipophilic fractions

To extract the hydrophilic and lipophilic fractions of the collected $PM_{2.5}$, the procedure applied to each filter was already described in previous studies (Gutiérrez-Castillo et al., 2005; Zheng et al., 1997). Briefly, each filter was divided into two equal parts that were agitated for 30 min in an ultrasonic bath either with 20 ml Milli-Q deionized water to extract hydrophilic compounds, or with dichloromethane to extract lipophilic compounds. Soluble components were separated from the insoluble ones by centrifugation at 2500 rpm for 10 min. The supernatants were filtered using nylon 0.45 µm syringe filters. For the hydrophilic fractions, the resultant filtrate was freeze-dried in vacuum, and then weighed; for the lipophilic ones, the resultant filtrate was totally evaporated using a stream of N_2 gas, then weighed. The hydrophilic and lipophilic pellets were then dissolved in either Milli-Q deionized water or DMSO, respectively, at a concentration of 5 mg/ml, then filtered using 0.22 µm syringe with hydrophilized poly(tetrafluoroethylene) (PTFE) filters. These stock solutions were stored at -20°C until analysis. Blank filters were handled and treated under the same procedure. This procedure was carried out on the filters collected during the 7 days of sampling for each site and season. The 7 stock solutions obtained for each site and season were pooled to perform the cytotoxicity and genotoxicity assays.

2.4 In vitro cytotoxicity and genotoxicity assays

2.4.1 Cell culture and cell viability

Adherent normal human lung fibroblasts (NHLF) cells were maintained in FBM supplemented with 0.1% human fibroblast grow factor-B, 0.1% insulin, 2% FBS, and 0.1% gentamicin/amphotenicin-B at 37°C under 5% of CO_2. Clonetics (Lonza, Basel, Switzerland) provided all these reagents.

Cell viability was assessed using a XTT assay kit (2H-Tetrazolium, 2.3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-hydroxide, inner salt) according to the manufacturer's instructions (Xenometrix, Hégenheim, France). Cells, grown in a 96-well plate at a density of 10^5 cells/well, were incubated with the tested materials (hydrophilic extracts at 3 - 6 - 12 - 25 µg/ml; and lipophilic extracts at 1 - 2.5 - 5 - 10 µg/ml) for 24 h before adding the XTT reagent. After 3 h incubation, cell viability was quantified with a scanning multi-well spectrophotometer microplate reader (Multiskan, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) using 450 nm and 690 nm emission filters. Three independent experiments were performed for each extract.

2.4.2 Genotoxicity evaluated by cytokinesis-block micronucleus assay (CBMN) assay in combination with centromere labeling

4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), Goat anti-human Alexa Fluor® 488, Trypsin 0.25% EDTA, Fetal Bovine Serum (FBS), and PBS Dulbecco's were obtained from Life technologies (Saint Aubin, France).

Paraformaldehyde (PFA) 4% PBS was from EMS (Hatfield, PA, USA). Bovine Serum Albumin (BSA) fraction V was purchased from Eurobio (Courtaboeuf, France). Vectashield was provided from Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA). S9 microsomal rat liver extract and cofactors were purchased from Xenometrix (Hégenheim, France). Human anti-kinetochore antibodies (CREST) were obtained from Laboratory of Immunology at the Hôpital de la Conception, Marseille (France). The other reagents were from Sigma-Aldrich (Lyon, France).

The CBMN assay was performed according to the original method described by Fenech (Fenech, 2007), with minor modifications for centromere labeling that was performed as described by González (González et al., 2011). Cells were seeded at a concentration of 2.5 x 10^4 cells/chamber in LabTek™ 4-Chamber Slide™ (Nuc International, Villebon-sur-Yvette, France), and cultured under standard conditions (37°C, 5% CO_2). After 24 h culture, slides were treated with increasing concentrations of the extracts (0.375 - 0.75 - 1.5 - 3 µg/ml for hydrophilic extracts; 0.125 - 0.25 - 0.5 - 1 µg/ml for lipophilic extracts), vehicle control (0.25% H_2O and DMSO, respectively), and appropriate clastogenic (10 ng/ml mitomycin C, MMC) and aneugenic (25 nM colchicine, col.) positive controls. At the end of the treatment (24 h), the medium was removed and replaced by fresh medium containing 3 µg/ml cytochalasin B to inhibit cell division after mitosis. After additional 24 h incubation, the culture medium was further changed and, after 2 h incubation, cells were washed in PBS and fixed (4% PFA). To discriminate chromosome losses and breakages, cells were incubated with CREST serum (1: 1000 in 1% BSA/PBS) for 30 min. Cells were washed in 0.5% Triton X-100/PBS and incubated with secondary antibody goat anti-human Alexa Fluor® 488 (1: 200 in 1% BSA/PBS) for 1 h. Cells were then washed in 0.5% Triton X-100/PBS and incubated with a 0.06 µg/ml solution of phalloidin-TRITC (tetramethylrhodamine B isothiocyanate) for 30 min to stain the cytoplasm. After two washes in 0.5% Triton X-100/PBS, cells were incubated with a solution of 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1:50000) for 10 min to stain the nuclei. Finally, the slides were mounted in Vectashield and stored in dark at 4°C until analysis.

The experiments were performed also upon metabolic activation and we proceed to the following adaptations: NHLF cells were treated with S9 mix (10% S9 supplemented with 5 mM G6P, 4 mM NADP, 33 mM KCl, and 8 mM $MgCl_2$-6 H_2O diluted in phosphate buffer) and increasing concentrations of lipophilic extracts (0.125 - 0.25 - 0.5 - 1 µg/ml) for 3 h. As positive control, cells were incubated with benzo[a]pyrene (BaP, 5 µg/ml), which served as proclastogenic control agent. Cells were then washed twice in PBS and cultured for 21 h. Addition and removal of cytochalasin-B were performed as described previously in absence of metabolic activation.

Micronuclei (MN) contained in binucleated cells were scored using a fluorescence microscope BX 60 (Olympus; Rungis, France) equipped with a black-and-white camera (Andor Luca S), and appropriate filters for DAPI, phalloidin-TRITC, and Alexa Fluor® 488.

Before the analysis, we calculated the cytokinesis block proliferation index (CBPI) on 500 viable cells to provide the average number of cell divisions completed by the cells, as previously described (Benameur et al., 2011; Kirsch-Volders et al., 2003). Micronucleus analysis results are expressed as a frequency of binucleated cells with micronuclei (BNMN) per 2000 binucleated cells; scoring criteria were in accordance with those previously described (Fenech, 2007). Taking advantage of the CREST staining, micronuclei containing whole

chromosome(s), which are positively labeled (centromeric micronuclei, C+MN), and acentric chromosome fragments, which are not marked due to the absence of centromere (acentromeric micronuclei, C−MN) were discriminated (González et al., 2011; Iarmarcovai et al., 2006; Mateuca et al., 2006; Natarajan et al., 1996). Two chambers were prepared per concentration, and micronuclei were counted for 1000 binucleated cells on each chamber. Results were expressed as mean of n = 2 slides × 3 independent experiments.

2.4.3 Statistical analysis

Cytotoxic and genotoxic results are expressed as the mean value of three independent experiments ± standard deviation (SD). Data were submitted to statistical evaluation using one-way or two-way ANOVA. Normality and homoscedasticity were assumed. GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA) software was used to perform statistical analysis and to draw the graphics. The significance was compared to negative controls. Values were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Relationships between water-soluble or organic-extractable components and the genotoxicity observed on NHLF cells after the exposure to, respectively, the hydrophilic fractions or the lipophilic ones were both investigated using a method of factorial analysis. Principal component analysis (PCA) is a mathematical technique adapted to quantitative variables that transforms n possibly correlated variables into a (smaller) number of uncorrelated variables referred to as principal component (Jolliffe, 2014; Reis et al., 2015). Analyzing the correlation of each original variable with the first (and more important) PCA components, it is possible to visualize the correlations between the n geochemical variables in simple bi-plots.

3. Results

3.1 $PM_{2.5}$ concentrations and chemical species

The $PM_{2.5}$ concentrations were quite similar in summer and winter for the three industrial sites (14 and 13 µg/m^3 in S1, 13 and 14 µg/m^3 in S2 and 15 and 12 µg/m^3 in S3, in summer and winter, respectively), while they doubled in winter for the traffic and urban sites (13 up to 28 µg/m^3 for both S4 and S5). From these data it was evident that in our study area, $PM_{2.5}$ concentrations exceeded WHO air quality $PM_{2.5}$ annual average, set at 10 µg/m^3, for summer and winter seasons. Moreover the traffic and urban sites in winter also exceeded the short-time exposure mean, set at 25 µg/m^3 (WHO Regional Office for Europe, 2006).

In the water-soluble extractions, concentrations of Na, Al, Ca, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Mo, and Pb were determined in each site for both seasons (Table 3).

Sites		Seasons	Inorganic elements ng/m^3													
			Na	Al	Ca	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Ni	Cu	Zn	Mo	Pb	∑ Metals
S1	Cement works	Summer	427.85	ND	625.32	ND	0.49	0.27	0.71	13.17	0.14	2.06	4.03	ND	2.19	1076.24
		Winter	391.13	ND	396.79	ND	0.17	0.45	3.63	33.44	0.99	0.82	ND	ND	2.10	829.53
S2	Alumina plant	Summer	448.07	110.13	960.93	1.08	0.38	1.13	0.86	85.84	1.27	1.65	10.45	ND	0.97	1622.76
		Winter	238.77	ND	358.15	1.58	0.36	0.36	0.42	ND	0.34	7.14	ND	0.16	1.71	608.96
S3	Coal-fired power station	Summer	562.16	1.62	1243.24	2.70	0.38	0.81	1.51	67.03	0.84	2.78	14.51	ND	1.41	1899.00
		Winter	526.63	2.86	572.43	2.29	2.86	0.46	0.86	14.88	2.55	0.72	5.30	ND	6.53	1138.36
S4	Road traffic	Summer	609.14	6.71	1708.69	2.07	0.41	2.27	1.65	79.50	0.80	26.56	28.21	0.10	2.17	2468.28
		Winter	622.62	26.92	2125.90	2.81	0.17	0.95	2.47	138.55	0.37	46.36	36.88	0.28	2.81	3007.08
S5	Urban site	Summer	446.21	ND	1738.68	ND	0.15	0.82	1.39	56.42	1.15	7.05	36.34	ND	4.57	2292.78
		Winter	419.25	4.53	1025.45	ND	0.17	0.79	2.04	22.66	0.94	1.62	17.14	0.06	1.53	1496.17
Statistics		Mean	469.18	25.46	1075.56	2.09	0.56	0.83	1.55	56.83	0.94	9.67	19.11	0.15	2.60	
		SD	109.29	38.81	584.71	0.61	0.78	0.55	0.92	38.76	0.64	14.28	12.32	0.08	1.61	
		Median	447.14	5.62	993.19	2.18	0.37	0.80	1.45	56.42	0.89	2.42	15.83	0.13	2.13	
		Min	238.77	1.62	358.15	1.08	0.15	0.27	0.42	13.17	0.14	0.72	4.03	0.06	0.97	
		Max	622.62	110.13	2125.90	2.81	2.86	2.27	3.63	138.55	2.55	46.36	36.88	0.28	6.53	
Dergham et al., 2012 Industrial values		Mean	283	452	698	9.41	1.8	4.76	70.3	1.23	2.82	19.2	32.4	0.57	5.34	
Dergham et al., 2012 Urban values		Mean	358	140	439	7.24	1.05	3.85	18.02	415	1.89	8.65	17.5	0.66	3.72	
Salameh et al., 2015 Marseille, France		Mean			1092		6	2.1	11	265	4	17	24		8	
Liu et al., 2014	Hangzhou, China	Mean						6.4	38.2		3	71	1.3	7.2	0.6	

Table 3. Inorganic elements concentrations (ng/m^3) in the water-soluble fractions related to the five sampling sites in summer and winter, and comparison with other studies. Abbreviations: ND: not detected; ∑: total.

Among the 13 analyzed water-soluble compounds extracted from the five sites on both season, Na and Ca were the most abundant elements in all sites (447.14 ng/m^3 and 993.19 ng/m^3, respectively), followed by trace elements Fe, Al, Cu and Zn. Ti, V, Cr, Mn, Ni, Mo and Pb were the less abundant elements (mean concentrations ≤ 5 ng/m^3). The highest total concentration of inorganic elements was found in the road traffic site (3007.08 ng/m^3), and the lowest in the alumina plant site (608.96 ng/m^3), both in winter. Higher amounts of water-soluble inorganic species were found in $PM_{2.5}$ collected during summer for all sites (i.e. S2: 1622.76 ng/m^3 in summer and 608.96 ng/m^3 in winter), except for the road traffic site. The highest Al concentration (110.13 ng/m^3) was found for the alumina plant in summer. Notably, Na (238.77 – 622.62 ng/m^3), Al (1.62 – 110.13 ng/m^3), Ca (358.15 – 2125.90 ng/m^3), Fe (13.17 – 138.55 ng/m^3) and Cu (0.72 – 46.36 ng/m^3) showed a wide range of values, reflecting the heterogeneity of the water-soluble extracts among the five sites under investigation.

The OHM-BMP mean levels for Na (469.18 ng/m^3) and Ca (1075.56 ng/m^3) were higher than the ones reported for other industrial or urban sites in Dunkerque (Dergham et al., 2012), but similar with another study performed in Marseille (Salameh et al., 2015). Mean levels of Ti, V, Cr, Ni, Cu, Zn an Pb were similar to the majority of those reported in the literature (Dergham et al., 2012; Salameh et al., 2015), but lower than the ones from China (Liu et al., 2015).

The 16 PAHs recommended by US-EPA were quantified in the organic-extractable fractions (Table 4), and among these naphthalene, benz[a]anthracene, chrysene, benzo[b+k]fluoranthene, benzo[a]pyrene, indeno[1,2,3-c,d]pyrene, dibenz[a,h]anthracene and benzo[g,h,i]perylene are carcinogenics, probably or possibly carcinogenic to humans (Gutiérrez-Castillo et al., 2005), and counted for 31% - 69% of the total PAHs concentrations.

Among the 16 PAHs analyzed, benzo[b+k]fluoranthene was the most abundant PAH in all sites in winter and in three sites (S1, S2 and S5) in summer. The total PAHs (∑PAHs) concentrations ranged from 0.099 ng/m^3 to 0.492 ng/m^3, these concentrations were comparable to the average value 0.217 ng/m^3 reported for Beirut (Borgie et al., 2015). Higher levels of total PAHs were observed in winter compared to summer, and this observation was noted for all sites, except for the coal-fired power station, which presented similar concentrations in both seasons. The two largest seasonal effects were observed in the alumina plant and road traffic sites, with a 2.8 and 2.7-fold increase during winter compared to summer, respectively; for the other sites the differences were less pronounced, with 1.1 to 1.5 fold-increase.

	Sites	S1		S2		S3		S4		S5	
		Cement works		Alumina plant		Coal-fired power station		Road traffic		Urban site	
	Season	Summer	Winter	Summer	Winter	Summer	Winter	Summer	Winter	Summer	Winter
PAHs (ng/m^3)	**Naphthalene (2B)**	ND	ND	ND	ND	0.002	0.001	ND	ND	0.008	ND
	Acenaphtylene (3)	ND	ND	ND	ND	0.003	ND	ND	ND	ND	ND
	Acenaphtene (3)	ND	ND	ND	ND	0.001	0.002	ND	ND	0.002	ND
	Fluorene (3)	ND	ND	ND	ND	0.002	ND	ND	ND	0.002	ND
	Phenanthrene (3)	0.021	0.020	0.014	0.019	0.023	0.016	0.029	0.032	0.029	0.018
	Anthracene (3)	0.004	0.003	0.001	0.003	0.002	0.001	0.003	0.002	0.004	0.002
	Fluoranthene (3)	0.024	0.023	0.011	0.025	0.021	0.011	0.035	0.050	0.027	0.036
	Pyrene (3)	0.021	0.025	0.012	0.027	0.018	0.010	0.031	0.059	0.025	0.043
	Benz[a]anthracene (2B)	0.011	0.011	0.005	0.014	0.005	0.004	0.008	0.034	0.014	0.028
	Chrysene (2B)	0.027	0.035	0.014	0.022	0.013	0.019	0.025	0.093	0.030	0.079
	Benzo[b+k]fluoranthene (2B)	0.063	0.098	0.027	0.098	0.015	0.040	0.032	0.156	0.104	0.164
	Benzo[a]pyrene (1)	0.018	0.018	0.004	0.014	0.03	0.004	0.005	0.029	0.019	0.043
	Indeno[1,2,3-c,d]pyrene (2B)	0.023	0.029	0.004	0.027	0.002	0.006	0.005	0.020	0.033	0.030
	Dibenz[a,h]anthracene (2A)	0.004	0.004	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.004	0.008
	Benzo[g,h,i]perylene (2B)	0.019	0.034	0.006	0.027	0.002	0.006	0.006	0.020	0.032	0.037
	∑ PAHs	0.234	0.301	0.099	0.277	0.114	0.120	0.180	0.492	0.332	0.487

Table 4. PAHs concentrations (ng/m^3) in the organic-extractable fractions related to the five sites in summer and winter.

Abbreviations: ND: not detected; ∑: total in; (1) carcinogenic to humans; (2A) probably carcinogenic to humans; (2B) possibly carcinogenic to humans; (3) not classifiable as to its carcinogenicity to humans (IARC classification).

3.2 In vitro cytotoxicity assessed by XTT

The *in vitro* cytotoxicity of hydrophilic and lipophilic $PM_{2.5}$ extracts was assessed by performing a XTT assay on NHLF cells in order to define the range of concentration to be tested in the cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay in combination with centromere labeling (Figure 2). Hydrophilic and lipophilic extracts from the five studied sites were tested and the data were pooled to generate a single graph per extract.

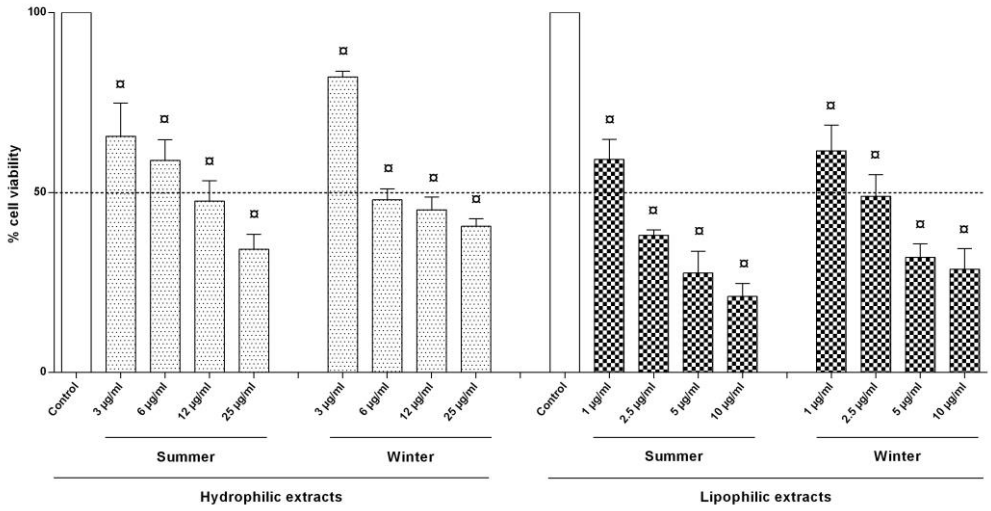


Figure 2. Viability of NHLF cells exposed for 24 h to hydrophilic and lipophilic extracts.

Mean ± SD % cell viability of three independent experiments were determined. Statistical analysis versus the negative control was performed by one-way ANOVA: ¤ $p < 0.05$.

As shown in Figure 2, both hydrophilic and lipophilic extracts exerted a concentration related decrease in NHLF cells viability. Further, SD values showed that the cytotoxicity was similar among the 5 sites. Less than 50% of survival cells were observed after 24 h exposure to hydrophilic extracts at concentrations greater than 6 µg/ml in summer and 3 µg/ml in winter. After 24 h exposure to lipophilic extracts, less than 50% of survival cells were noted at concentrations greater than 1 µg/ml in both seasons.

XTT was performed to define the working extracts concentrations to use for the genotoxicity study (CBMN assay). To avoid any DNA or chromosome damage indirectly induced by a cytotoxic effect, the highest working concentrations was fixed at 3 µg/ml for hydrophilic extracts and at 1 µg/ml for the lipophilic ones, in accordance with the highest recommended concentration to be tested in case of cytotoxicity in the OECD guideline 487 (55 ± 5 %) (OECD, 2014).

3.3 In vitro genotoxicity assessed by cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay in combination with centromere labeling

DNA integrity was evaluated at chromosomal level by CBMN assay in combination with centromere labeling (Fig. 3), an *in vitro* test that determines the frequency of micronuclei (MN) formation in exposed NHLF cells and allows discrimination between direct and indirect chromosome damage. Further, as many organic-extractable components, including PAHs, need to be bioactivated to exert genotoxic properties, cells were exposed to lipophilic extracts in absence and in presence of metabolic activation.

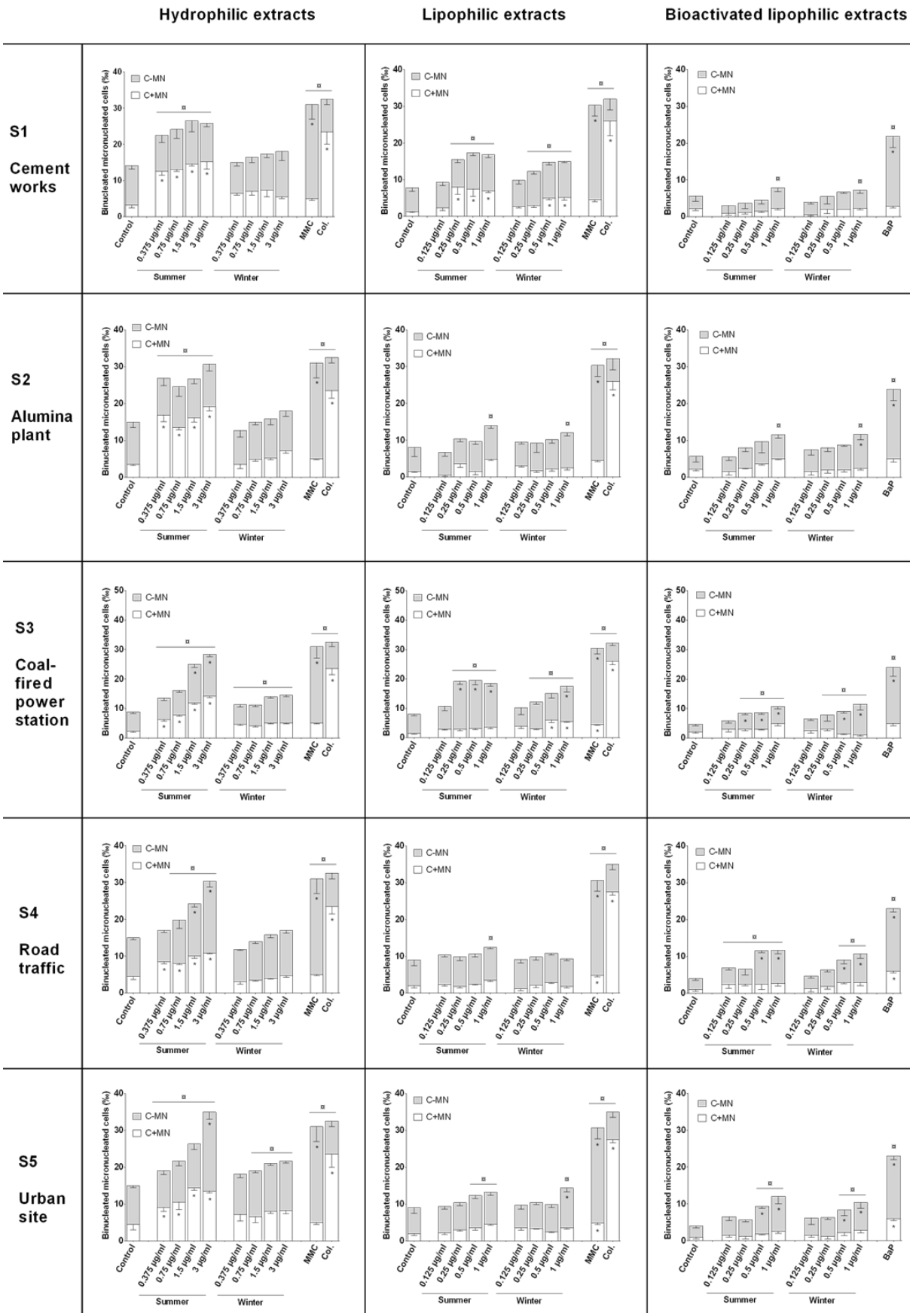


Figure 3. Chromosome losses and breakages evidenced with CBMN assay associated with centromere labeling in NHLF cells exposed for 24 h to hydrophilic and lipophilic (with and without metabolic activation) extracts.

Frequency of binucleated micronucleated cells (‰), C-MN and C+MN mean ± SD of three independent experiments were determined. Statistical analysis versus the negative control was performed by one-way ANOVA: ¤ $p < 0.05$ for BNMN and by two-way ANOVA: * $p < 0.05$ for C-MN and C+MN.

The hydrophilic extracts obtained from $PM_{2.5}$ at sites 1, 2, 3 and 5 induced a significant formation of binucleated micronucleated cells (BNMN) at all tested concentrations (0.375, 0.75, 1.5 and 3 µg/ml) in summer. This was the same for site 3 in winter. . Differently, in winter no BNMN induction was observed for sites 1, 2 and 4. At 0.75, 1.5 and 3 µg/ml, the hydrophilic extracts induced BNMN formation in summer for site 4 and in winter for site 5.

The lipophilic extracts without metabolic activation obtained from sites 1 and 3 induced a significant BNMN formation at 0.25, 0.5 and 1 µg/ml in both seasons. On sites 2 and 4 we detected, at 1 µg/ml, a statistically significant BNMN induction compared to the negative control in summer, while in winter no BNMN induction was observed for site 4 only. Site 5 showed BNMN induction at 0.5 and 1 µg/ml in summer, while only at the highest concentration (1 µg/ml) in winter.

Using a metabolic activation, the lipophilic extracts obtained from sites 1 and 2 induced BNMN only at the highest tested concentration (1 µg/ml) in both seasons. On site 3, significant BNMN increases were detected at 0.25, 0.5 and 1 µg/ml for both seasons, while this induction was noted at 0.5 and 1 µg/ml for site 5. Site 4 showed BNMN induction at all tested concentrations in summer, while only at the two highest concentrations (0.5 and 1 µg/ml) in winter.

We further analyzed whether hydrophilic and lipophilic extracts induced the formation of centromere positive (C+MN) or centromere negative (C-MN) micronuclei in NHLF cells.

Results shows that all the hydrophilic extracts obtained in summer induced C+MN formation in binucleated NHLF cells after 24 h exposure, indicating an induction of aneugenic events such as chromosome migration abnormalities leading to chromosome losses for all tested concentrations, while no induction was noted in winter. Without metabolic activation, the lipophilic extracts obtained in summer from site 1 caused aneugenic events at 0.25, 0.5 and 1 µg/ml. At 0.5 and 1 µg/ml, extracts from sites 1 and 3 induced C+MN formation in winter. In presence of metabolic activation, the lipophilic extracts obtained from all sites did not induce aneugenic events.

Hydrophilic extracts obtained from $PM_{2.5}$ at sites 3 and 4 induced C-MN formation in binucleated NHLF cells after 24 h exposure, indicating that clastogenic events (chromosome breakage resulting from a partial chromosome loss) occurred at 1.5 and 3 µg/ml in summer, while this induction was noted for site 5 only at 3 µg/ml. In absence of metabolic activation, the lipophilic extracts obtained from site 3 induced C-MN formation at 0.25, 0.5 and 1 µg/ml in summer and at 1 µg/ml in winter. We also detected clastogenic events at the highest concentration (1 µg/ml) in winter for site 5.

In presence of metabolic activation, C-MN formations were noted at 0.5 and 1 µg/ml for the lipophilic extracts obtained from sites 4 and 5 in both season, and in winter for site 3. Clastogenic events were observed at 0.25, 0.5 and 1 µg/ml on site 3 in summer and at only at the highest tested concentration (1 µg/ml) on site 2 in winter.

The inductions of BNMN by hydrophilic extracts were higher than those induced by lipophilic extracts. These enhanced increases in BNMN were mainly consecutive to the aneugenic effects (C+MN) of hydrophilic extracts in summer. For the lipophilic extracts (with or without metabolic activation), most of the significant induction of BNMN was due to chromosome breakage (C-MN), whatever the season was. Moreover, independently from the hydrophilic / lipophilic extractions, sites 3, 4 and 5 were more efficient to induce chromosome breakages compared to sites 1 and 2. In these two latest sites, chromosome losses effects were predominant mostly in summer.

3.4 Correlation between chemical composition of $PM_{2.5}$ and in vitro genotoxicity

Principal components analysis (PCA) was performed to unravel possible relationships between soluble components extracted from $PM_{2.5}$ and their genotoxicity, in terms of chromosome damage (Figures 4). The data matrix used to carry out the PCA was composed by either the 13 inorganic elements (Fig. 4(a)) or the 16 PAHs (Fig. 4(b) and 4(c)). C+MN, C-MN and BNMN induced by hydrophilic extracts, lipophilic extracts without metabolic activation, and lipophilic extracts with metabolic activation, were projected as supplementary variables on figures 4(a), 4(b) and 4(c), respectively.

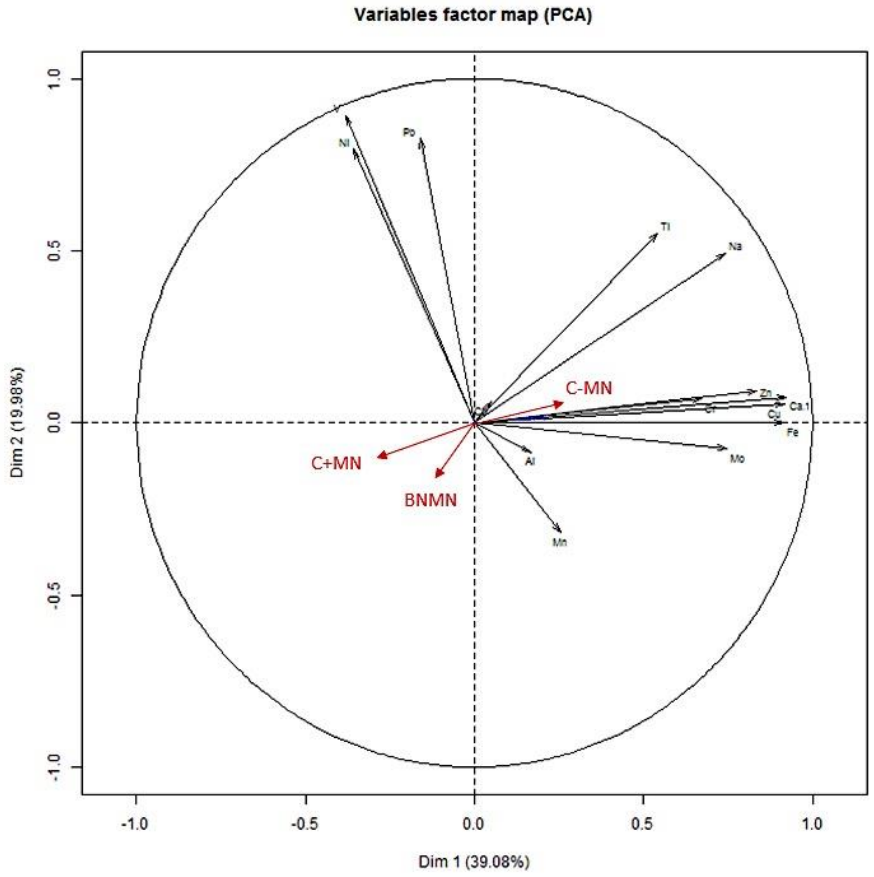


Figure 4(a). Projections of the individuals (PM2.5 samples) in the first factorial plane (Dim1/Dim2) of PCA analysis carried out for the 13 inorganic elements extracted from the five sites with C+MN, C-MN and BNMN induced by hydrophilic extracts.

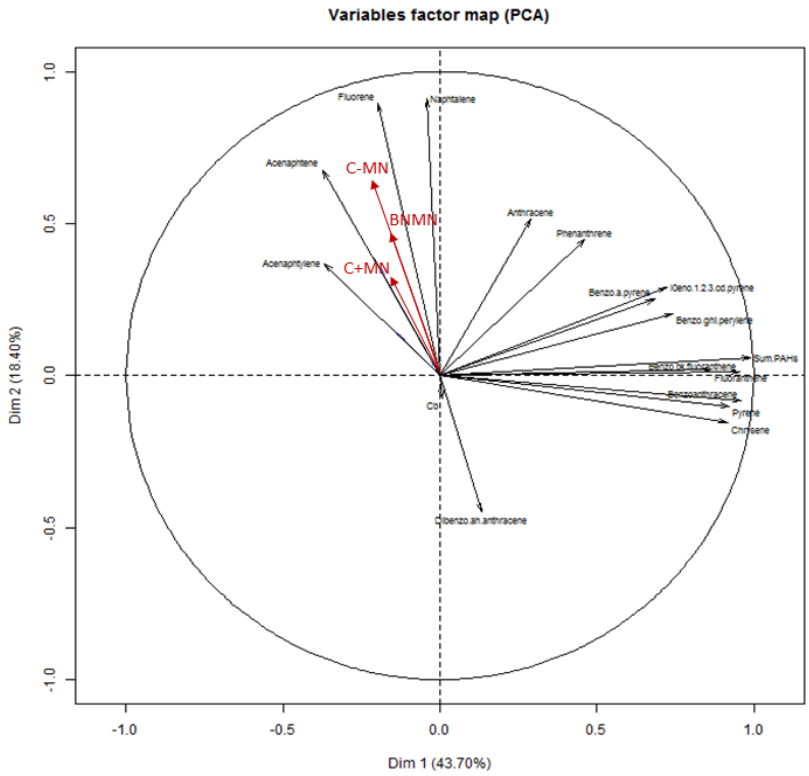


Figure 4(b). Projections of the individuals (PM2.5 samples) in the first factorial plane (Dim1/Dim2) of PCA analysis carried out for the 16 organic elements extracted from the five sites with C+MN, C-MN and BNMN induced by lipophilic extracts without metabolic activation.

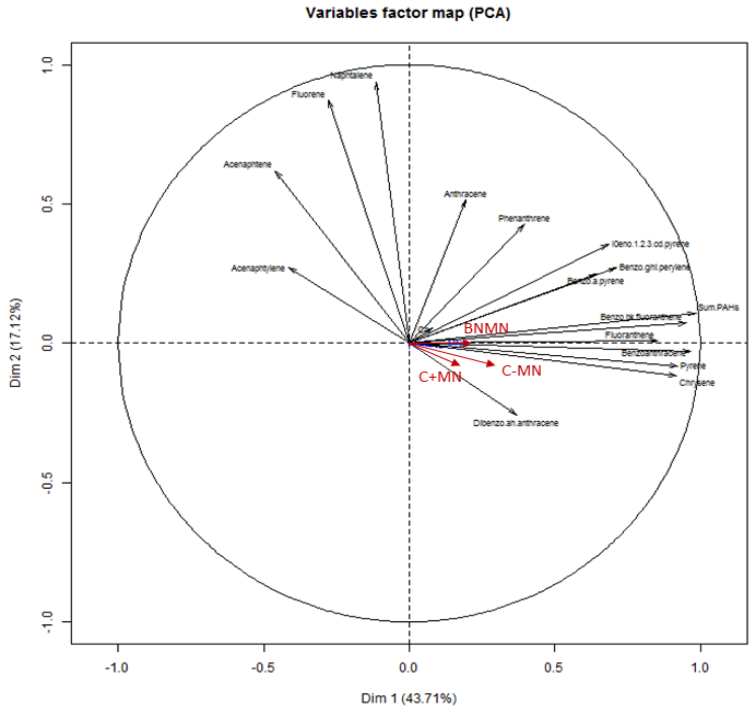


Figure 4(c). Projections of the individuals (PM2.5 samples) in the first factorial plane (Dim1/Dim2) of PCA analysis carried out for the 16 organic elements extracted from the five sites with C+MN, C-MN and BNMN induced by lipophilic extracts with metabolic activation.

First of all, the results showed that the chromosome breakage (C-MN) induced by hydrophilic extracts were associated to an inorganic elements cluster composed by Ca, Cu, Cr and Zn (Fig.4 (a)). Then, the results showed that the global chromosome damage (BNMN, C+MN and C-MN) induced by lipophilic extracts without metabolic activation were associated to an organic elements cluster composed by acenaphtene / fluorene, and acenapthylene / napthalene to a certain extent (Fig.4 (b)). Finally, the results showed that chromosome damage (BNMN) induced by lipophilic extracts with metabolic activation were associated to an organic elements cluster composed by fluoranthene and benzo(ah)anthracene, while the chromosome losses and breakages (C+MN and C-MN) seemed to be influenced by dibenzo(ah)anthracene, chrysene and pyrene (Fig.4 (c)).

Spearman's correlation coefficients (*r*) were calculated between chromosome damage (C+MN, C-MN and BNMN) induced by the three extracts (hydrophilic, lipophilic with and without metabolic activation) and the soluble components determined in these extracts to better support the interpretation of PCA results (Supplementary data - Tables 1).

Ca and Zn were significantly ($p < 0.05$) correlated with C-MN ($r = 0.39$ for both), which indicated an ability to induce chromosome breakages in hydrophilic extractions (C-MN). Mn and Mo were significantly ($p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively) negatively correlated ($r = -0.48$ and $r = -0.59$, respectively) with chromosome losses. Further, a negative significant ($p < 0.01$) correlation ($r = -0.42$) was evidence between Mo and chromosome damage (BNMN).

Acenaphtylene was significantly ($p < 0.05$) correlated with a global induction of chromosome damage ($r = 0.39$, $r = 0.33$ and $r = 0.32$ for BNMN, C+MN and C-MN, respectively) in lipophilic extracts without metabolic activation; and naphthalene was significantly ($p < 0.05$) correlated with BNMN and C-MN ($r = 0.31$ and $r = 0.31$, respectively). Benzo(a)pyrene showed significant ($p < 0.05$) correlations with C-MN ($r = 0.40$) in lipophilic extracts with metabolic activation, suggesting that this PAH influenced chromosome breakages (C-MN), while anthracene showed significant ($p < 0.05$) negative correlation ($r = -0.36$) suggesting a protection of NHLF cells against C-MN formation.

The joint interpretation of the results produced by the statistical tools and the geometrical ones allowed further detailing the effects detected in NHLF cells exposed to the hydrophilic and lipophilic (with and without metabolic activation) extracts. We observed strong correlations between these two methods for the hydrophilic and lipophilic extracts without metabolic activation. Thus we have shown relationships between soluble components and chromosome damage: (1) Ca and Zn positively influenced C-MN induction in hydrophilic extracts, while Mo and Mn were negatively correlated with chromosome damage (BNMN / C+MN, and C+MN induction, respectively); (2) naphthalene and acenaphtylene were positively correlated with chromosome damage in lipophilic extracts without metabolic activation (BNMN / C-MN, and BNMN / C-MN/ C+MN, respectively); (3) when considering the lipophilic extracts with metabolic activation, benzo(a)pyrene positively influenced chromosome breakage. Benzo(a)pyrene clastogenicity is well documented in the literature (group 1 in IARC classification) and used as positive control to determine gene and chromosome mutations in various *in vivo* or *in vitro* genotoxic assays. Spearman's correlations showed a positive correlation between acenaphtylene and C-MN in the lipophilic extracts with metabolic activation, while they are opposed in the PCA graph. Thus we don't consider this relationship. A significant ($p < 0.05$) negative correlation ($r = -0.36$) was found between anthracene and C-MN.

4. Discussion

Air pollution and $PM_{2.5}$ were recently classified as carcinogenic to humans (group 1) by the IARC (IARC (International Agency for Research on Cancer), 2013), bringing them on central concern. Particulate matter, a major component of outdoor air pollution, was evaluated separately and was also classified as carcinogenic to humans (Group 1) (IARC (International Agency for Research on Cancer), 2013). Besides the $PM_{2.5}$ atmospheric levels and the duration of exposure, the chemical compositions of the $PM_{2.5}$ influence their potentials to induce adverse effects including cancer. The process of carcinogenesis is initiated by mutagenic and epigenetic events. DNA and/or chromosome damaging agents could indeed induced inheritable mutations that ultimately cause cancer and other genetic disorders. Therefore, our work aimed to characterize the chemical composition of water- and organic-extractable fractions of the $PM_{2.5}$ emitted by mineral industries, road traffic and urban sources and to determine the relationships between the chemical composition and the genotoxic activity. We discriminated aneugenic and clastogenic effects of hydrophilic and lipophilic (with and without metabolic activation) extracts from five $PM_{2.5}$ samples collected in the PACA region known for its annual $PM_{2.5}$ levels exceedances. The mechanisms involved in chromosome losses and breakage are truly different. In the first case, the molecular targets of aneugens are mostly proteins involved during the mitosis. In the second case, the molecular target of the clastogens is the DNA, with the induction of double strand breaks before or during the DNA repair processes (Fukasawa, 2005; Iarmarcovai et al., 2006; Saunders et al., 2000).
$PM_{2.5}$ concentrations ranged from 12 to 15 µg/m^3 for all sites in summer and for cement works, alumina plant and coal-fired power station sites in winter, while $PM_{2.5}$ levels increased up to 28 µg/m^3 for the road traffic and urban sites in winter. The combination of wood heating systems and green waste burning by the population surrounding in winter probably accounted for these two highest $PM_{2.5}$ concentrations (AirPaca, 2012). In the PACA region, winter is particularly favorable to the increase of $PM_{2.5}$ levels due to anthropogenic emissions as well as meteorological conditions favorable to the accumulation of pollutants (AirPaca, 2012). WHO air quality $PM_{2.5}$ annual average set at 10 µg/m^3 was greatly exceeded in BMP area, even if the $PM_{2.5}$ levels measured in our study were lower than those reported for capitals affected by traffic (23 - 26 µg/m^3) or for a mining area in South Africa (20 µg/m^3) (Borgie et al., 2015; Kaonga and Kgabi, 2010; Szigeti et al., 2013).

On the water-soluble phase, 13 inorganic elements (minerals and metals) were analyzed and variable quantities of elements were detected at the five sites. Among the minerals and metals present within the five samples, Na and Ca were the most abundant compounds; the highest concentrations in inorganic elements were detected in the road traffic site regardless of the seasons. Higher water-soluble compounds concentrations were noted in summer for all sites, except for the road traffic where the concentrations were similar. The average minerals and metals concentrations were relatively low when compared to those reported in the literature for urban environment (Gutiérrez-Castillo et al., 2006; Pakkanen et al., 2001).

The organic-extractable fraction from the $PM_{2.5}$ allowed us to measure the total PAHs levels that ranged from 0.099 to 0.332 ng/m^3 in summer and from 0.180 to 0.492 ng/m^3 in winter. These concentrations were far lower than those reported for urban (i.e. 8.8 ng/m^3 in summer and 12.3 ng/m^3 in winter in Mexico ((Gutiérrez-Castillo et al., 2006)); 337 ng/m^3 in Guangzhou (Li et al., 2006)) and industrial sites (i.e. 0.407 ng/m^3 in summer and 2.167 ng/m^3 in winter (Teixeira et al., 2013)). Among the 16 PAHs analyzed, 8 belonged to groups 1 and 2 of the IARC, and they could be partially responsible of the genotoxicity observed in lipophilic extracts. In accordance

to the literature, highest PAHs levels were observed in winter (Lepers et al., 2014; Li et al., 2006; Teixeira et al., 2013). These variations could be partly due to the atmospheric conditions such as low temperatures, lower intensity of solar radiation, and decreased PAHs photo-degradation that favor the increase of PAHs concentrations in $PM_{2.5}$ (Teixeira et al., 2013). The two sites (S4 and S5) with the smoked filters showed the highest PAHs concentrations, certainly due to wood combustion from residential heating and green waste burning, that represents 57% of PAHs emissions winter in PACA region (AirPaca, 2012).

In our study, we observed that the highest total inorganic elements concentrations in $PM_{2.5}$ extracts were observed in summer, except for the road traffic site. For each site, $PM_{2.5}$ were generated by various emission sources and this should account for the high heterogeneity of each inorganic element. For example, the highest copper concentrations noted in the road traffic site in both seasons can be related to dusts generated by the wear of tires and breaks (Borgie et al., 2015; Sharma et al., 2007). Regarding Al, the highest level was noted in summer in the alumina plant site, and Al was not detected in winter in this site. The mass fraction of Al, also quantified in PM_{10} and soil particles (< 100 µm) during the study, was higher in both seasons in the alumina plant site compared to the other sites in soil particles only (data not shown), suggesting that Al mass fraction increased with the particles size. Moreover, speciation of each element could also contribute to the observed heterogeneity. For example, the presence of a Zn phase more soluble in the road traffic and urban sites than in the three other sites (i.e. $ZnCl_2$ compared to Zn oxides) could explain, at least partly, the highest concentrations of Zn in these two sites.

The chromosome damaging properties of the hydrophilic and lipophilic (with and without metabolic activation) extracts from $PM_{2.5}$ samples collected in three industrial, one traffic and one urban sites in the BMP region were evaluated in NHLF cells by CBMN assay with micronucleus labeling. Data obtained in this study showed that the extracts were able to induce significant increase in chromosome damage by the formation of BNMN cells either by chromosome breakage (clastogenesis) or chromosome loss (aneugenesis). Although hydrophilic extracts induced higher BNMN compared to lipophilic ones (with or without metabolic activation), inorganic elements should not be considered as stronger genotoxicants than organic ones. Indeed, chromosome damage induced by hydrophilic extracts were mostly chromosome losses whereas lipophilic extracts mostly induced chromosome breakage. In addition, concentrations analyzed were higher for the hydrophilic extracts (up to 3 µg/ml) compared to lipophilic ones (up to 1 µg/ml).

Aneugenic effects were more frequently observed with the hydrophilic extracts in summer. They could occurred through a variety of cellular targets, including alteration of protein structures involved in cell division and migration of chromosomes centrosome, spindle, kinetochore, and cell membrane (Mateuca et al., 2006). None of the quantified inorganic elements were positively correlated with chromosome losses (C+MN) by using PCA and Spearman's correlations. We would mention first, the seasonal effect was not assessed by this combination of statistical analyses, second, although 13 inorganic elements were quantified in water-soluble fractions, induction of C+MN could be due to others chemicals. In addition, a chromosome damaging effect of a chemical was considered significant when both a positively significant Spearman's coefficient and a PCA association were noted. Ca and Zn appeared positively correlated with chromosome breakages (C- MN). It has been reported that, Zn act as a protector of genome stability at low concentrations, and induced weak clastogenic effects at high

concentrations (Roney et al., 2006). Moreover, Zn has shown few associations with health endpoints, in relation to cardiovascular endpoints as well as respiratory outcomes (Rohr and Wyzga, 2012).

The lipophilic extracts with or without metabolic activation induced mainly clastogenic events. Acenapthylene and naphthalene were significantly correlated with the induction of chromosome breakage for lipophilic extracts in absence of metabolic activation, while benzo[a]pyrene was correlated to clastogenic events in presence of metabolic activation. Benzo[a]pyrene, known to act after metabolic activation, was classified by IARC as carcinogenic to human (Gutiérrez-Castillo et al., 2006; IARC (International Agency for Research on Cancer), 2013). Surprisingly, some inorganic elements and PAHs showed negative associations with chromosome damage. However, components of the complex chemical composition of the $PM_{2.5}$ may interact with each other to produce antagonist, synergistic or additive effects (Gutiérrez-Castillo et al., 2006).

PCA and Spearman's correlations showed the influence of each component independently but not in combination, thus some inorganic elements (i.e. V, Pb, and Cr) or PAHs known for their genotoxic properties maybe acting in association were not revealed by our statistical tests. Moreover, the genotoxicity exerted by the lipophilic extracts could also be due to nitro- and oxi-PAHs that were not quantified in this study, but still present in the extracts (Lepers et al., 2014).

Regardless the chemical composition of the extracts, sites 3, 4 and 5 were more efficient to induce chromosome breakages compared to sites 1 and 2, where in contrast the chromosome losses were predominant. Clastogenic compounds interact with chromosome and lead to DNA double-strand breaks that are clearly associated with increased risk of carcinogenesis. Additionally, as no threshold can be established for direct DNA and/or chromosome damaging agents, preventive strategies and further investigations (i.e. inflammation, oxidative stress, epigenetic effects…) should be considered in such situations. Beyond mineral industries, human activities, mainly related to combustion (i.e. road traffic, waste burning, heating) appeared to be responsible of genotoxic properties highlighted in the BMP area.

For future research it would be interesting to investigate the whole particles, without extraction to highlight synergistic, additive or antagonistic effects of the particles components. Also, concerning the chemical characterization, nitro and oxidized PAHs concentrations should be determined as well as metals speciation's to obtain a finer characterization and maybe strong correlation between chemical composition and genotoxic potencies useful to define the sources of particulate emissions to be reduce in priority to decrease health risks.

Acknowledgements

This work was supported by the Call for Research Project 2009 "Health-Environment-Work" common program from the Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (AFSSET) and the Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME) under Grant [0974C0260]. Funding for this research were also provided by the Labex DRIIHM, Réseau des Observatoires Hommes – Milieux – Centre National de la Recherche Scientifique (ROHM–CNRS), ECCOREV, and companies Ciments Lafarge, Rio Tinto Alcan and SNET, and the agglomeration of Aix Community.

The authors would like to thank Grégory Gille, Patricia and Daniel Lozano, Jérémie Soubise and Claire Blouvac for them help in carrying out samples. The authors also want to express their gratitude to Kankoé Sallah for his statistical analysis performed, as well as Chiara Uboldi for her precious help to write this article.

References

AirPaca, 2012. Impact brûlage qualité de l'air.

Benameur, L., Orsière, T., Rose, J., Botta, A., 2011. Detection of environmental clastogens and aneugens in human fibroblasts by cytokinesis-blocked micronucleus assay associated with immunofluorescent staining of CENP-A in micronuclei. Chemosphere 84, 676–680. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.03.027

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

Brüggemann, E., Gerwig, H., Gnauk, T., Müller, K., Herrmann, H., 2009. Influence of seasons, air mass origin and day of the week on size-segregated chemical composition of aerosol particles at a kerbside. Atmospheric Environment 43, 2456–2463. doi:10.1016/j.atmosenv.2009.01.054

Dergham, M., Lepers, C., Verdin, A., Billet, S., Cazier, F., Courcot, D., Shirali, P., Garçon, G., 2012. Prooxidant and Proinflammatory Potency of Air Pollution Particulate Matter (PM2.5–0.3) Produced in Rural, Urban, or Industrial Surroundings in Human Bronchial Epithelial Cells (BEAS-2B). Chem. Res. Toxicol. 25, 904–919. doi:10.1021/tx200529v

DREAL, Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement, 2010. Pollution aux particules fines : Eléments de stratégie pour une politique de réduction ambitieuse en PACA.

Fenech, M., 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. Nat. Protocols 2, 1084–1104. doi:10.1038/nprot.2007.77

Fukasawa, K., 2005. Centrosome amplification, chromosome instability and cancer development. Cancer Lett. 230, 6–19. doi:10.1016/j.canlet.2004.12.028

González, N.V., Nikoloff, N., Soloneski, S., Larramendy, M.L., 2011. A combination of the cytokinesis-block micronucleus cytome assay and centromeric identification for evaluation of the genotoxicity of dicamba. Toxicology Letters 207, 204–212. doi:10.1016/j.toxlet.2011.09.013

Gutiérrez-Castillo, M.E., Olivos-Ortiz, M., De Vizcaya-Ruiz, A., Cebrián, M.E., 2005. Chemical characterization of extractable water soluble matter associated with PM10 from Mexico City during 2000. Chemosphere 61, 701–710. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.03.063

Gutiérrez-Castillo, M.E., Roubicek, D.A., Cebrián-García, M.E., De Vizcaya-Ruíz, A., Sordo-Cedeño, M., Ostrosky-Wegman, P., 2006. Effect of chemical composition on the induction of DNA damage by urban airborne particulate matter. Environ. Mol. Mutagen. 47, 199–211. doi:10.1002/em.20186

IARC (International Agency for Research on Cancer), 2013. IARC: Outdoor air pollution a leading environmental cause of cancer deaths. Press Release N°221.

Iarmarcovai, G., Botta, A., Orsière, T., 2006. Number of centromeric signals in micronuclei and mechanisms of aneuploidy. Toxicology Letters 166, 1–10. doi:10.1016/j.toxlet.2006.05.015

Jolliffe, I., 2014. Principal Component Analysis, in: Wiley StatsRef: Statistics Reference Online. John Wiley & Sons, Ltd.

Kang, Y., Cheung, K.C., Wong, M.H., 2011. Mutagenicity, genotoxicity and carcinogenic risk assessment of

indoor dust from three major cities around the Pearl River Delta. Environment International 37, 637–643. doi:10.1016/j.envint.2011.01.001

Kaonga, B., Kgabi, N.A., 2010. Investigation into presence of atmospheric particulate matter in Marikana, mining area in Rustenburg Town, South Africa. Environ Monit Assess 178, 213–220. doi:10.1007/s10661-010-1683-1

Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surrallés, J., Vanhauwaert, A., Wakata, A., 2003. Report from the in vitro micronucleus assay working group. Mutat. Res. 540, 153–163.

Lepers, C., Dergham, M., Armand, L., Billet, S., Verdin, A., Andre, V., Pottier, D., Courcot, D., Shirali, P., Sichel, F., 2014. Mutagenicity and clastogenicity of native airborne particulate matter samples collected under industrial, urban or rural influence. Toxicology in Vitro 28, 866–874. doi:10.1016/j.tiv.2014.03.011

Líbalová, H., Krčková, S., Uhlířová, K., Milcová, A., Schmuczerová, J., Ciganek, M., Kléma, J., Machala, M., Šrám, R.J., Topinka, J., 2014. Genotoxicity but not the AhR-mediated activity of PAHs is inhibited by other components of complex mixtures of ambient air pollutants. Toxicology Letters 225, 350–357. doi:10.1016/j.toxlet.2014.01.028

Li, J., Zhang, G., Li, X.D., Qi, S.H., Liu, G.Q., Peng, X.Z., 2006. Source seasonality of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in a subtropical city, Guangzhou, South China. Science of The Total Environment 355, 145–155. doi:10.1016/j.scitotenv.2005.02.042

Liu, G., Li, J., Wu, D., Xu, H., 2015. Chemical composition and source apportionment of the ambient PM2.5 in Hangzhou, China. Particuology 18, 135–143. doi:10.1016/j.partic.2014.03.011

Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P.V., Decordier, I., Kirsch-Volders, M., 2006. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. Biochimie, Facets of Environmental Nuclear Toxicology 88, 1515–1531. doi:10.1016/j.biochi.2006.07.004

Natarajan, A.T., Boei, J.J., Darroudi, F., Van Diemen, P.C., Dulout, F., Hande, M.P., Ramalho, A.T., 1996. Current cytogenetic methods for detecting exposure and effects of mutagens and carcinogens. Environ Health Perspect 104, 445–448.

OECD, 2014. Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

Oh, S.M., Kim, H.R., Park, Y.J., Lee, S.Y., Chung, K.H., 2011. Organic extracts of urban air pollution particulate matter (PM2.5)-induced genotoxicity and oxidative stress in human lung bronchial epithelial cells (BEAS-2B cells). Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 5th IWGT Meeting Report, August 17-19th, 2009, Basel, Switzerland 723, 142–151. doi:10.1016/j.mrgentox.2011.04.003

Pakkanen, T.A., Loukkola, K., Korhonen, C.H., Aurela, M., Mäkelä, T., Hillamo, R.E., Aarnio, P., Koskentalo, T., Kousa, A., Maenhaut, W., 2001. Sources and chemical composition of atmospheric fine and coarse particles in the Helsinki area. Atmospheric Environment 35, 5381–5391. doi:10.1016/S1352-2310(01)00307-7

Pope III C, Burnett RT, Thun MJ, et al, 2002. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. JAMA 287, 1132–1141. doi:10.1001/jama.287.9.1132

Reis, A.P., Costa, S., Santos, I., Patinha, C., Noack, Y., Wragg, J., Cave, M., Sousa, A.J., 2015. Investigating relationships between biomarkers of exposure and environmental copper and manganese levels in house dusts from a Portuguese industrial city. Environ Geochem Health 1–20. doi:10.1007/s10653-015-9724-x

Reis, A.P., Patinha, C., Noack, Y., Robert, S., Dias, A.C., 2014. Assessing human exposure to aluminium, chromium and vanadium through outdoor dust ingestion in the Bassin Minier de Provence, France. Environ. Geochem. Health 36, 303–317. doi:10.1007/s10653-013-9564-5

Rohr, A.C., Wyzga, R.E., 2012. Attributing health effects to individual particulate matter constituents.

Atmospheric Environment 62, 130–152. doi:10.1016/j.atmosenv.2012.07.036

Roney, N., Osierb, M., Paikoff, S.J., Smith, C.V., Williamsa, M., de Rosa, C.T., 2006. ATSDR evaluation of the health effects of zinc and relevance to public health. Toxicology & Industrial Health 22, 423–493.

Salameh, D., Detournay, A., Pey, J., Pérez, N., Liguori, F., Saraga, D., Bove, M.C., Brotto, P., Cassola, F., Massabò, D., Latella, A., Pillon, S., Formenton, G., Patti, S., Armengaud, A., Piga, D., Jaffrezo, J.L., Bartzis, J., Tolis, E., Prati, P., Querol, X., Wortham, H., Marchand, N., 2015. PM2.5 chemical composition in five European Mediterranean cities: A 1-year study. Atmospheric Research 155, 102–117. doi:10.1016/j.atmosres.2014.12.001

Saunders, W.S., Shuster, M., Huang, X., Gharaibeh, B., Enyenihi, A.H., Petersen, I., Gollin, S.M., 2000. Chromosomal instability and cytoskeletal defects in oral cancer cells. Proc Natl Acad Sci U S A 97, 303–308.

Sharma, A.K., Jensen, K.A., Rank, J., White, P.A., Lundstedt, S., Gagne, R., Jacobsen, N.R., Kristiansen, J., Vogel, U., Wallin, H., 2007. Genotoxicity, inflammation and physico-chemical properties of fine particle samples from an incineration energy plant and urban air. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 633, 95–111. doi:10.1016/j.mrgentox.2007.05.013

Szigeti, T., Mihucz, V.G., Óvári, M., Baysal, A., Atılgan, S., Akman, S., Záray, G., 2013. Chemical characterization of PM2.5 fractions of urban aerosol collected in Budapest and Istanbul. Microchemical Journal, XIV Hungarian - Italian Symposium on Spectrochemistry: Analytical Techniques and Preservation of Natural Resources, Sumeg (Hungary), October 5-7, 2011 107, 86–94. doi:10.1016/j.microc.2012.05.029

Teixeira, E.C., Mattiuzi, C.D.P., Agudelo-Castañeda, D.M., Garcia, K. de O., Wiegand, F., 2013. Polycyclic aromatic hydrocarbons study in atmospheric fine and coarse particles using diagnostic ratios and receptor model in urban/industrial region. Environmental Monitoring And Assessment 185, 9587–9602. doi:10.1007/s10661-013-3276-2

Valavanidis, A., Fiotakis, K., Vlachogianni, T., 2008. Airborne particulate matter and human health: toxicological assessment and importance of size and composition of particles for oxidative damage and carcinogenic mechanisms. J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev 26, 339–362. doi:10.1080/10590500802494538

WHO, 2014. OMS | Qualité de l'air ambiant (extérieur) et santé [WWW Document]. WHO. URL http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs313/fr/ (accessed 7.10.15).

WHO Regional Office for Europe, 2006. Air quality guidelines: Global update 2005, Particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide. Indian Journal of Medical Research 492.

WHO, World Health organization, 2013. IARC: Outdoor air pollution a leading env ironmental cause of cancer deaths.

Zhang, Q., Pi, J., Woods, C.G., Andersen, M.E., 2009. Phase I to II cross-induction of xenobiotic metabolizing enzymes: A feedforward control mechanism for potential hormetic responses. Toxicology and Applied Pharmacology 237, 345–356. doi:10.1016/j.taap.2009.04.005

Zheng, M., Wan, T.S.M., Fang, M., Wang, F., 1997. Characterization of the non-volatile organic compounds in the aerosols of Hong Kong— identification, abundance and origin. Atmospheric Environment 31, 227–237. doi:10.1016/1352-2310(96)00173-2

Variables	BNMN		C+MN		C-MN	
	Coefficients	p-value	Coefficients	p-value	Coefficients	p-value
Na	0.0382	0.8198	-3,00E-04	0.9984	0.1772	0.2873
Al	0.0711	0.6716	-0.0248	0.8824	0.1116	0.5046
Ca	0.1827	0.2723	0.023	0.8909	0.3867	0.0165
Ti	-0.2315	0.1619	-0.2437	0.1403	-0.0103	0.9511
V	0.105	0.5302	0.2659	0.1066	-0.1422	0.3945
Cr	0.2102	0.2053	0.1233	0.461	0.2279	0.1688
Mn	-0.2976	0.0696	-0.4823	0.0022	0.168	0.3132
Fe	0.0867	0.6049	0.0292	0.8619	0.1555	0.3511
Ni	0.1754	0.2922	0.1695	0.3089	0.0346	0.8364
Cu	-0.0653	0.6969	-0.1094	0.5133	0.0882	0.5983
Zn	0.1246	0.4561	-0.0783	0.6403	0.3884	0.016
Mo	-0.4167	0.0092	-0.5929	1,00E-04	0.0155	0.9263
Pb	-0.2758	0.0937	-0.3037	0.0638	-0.0463	0.7824

Supplementary data - Table 1(a). Spearman's correlation coefficients for the water-soluble components and the genotoxicity of the hydrophilic extracts relationships.

Variables	BNMN		C+MN		C-MN	
	Coefficients	p-value	Coefficients	p-value	Coefficients	p-value
Naphthalene	0.3133	0.049	0.2177	0.1773	0.3071	0.039
Acenaphtylene	0.3906	0.0127	0.3271	0.0394	0.3155	0.0474
Acenaphtene	0.2556	0.1114	0.2257	0.1614	0.235	0.1444
Fluorene	0.3608	0.1222	0.1472	0.3647	0.3889	0.1131
Phenanthrene	0.0733	0.653	0.0175	0.9146	0.0813	0.618
Anthracene	0.0696	0.6697	-0.0807	0.6206	0.0825	0.613
Fluoranthene	-0.1968	0.2235	-0.2016	0.2122	-0.1189	0.4649
Pyrene	-0.3005	0.0596	-0.2726	0.0887	-0.1996	0.2168
Benz[a] anthracene	-0.2501	0.1196	-0.1851	0.253	-0.1795	0.2679
Chrysene	-0.1885	0.2441	-0.0797	0.6248	-0.1488	0.3593
Benzo[b+k]fluoranthene	-0.2639	0.0999	-0.1314	0.4191	-0.2006	0.2146
Benzo[a]pyrene	0.21	0.1934	0.2085	0.1966	0.1907	0.2385
Indeno[1,2,3-c,d]pyrene	-0.1647	0.3098	-0.1564	0.3351	-0.0829	0.6109
Dibenz[a,h] anthracene	-0.0964	0.5542	-0.1481	0.3618	-0.0345	0.8328
Benzo[g,h,i] perylene	-0.2505	0.119	-0.2068	0.2005	-0.1499	0.3558
∑ PAHs	-0.2316	0.1505	-0.1093	0.5018	-0.1731	0.2855

Supplementary data - Table 1(b). Spearman's correlation coefficients for the organic-extractable components and the genotoxicity of the lipophilics extracts relationships.

Variables	BNMN		C+MN		C-MN	
	Coefficients	p-value	Coefficients	p-value	Coefficients	p-value
Naphthalene	0.0775	0.6436	0.0809	0.6291	-0.0273	0.8706
Acenaphtylene	0.0863	0.6065	-0.1334	0.4245	0.3484	0.0321
Acenaphtene	0.0809	0.6293	0.1232	0.4611	-0.0857	0.6089
Fluorene	0.0531	0.7513	-0.0148	0.9299	0.0834	0.6184
Phenanthrene	0.0393	0.8148	0.0027	0.9874	0.1415	0.3969
Anthracene	-0.2898	0.0776	-0.1934	0.2446	-0.361	0.026
Fluoranthene	0.2293	0.1661	0.2042	0.2189	0.2809	0.0876
Pyrene	0.2448	0.1386	0.2103	0.2051	0.3165	0.0529
Benz[a] anthracene	0.1329	0.4262	0.1409	0.3986	0.1413	0.3976
Chrysene	-0.0601	0.7199	-0.0347	0.8363	0.0461	0.7835
Benzo[b+k]fluoranthene	0.0862	0.6067	0.1407	0.3995	0.0425	0.8002
Benzo[a]pyrene	0.0772	0.6452	-0.1144	0.4941	0.3955	0.014
Indeno[1,2,3-c,d]pyrene	-0.1047	0.5316	0.0148	0.9298	-0.2341	0.1573
Dibenz[a,h] anthracene	0.1402	0.4012	0.1505	0.3673	0.1041	0.5338
Benzo[g,h,i] perylene	-0.0621	0.7113	0.0119	0.9434	-0.0978	0.5593
∑ PAHs	0.0705	0.6741	0.1071	0.5222	0.0808	0.6295

Supplementary data - Table 1(c). Spearman's correlation coefficients for the organic-extractable components and the genotoxicity of the lipophilic extracts with metabolic activation relationships.

1.2 Résultats et discussion

Les principaux résultats concernant les concentrations en $PM_{2.5}$ et les teneurs en métaux et en HAPs obtenus dans les extraits hydrophiles et lipophiles, respectivement, sont présentés dans le Tableau 5.

	Sites	Saisons	$PM_{2.5}$ ($\mu g/m^3$)	∑ Métaux (ng/m^3)	∑ HAPs (ng/m^3)
1	Cimenterie	Eté	14	1 076,24	0,234
		Hiver	13	829,53	0,301
2	Usine d'alumine	Eté	13	1 622,76	0,099
		Hiver	14	608,96	0,277
3	Centrale thermique	Eté	15	1 899,00	0,114
		Hiver	12	1 138,36	0,120
4	Traffic routier	Eté	13	2 468,28	0,180
		Hiver	28	3 007,08	0,492
5	Urbain	Eté	13	2 292,78	0,332
		Hiver	28	1 496,17	0,487
	Impact saisonnier		Hiver > Eté sites 4 et 5	Eté > Hiver sauf site 4	Hiver > Eté sauf site 3

Tableau 5. Synthèse des données obtenues sur les concentrations en $PM_{2.5}$, métaux et HAPs sur les cinq sites au cours des deux saisons.

La pollution de l'air par les $PM_{2.5}$ est une problématique importante au regard de l'estimation des risques sanitaires encourus par les populations. En effet, en 2013 les $PM_{2.5}$ ont été classées par le CIRC comme cancérogènes avérés pour l'Homme (WHO, World Health organization, 2013). Pour les deux campagnes de prélèvements, les concentrations en $PM_{2.5}$ sont similaires en été et en hiver pour les sites industriels, alors qu'elles doublent en hiver pour les sites du trafic routier et urbain. La concentration moyenne annuelle seuil en $PM_{2.5}$ a été fixée à 10 $\mu g/m^3$ par l'OMS. Cette valeur a été dépassée au cours de nos campagnes de prélèvements, avec des concentrations allant de 12 à 15 $\mu g/m^3$ et elles ont atteint 28 $\mu g/m^3$ en hiver pour les sites urbain et du trafic routier. Ce comportement (nette augmentation en hiver) est très souvent observé pour les sites urbains du réseau AirPACA et n'est donc pas en relation directe avec les particularités de l'OHM-BMP.

La composition chimique des particules est influencée par : les sources émettrices, la saison, et l'éloignement par rapport à la source. Les concentrations les plus élevées en composés hydrosolubles, c'est-à-dire en éléments inorganiques (métaux et métalloïdes) ont été retrouvées sur le site du trafic routier ; ils présentent un fort impact saisonnier, à la faveur

de concentrations plus élevées en été qu'en hiver. Les composés les plus abondants sont le Na, et le Ca, suivis par les éléments traces Fe, Al, Cu et Zn, et enfin les éléments Ti, V, Cr, Mn, Ni, Mo et Pb étaient moins représentés. La part de l'usine d'alumine dans les teneurs en composés inorganiques des $PM_{2.5}$ prélevées sur ce site n'est pas évidente. En effet, bien que l'Al soit plus élevé en été sur ce site, les éléments Cr, Ti et V qui sont des traceurs de la bauxite, ne sont pas plus élevés que sur les autres sites.

Les composés liposolubles, les HAPs ont majoritairement été retrouvés sur les sites trafic routier et urbain ; ils présentent un fort impact saisonnier, à la faveur de concentrations plus élevées en hiver qu'en été. Cela peut être dû aux phénomènes de combustion (brûlage des déchets verts, chauffage à la biomasse) et de conversion particulaire/gazeux plus importants en été qu'en hiver. Les niveaux de concentration mesurés sur les cinq sites (entre 0,1 et 0,5 ng/m^3) sont nettement inférieurs à ceux enregistrés par AirPACA tant à Marseille qu'à Aix en Provence où la somme des HAPs dépasse les 2 ng/m^3. A partir de nos mesures, et sous réserve que les sites sélectionnés soient bien représentatif de lieux fortement exposés aux particules, l'OHM-BMP ne semble pas être un territoire où l'exposition aux HAPs particulaires est plus forte que sur d'autres sites dans la région PACA.

L'évaluation de la toxicité des phases hydrophiles et lipophiles extraites des $PM_{2.5}$ a été étudiée en termes de cytotoxicité et de génotoxicité. Les résultats de l'étude de cytotoxicité tendent à montrer la capacité des extraits à altérer le métabolisme mitochondrial après 24 h d'exposition des cellules pulmonaires humaines NHLF. Ces résultats nous ont permis de déterminer les concentrations à tester dans le cadre de l'étude des mécanismes physiopathologiques sous-jacents aux dommages chromosomiques après l'inhalation de particules atmosphériques fines. Une exposition des cellules à des concentrations maximum de 3 µg/ml pour les extraits hydrophiles et de 1 µg/ml pour les extraits lipophiles nous permettaient de mesurer la survenue de pertes de fragments chromosomiques et de chromosomes entiers qui ne pouvaient pas être consécutive à des dysfonctionnements cellulaires due à une cytotoxicité.

Les résultats de génotoxicité *in vitro* obtenus après l'exposition des cellules NHLF aux différents extraits hydrophiles, lipophiles sans activation métabolique et lipophiles avec activation métabolique en fonction des saisons sont présentés de façon synthétique dans le Tableau 6. Les colonnes intitulées « BNMN », « C+MN » et « C-MN » représentent,

respectivement, les interprétations issues de la détermination des fréquences en cellules binucléées micronucléées, en évènements aneugènes et en évènement clastogènes. Une négativité dans une quelconque de ces colonnes est représentée en gris. Une positivité en BNMN est représentée en vert, en C+MN en jaune, et en C-MN en rouge.

Sites	Phases	Eté			Hiver		
		BNMN	C+MN	C-MN	BNMN	C+MN	C-MN
1	Hydrophile						
	Lipophile -S9 mix						
	Lipophile +S9 mix						
2	Hydrophile						
	Lipophile -S9 mix						
	Lipophile +S9 mix						
3	Hydrophile						
	Lipophile -S9 mix						
	Lipophile +S9 mix						
4	Hydrophile						
	Lipophile -S9 mix						
	Lipophile +S9 mix						
5	Hydrophile						
	Lipophile -S9 mix						
	Lipophile +S9 mix						

Tableau 6. Récapitulatif des effets génotoxiques par site, en fonction des phases d'extraction et des saisons.

Il apparaît qu'une induction de micronoyaux est observée pour au moins l'une des phase/condition métabolique testée quel que soit le site et la saison. En revanche, dans certains couples site/saison, aucune activité clastogène ou aneugène n'est observée. Au cours de notre étude, les extraits hydrophiles ont principalement induits des effets aneugènes sur les cellules pulmonaires, alors que les extraits lipophiles avec et sans activation métabolique ont majoritairement générés des évènements clastogènes.

Les analyses statistiques complémentaires (PCA et les corrélations de Spearman) ont permis de mettre en évidence l'influence de certains composés sur l'induction de dommages chromosomiques, à savoir : (1) l'induction de C-MN par le Ca et le Zn dans les extraits hydrophiles ; (2) l'induction de BNMN, C+MN et C-MN par l'acénaphtylène et l'induction de

BNMN et C-MN par le naphtalène dans les extraits lipophiles sans activation métabolique ; et (3) l'induction de C-MN par le benzo[a]pyrène dans les extraits lipophiles avec activation métabolique.

Si l'on considère que l'Homme est exposé aux particules dans leur globalité, en nous affranchissant des phases d'extraction et en considérant que les effets observés sur chacune des phases sont additifs, nous pouvons récapituler les effets génotoxiques observés sur les cellules NHLF après exposition de 24 h dans le Tableau 7 (les codes couleur sont identiques à ceux du tableau précédent, 6).

Sites	Eté			Hiver		
	BNMN	C+MN	C-MN	BNMN	C+MN	C-MN
1						
2						
3						
4						
5						

Tableau 7. Récapitulatif des effets génotoxiques par sites en fonction des saisons.

Une génotoxicité des $PM_{2.5}$ susceptible d'induire la formation de micronoyaux a été observée sur chaque site et à chaque saison. Néanmoins, celle-ci peut être consécutive à des anomalies de répartition de chromosomes (C+MN) ou à des lésions primaires de l'ADN (C-MN). Les sites 2, 3, 4 et 5 ont induit des dommages chromosomiques clastogènes. Néanmoins, pour le site 2 en hiver, seule la concentration la plus élevée (1 µg/ml) a induit une réponse clastogène dans la phase lipophile avec activation métabolique. Les sites de la centrale thermique, du trafic routier et urbain sont, indépendamment des saisons, les plus susceptibles d'induire des pertes de fragments chromosomiques. Les agents porteurs de propriétés clastogènes engendrent les lésions primaires à l'ADN les plus complexes. Leur réparation fait appel à des processus de recombinaison complexes, et la fidélité des réparations n'est pas toujours possible. Du seul point de vue de la génotoxicité, une priorisation des actions de prévention pourrait être apportée aux sites/saisons concernés par une positivité clastogène.

Il est cependant extrêmement important de souligner que l'analyse ci-dessus ne tient aucunement compte des niveaux d'exposition. Cette stratégie nous permet de pouvoir

comparer la génotoxicité des particules à quantité de matière équivalente d'un site à l'autre ou d'une saison à l'autre : cette approche est donc qualitative.

1.3 Conclusion

Les $PM_{2.5}$ prélevées aux alentours de la centrale thermique, du trafic routier et de la ville ont été les plus efficientes à induire des cassures chromosomiques qui sont des évènements fortement délétères et sans seuil. Au-delà de la pollution particulaire par des industries minérales, les activités anthropiques liées à la combustion sont les plus problématiques en termes de risques génotoxiques. La nature génotoxique des $PM_{2.5}$ confirme l'intérêt des stratégies de réduction des émissions particulaires mises en place ces dernières années en région PACA pour la santé des populations, telles que la réduction de la vitesse sur les autoroutes inter-urbaines et l'interdiction de brûlage des déchets verts.

Dans le cadre de l'étude PACTES-BMP, les évaluations des potentiels génotoxiques des phases extraites à partir des $PM_{2.5}$ différaient des résultats de l'enquête faite sur la perception de la pollution particulaire par les populations. En effet, la population est très sensible à ce qui se voit, se sent et s'entend, et y associe, de fait, une dangerosité. A cette association des sens se rajoute l'idée que la pollution est émise par les autres. Dans beaucoup d'entretiens figurait l'idée que la pollution vient d'ailleurs (industrie, trafic) et qu'individuellement on ne peut pas faire grand-chose.

Dans les prochaines années, nos résultats de génotoxicité *in vitro* acquis sur les fractions hydrophiles et lipophiles issues des prélèvements de $PM_{2.5}$ sur divers sites de l'OHM-BMP pourraient être utilement complétés par une analyse de la génotoxicité des particules elles-mêmes (sans séparer les fractions hydrophile et lipophile) en prenant en compte la bioaccessibilité des composés dans les fluides pulmonaires. En effet, des phénomènes additifs, antagonistes ou synergiques peuvent avoir lieu lorsque les cibles biologiques sont soumises à l'ensemble des espèces chimiques et au caractère particulaire de ces polluants environnementaux.

II. Poussières de sols intérieurs et éléments potentiellement toxiques provenant d'Estarreja, Portugal : caractérisation et génotoxicité de la fraction bioaccessible

Les contaminants particulaires environnementaux font référence à des particules de granulométrie variable émises dans l'atmosphère qui, plus tard, se déposent au sol. Ainsi, les voies d'exposition à ces polluants sont multiples, lorsque les particules sont en suspension dans l'atmosphère elles peuvent être inhalées et au sol elles sont susceptibles d'être ingérées. Les enfants en bas-âges sont particulièrement vulnérables aux génotoxiques constitutifs de ces particules compte tenu du nombre de renouvellement tissulaire qui devront avoir lieu tout au long de leur vie. La problématique de l'ingestion par les enfants de poussières de sols contaminées par des Eléments Potentiellement Toxiques (EPTs) nous est apparue naturellement comme la continuité de ce travail. Dans notre étude nous nous sommes donc intéressés aux poussières de sols à l'intérieur de maisons au sein desquelles les EPTs se retrouvent particulièrement concentrés (Rasmussen, 2004). Les maisons sélectionnées avaient pour particularités de présenter les teneurs en EPTs les plus variables au cours d'une étude précédente (Reis et al, 2015).

Les métaux et métalloïdes suivants Al, V, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, As, Mo, Cd, Sn, Sb, Ba, et Pb sont considérés comme des EPTs. A faibles concentrations certains EPTs (Cu, Co, Cr, Mn, Ni et Zn) sont essentiels pour l'organisme. A fortes concentrations ils contribuent, comme d'autres EPTs (ex. As et Sn) reconnus comme étant des polluants majeurs, au développement de cancers (Anetor et al., 2007; De Boeck et al., 2003; Denys et al., 2012; Gebel, 1997).

2.1 Introduction

L'exposition aux EPTs a fortement augmentée, du fait de leur utilisation dans des procédés industriels, agricoles, et technologiques (Tchounwou et al., 2012). L'ingestion est la principale voie d'exposition aux EPTs. Dû à leur fragilité immune, digestive et neurologique ainsi qu'à la multitude des contacts mains/objets-bouches, les enfants sont les principales cibles des EPTs. Ces derniers ont un rôle soit prouvé, soit fortement suspecté dans un certain nombre de maladies neurologiques et digestives. De plus, les EPTs sont impliqués dans la

survenue de cancers *via* des processus génotoxiques dus à des espèces réactives de l'oxygène, à l'inhibition de la réparation de l'ADN et à des phénomènes apoptotiques (Anetor et al., 2007; De Boeck et al., 2003; Denys et al., 2012; Gebel, 1997; Lee et al., 2012).

Les calculs permettant l'évaluation des expositions et des risques sanitaires encourus à la suite d'ingestion de contaminants utilisent généralement la composition globale du contaminant, ainsi que la dose journalière ingérée, et la fréquence d'exposition (Chen et al., 2014; Goix, 2012). Cependant, pour certains contaminants, des comparaisons entre les résultats des calculs et les mesures faites dans les fluides physiologiques (urine, sang, etc.) montrent une surestimation de la dose par calcul (INVS, Institut de Veille Sanitaire, 2012). En effet, la toxicité des poussières ingérées est fonction de la bioaccessibilité de ses constituants (capacité d'un composé à se solubiliser et à devenir disponible pour éventuellement traverser la barrière épithéliale du tractus digestif et rejoindre les tissus et organes cibles). Plusieurs protocoles ont été développés pour estimer la biodisponibilité des composés ingérés grâce à l'évaluation de leur bioaccessibilité, plus facile à déterminer (Oomen et al., 2002).

La toxicité des poussières de sols a jusqu'alors été étudiée à partir de diverses extractions, en majorité sur des composés organiques par des études de cytotoxicité et de génotoxicité (ex. test d'Ames, Salmonella typhimurium et SOS chromotest) (Kang et al., 2013, 2011; Maertens et al., 2008; Pohren et al., 2012; Wang et al., 2013a, 2013b; Watanabe and Hirayama, 2001). Aucune étude n'a à ce jour associé la prise en compte globale des particules et de leur bioaccessibilité pour évaluer les risques génotoxiques associés à leur ingestion. Pour ce faire, notre étude vise à développer une nouvelle méthodologie.

L'étude pilote exposée dans l'article « *Potentially harmful elements in house dust from Estarreja, Portugal: characterization and genotoxicity of the bioaccessible fraction* » est une approche interdisciplinaire visant à étudier la génotoxicité des EPTs après ingestion accidentelle de poussière de maison. La fraction bioaccessible des EPTs a été considérée comme étant la mesure pertinente de l'exposition. Sur un total de 21 maisons collectées à Estarreja, 5 ont été choisies (Figure 18) en raison de leurs différences de concentrations en EPTs dans les poussières et de la variabilité de leurs fractions bioaccessibles. Les concentrations en EPTs ont été déterminées par ICP-MS. La bioaccessibilité a été évaluée par « *Unified BARGE Method* ». La cytotoxicité a été évaluée à l'aide du test WST-1. La

génotoxicité a été déterminée à l'aide de deux tests complémentaires : le test des comètes pour mettre en évidence les lésions primaires à l'ADN et le du test du micronoyau avec marquage centromérique pour mettre en évidence les dommages chromosomiques. Les études de cytogenotoxicité ont été réalisées *in vitro* sur un modèle de cellules humaines épithéliales gastrique : « *adenocarcinoma gastric stomach cells* », cellules AGS. Ces cellules représentent le tissu cible d'une exposition par ingestion au niveau gastrique. La fraction gastrique est plus proche des concentrations en contaminants observées *in vivo* comparativement à la fraction gastro-intestinale (Wragg et al., 2011). Par ailleurs, ce modèle cellulaire a déjà fait l'objet de quelques études de cytogenotoxicité relative à l'ingestion d'amoxicilline, à l'exposition à des dérivés de l'acide salicylique ou encore à l'infection chronique gastrique due à Helicobacter pylori (Alam-Escamilla et al., 2015; Anikeenok and Il'inskaia, 2008; Li et al., 2007). Les relations entre les données environnementales et les dommages chromosomiques mesurés *in vitro* sur les cellules AGS ont été investiguées à l'aide de deux tests statistiques : l'analyse en composantes principales (PCA) et corrélations de Spearman.

Notre étude, est une étude pilote qui a pour but de développer une nouvelle méthodologie visant à évaluer le potentiel génotoxique d'EPTs après ingestion accidentelle de poussières de sols contaminées. Bien que située au cœur de l'OHM Esterreja, notre étude pluridisciplinaire propose le développement d'une méthodologie sans avoir l'ambition d'apporter des informations sur les sources de contamination ou encore sur la prévention du risque sanitaire sur l'OHM Estarreja.

Les résultats de nos travaux ont été soumis sous la forme d'article scientifique pour publication dans le journal « Environmental Geochemistry and Health ». Dans la partie suivante les principaux résultats sont présentés et discutés.

Potentially harmful elements in house dust from Estarreja, Portugal: characterization and genotoxicity of the bioaccessible fraction

S. Plumejeaud[1], A.P. Reis[2], V. Tassistro[1], C. Patinha[2], Y. Noack[3], T. Orsiere[1*]

Environmental Geochemistry and Health

*** Corresponding author**

Thierry Orsière: IMBE, Aix Marseille Université, CNRS, IRD, Avignon Université, Equipe BSHE, 13005 Marseille, France. Phone: +33 491 324 571; Fax: +33 491 324 572; Email: thierry.orsiere@imbe.fr

Institutional address

[1]: IMBE, Aix Marseille Université, CNRS, IRD, Avignon Université, Equipe BSHE, 13005 Marseille, France.

[2]: GEOBIOTEC, Departmento de Geociências, Campus Universitario de Santiago, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal.

[3]: Aix Marseille Université, CNRS, CEREGE UM34, 13545 Aix en Provence, France.

Email addresses

S. Plumejeaud: sophie.plumejeaud@imbe.fr

A.P. Reis: pmarinho@ua.pt

V. Tassistro: virginie.tassistro@imbe.fr

C. Patinha: cpatinha@ua.pt

Y. Noack: noack@cerege.fr

T. Orsière: thierry.orsiere@imbe.fr

Abstract

This pilot study presents an integrated approach aiming at assessing the genotoxicity of potentially harmful elements (PHEs) following incidental ingestion of house dust. In the methodology hereby described, the PHEs bioaccessible fraction is considered as the relevant measure of exposure. A total of 21 residences in Estarreja were recruited to the study. Indoor dust samples were collected from different house compartments using the High Volume Small Surface Sampler vacuum sampler. Semi-quantitative analysis of 55 chemical elements, including PHEs, was carried out by ICP-MS. Oral bioaccessibility measurements were obtained using the Unified BARGE Method. The genotoxic potential of the PHEs bioaccessible fraction was assessed in a sub-set of 5

samples selected according to their chemical composition. While the alkaline comet assay was performed to evaluate primary DNA damage, the CBMN assay with centromeric labeling (CREST antibodies) was used to determine chromosomal damage and to distinguish between clastogenic (chromosomal breaks) and aneugenic (chromosome losses) effects. The relationships between the environmental data and the *in vitro* genotoxic effects observed in gastric human cells (AGS) were investigated using statistical tools, namely principal component analysis and Spearman's correlation. The five tested extracts induced dose-dependent genotoxicity on AGS cells. Copper was probably the prevalent PHE inducing primary DNA damage, while lead was the most prevalent PHE inducing chromosome-damaging effects. Although methodology development is the main purpose of this study, the results achieved are relevant for human health risk assessment considerations, as it is well established that clastogenic compounds are usually associated with increased risk of carcinogenesis.

Keywords

Indoor dust; Unified BARGE Method; Gastric stomach cells; Genotoxicity; Alkaline comet assay; Cytokinesis-block micronucleus assay.

Highlights

- Indoor dust composition and PHEs bioaccessibility influence genotoxicity;
- Dose-dependent response in AGS cells for alkaline comet and CBMN assays;
- Bioaccessibility participate in the estimation of human exposure;
- Association between bioaccessibility and genotoxic properties of soil contaminants leads to a better understanding of human risk exposure.

Abbreviations

AGS: adenocarcinoma gastric stomach; BARGE: bioaccessibility research group of Europe; BAF: bioaccessible fraction; BNMN: binucleated micronucleated cells; C-MN: acentromeric micronuclei cell; C+MN: centromeric micronuclei cell; CBMN: cytokinesis-block micronucleus; CCE: chemical complex of Estarreja; MN: micronuclei; PHE: potentially harmful element; UBM: unified BARGE method.

1. Introduction

It has been reported that trace elements such as cobalt (Co), copper (Cu), chromium (Cr), molybdenum (Mo), manganese (Mn) and zinc (Zn) are essential nutrients required for various biochemical and physiological functions in the human body (WHO, 1996). For some, including Cr, Cu and Zn, there is a narrow range of concentrations between beneficial and adverse effects (Chang et al., 1996; Lee et al., 2012). Other trace elements such as aluminium (Al), antimony (Sb), arsenic (As), barium (Ba), cadmium (Cd), gallium (Ga), lead (Pb), nickel (Ni), thallium (Tl), tin (Sn) and vanadium (V) have no established biological functions and are considered as potentially harmful to humans. These potentially harmful elements (PHEs) contribute to genotoxicity involving reactive oxygen species and/or DNA repair inhibition, apoptosis, and cancer

development in mammals (Anetor et al., 2007; De Boeck et al., 2003; Denys et al., 2012; Gebel, 1997; Lee et al., 2012).

Human exposure to environmental PHEs has risen dramatically as a result of an exponential increase of their use in several industrial, agricultural, domestic and technological applications (Tchounwou et al., 2012). Whilst ingestion, inhalation and dermal absorption are the likely routes of exposure, experimental lines of evidence suggest that, for many PHEs, soil/dust ingestion is a major pathway of human exposure to these environmental contaminants (Davis and Mirick, 2006; Reis et al., 2014). Furthermore, given the large amount of time people spend indoors, either at the home, school or at the workplace, the potential health risks posed by contaminants in indoor dust raises additional concerns (Lin et al., 2015). Indeed, recent studies suggested that contaminated indoor house dust may represent an increased risk to human health compared to contaminated exterior soil (Ibanez et al., 2010; Niu et al., 2010). Ingestion of dust generally occurs through deliberate hand-to-mouth movements, or unintentionally by eating food that has dropped on the floor and particles that have adhered to skin (U.S. Environmental Protection Agency, 2008). Young children (< 6 years old), while explorers of their environment, are particularly vulnerable to this exposure pathway due to frequent hand-to-mouth and object-to-mouth habits (Mohmand et al., 2015; Reis et al., 2015; N. S. Tulve et al., 2002). Several studies used exposure assessment to consider the relevance of this exposure, concluding that ingestion of dust particles contributes most to the overall risk (Aung et al., 2004; Rasmussen et al., 2013).

Whilst the intake dose (the amount of a chemical ingested by an individual) is the most commonly used measure of exposure in toxicity studies, the absorbed dose is the one causing the most, if not all, adverse effects on human health. In addition to the determination of PHEs concentrations in dust, data relative to the PHEs bioavailability (fraction of an ingested chemical that is absorbed by the body) and/or bioaccessibility (fraction of the contaminant that is released from its solid matrix in the gastrointestinal tract and is available for absorption by the body) is key information in human health risk assessment. Several protocols have been developed for the ingestion pathway to assess the bioavailability of a PHE from its bioaccessibility (Oomen et al., 2002). The Bioaccessibility Research Group of Europe (BARGE) has developed an in vitro test, the Unified BARGE Method (UBM), which mimics the solubilization process during digestion and thus allows estimating the bioaccessibility of PHEs in the solid-phase (Denys et al., 2009; Wragg et al., 2011). The UBM is considered to be representative of the physiological conditions in the human gastrointestinal (GI) tract (Wragg et al., 2011).

Previous studies investigating indoor dust/oral bioaccessibility mainly focused on organic compounds (i.e. polycyclic aromatic carbons, phthalates esters) obtained after organic extraction (Kang et al., 2013, 2011; Maertens et al., 2008; Pohren et al., 2012; Wang et al., 2013a, 2013b). They quantified the toxicity by evaluating the excess lifetime cancer risk and some assessed these organic extracts *in vitro* by cytotoxic and genotoxicity assays, such as the Ames test, SOS chromotest, and Salmonella assay (Kang et al., 2013, 2011; Maertens et al., 2008; Pohren et al., 2012; Wang et al., 2013a, 2013b). Likewise, the toxicity of PHEs from indoor dust has been investigated using either the evaluation of excess lifetime cancer risk or cytotoxicity tests (Chen et al., 2014; Deschamps et al., 2013; Granero and Domingo, 2002; Kurt-Karakus, 2012). However, these studies utilised the ingested dose as the relevant measure to assess the health risk, and the oral bioavailability

of the PHEs was not estimated. Notably, as far as we know, no study was published focusing on the genotoxicity of PHEs in indoor dusts taking into account their oral bioavailability. Hence, the present pilot study is about an integrated approach that aims at assessing the genotoxicity of PHEs following incidental ingestion of contaminated indoor dust, considering that, for this exposure pathway, the ingested dose usually overestimates the absorbed dose and the oral bioavailability of the contaminants has to be determined. It is a detailed interdisciplinary study, carried out for purposes of methodology development that does not envisages achieving further information on the diagnosis, spreading or prevention of disease in the studied area.

2. Material and methods

2.1 Characterization of the study area

Estarreja is a small coastal city in Portugal close to the broad “Ria de Aveiro” lagoon, which is a protected “Natura 2000 net” area (Fig.1). The coastal plain around the lagoon supports an intensive and diversified agriculture, but since 1950 the region is also known for the large industrial chemical complex of Estarreja (CCE). For many years, several of these industries dumped their solid residues (including ashes and dust with As, Pb, Cu, Zn, etc.) in an improvised park inside the CCE, albeit the proximity of the urban center of Estarreja that is only 1 km away. Awareness on the pollution status of the "Ria de Aveiro" and of its ecosystems started in the 80s (Patinha et al., 2014), and since then, technological upgrades associated to remediation measures implemented by the industries have strongly reduced the environmental burden of the area. However, by its dimension and configuration, the CCE is still regarded as the major pollutant of the region.

2.2 Dust sampling

From the total of 19 households recruited for the study, five were selected according to their differences in chemical composition to carry out the exploratory study on the genotoxic potential of the indoor dusts. No similar studies were found in the relevant literature, and the development of an integrated approach combining environmental and toxicity data is primary endpoint of the present study. Residents were recruited through informal interviews and a questionnaire was provided to the participants. The questionnaire aimed at obtaining information about the physical environment of the house and lifestyle factors likely to affect the chemical composition of the dust. Ethical approval for this study was obtained from the National Committee for Data Protection (Proc. nº 1241/2013). All participants gave written and informed consent to the study.

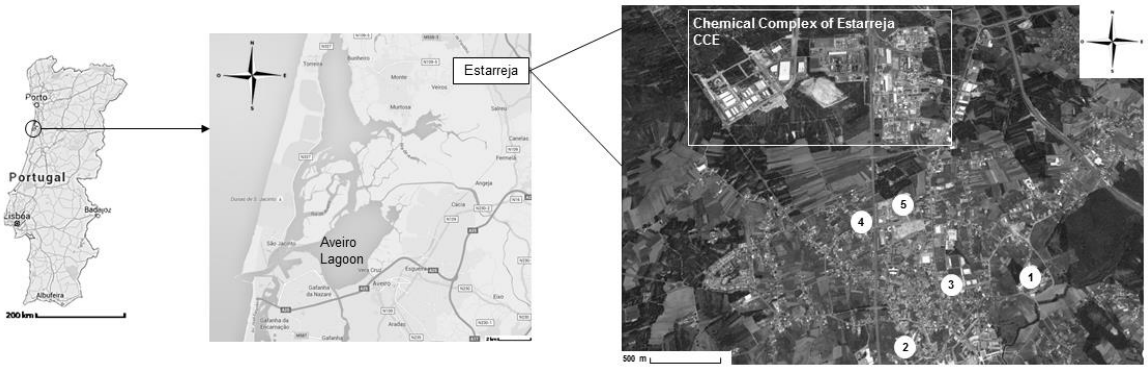


Fig. 1 Map of Estarreja showing the sampling sites, the CCE, and the location of Estarreja within the Aveiro district and Portugal.

Participants were requested to abstain from cleaning floor surfaces for a period of 7 days before the scheduled house dust sampling. Composite house dust samples were collected from the floor and carpets using the high-volume small surface (HVS3) vacuum sampler, which is designed to capture 99% of the particles ≥ 0.5 µm (Reis et al., 2015). Collected dust samples were oven-dried at 40°C for 24 h, sieved through a 150 µm nylon mesh and stored in polyethylene containers at ambient temperature. The particle size < 150 µm was chosen to the exploratory study because it represents the particle size range likely to adhere to hands and thus, to be ingested following hand-to-mouth movements (Gron and Andersen, 2003; U.S. Environmental Protection Agency, 2000).

2.3 Chemical analysis

2.3.1 Indoor dust PHEs total concentrations

Dust samples were digested in Aqua Regia at 90 °C in a microprocessor controlled digestion block for 2 h, and the analysis of 53 chemical elements, including PHEs, was carried out by Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS) at the ACTLABS Analytical Laboratory, Canada. Each sample batch prepared for ICP-MS analysis included dust samples, duplicates and blanks. The Certified Reference Materials GRX-1, GRX-6 and SAR-M (United States Geological Survey) were selected to represent a wide range of total elemental concentrations. The blanks results were always below detection limits. In this study, we focused on the 16 following PHEs: Al, V, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, As, Mo, Cd, Sn, Sb, Ba, and Pb. Values for precision (expressed as RSD %) are <10% for all elements.

2.3.2 Bioaccessibility of the PHEs in gastric extracts

The bioaccessibility of the PHEs was determined by subjecting a small quantity of sample to the UBM. The UBM protocol consists of two parallel sequential extractions simulating the chemical processes occurring in the mouth, stomach and intestine compartments using synthetic digestive solutions according to physiological transit times, which allow us to obtain both gastric and gastrointestinal extractions (Denys et al., 2009). The methodology has been validated against a juvenile swine model for As, Cd and Pb in soils, but not yet for less common PHEs (Denys et al., 2012). Several studies comparing *in vivo* bioavailability and *in vitro* bioaccessibility have shown that the *in vitro* gastric phase is generally closer to *in vivo* PHEs concentrations (Wragg et al., 2011). Indeed, likely precipitation reactions attributed to basic pH solutions used in the gastrointestinal phase of the UBM protocol usually decrease the bioaccessibility estimates, which may underestimate the bioavailability of the PHEs.

The chemicals used in this experiment were provided by Sigma-Aldrich (Sintra, Portugal). For the gastric extraction an aliquot of 0.6 g dust was extracted by 9 ml of simulated saliva fluid (manually shaken) and 13.5 ml of simulated gastric fluid. After adjusting the pH to 1.2 ± 0.05, the mixture was rotated at 37°C for 1 h on an end-over-end shaker. After checking that the pH value was between 1.2 et 1.5 the solution was centrifuged at 4500 rpm for 15 min, then the supernatant was removed and stored at < 4°C for further analysis (Wragg et al., 2011).

In the present study, the bioaccessible fraction (BAF) corresponds to the ratio between the PHE concentration in the gastric extract and the total PHE concentration in dust, and is expressed as percentage (Oomen et al., 2002):

$$\text{BAF \%} = \frac{\text{PHE concentration in gastric extract}}{\text{PHE concentration in indoor dust}} \times 100$$

The bioaccessible extracts were analyzed by ICP-MS at CEREGE, France. Duplicate samples, the BGS 102 bioaccessibility reference material and blanks were extracted with every batch of UBM bioaccessibility extractions, for quality control purposes. The blanks always returned results that were below the detection limit.

2.4 Genotoxicity assays

2.4.1 Reagents

4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), Goat anti-human Alexa Fluor® 488, Trypsin 0.25% EDTA, Fetal Bovine Serum (FBS), and PBS Dulbecco's were obtained from Life technologies (Saint Aubin, France). Paraformaldehyde (PAF) 4% PBS was from EMS (Hatfield, PA, USA). Bovine Serum Albumin (BSA) fraction V was purchased from Eurobio (Courtaboeuf, France). Vectashield was provided from Vector Laboratories (CA, USA). Human anti-kinetochore antibodies (CREST) were obtained from Laboratory of Immunology at the Hôpital de la Conception (Marseille, France). The other reagents were from Sigma-Aldrich (Lyon, France).

2.4.2 Cells culture and cell viability assay

Adherent human adenocarcinoma gastric stomach (AGS) cells were maintained in DMEM supplemented with 4.5 g/l glucose, 2 mM L-glutamine, 10% FBS, and 1% penicillin and streptomycin, at 37°C under 5% of CO_2. All these reagents were provided by Cell Line Service (Eppelheim, Germany).

Cytotoxicity testing was performed by a colorimetric test, the WST-1 assay, to analyze the number of viable cells by the cleavage of tetrazolium salts added to the culture medium. Cells, grown in a 96-well plate at a density of 10^5 cells/well, were incubated with the tested materials (gastric extracts at 0.067 – 0.13 – 0.27 – 0.53 g/l), and the relative controls for 2 h and 24 h before adding the WST-1 reagent. After 2 h incubation period, the formazan dye was quantitated with a scanning multi-well spectrophotometer microplate reader (Multiskan, Thermo Scientific; Waltham, MA, USA) using a 450 nm emission filter.

2.4.2 Alkaline comet assay

The alkaline comet assay was performed to evaluate primary DNA damage (Collins et al., 1993; Tice et al., 2000). Cells were seeded at a concentration of 2.5 x 10^4 cells/well in a 6-well plate. 24 h after the seeding, cells were exposed for 2 h to increasing concentrations of gastric extracts (0.067 – 0.13 – 0.27 – 0.53 g/l), and vehicle control (2% gastric blank solution in DMEM), then trypsinized and pelleted. After dropping a layer of 0.8% NMP agarose in PBS onto SuperFrost® Microscope slides (Thermo Scientific; Braunschweig, Germany) pre-coated with 1.6% NMP agarose, the cellular pellets were resuspended in 1% LMP agarose and spotted onto the

slides. Positive control was performed at this step by exposing AGS cells to 125 µM H_2O_2 for 5 min at 4°C. After cellular lysis (90 min at 4°C, in the dark) by using a freshly prepared lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM Na_2EDTA, 300 mM NaOH, 10 mM Tris, pH 10 supplemented with 10% DMSO and 1% Triton X-100), slides were immersed, for 20 min at 4°C in the dark, in a denaturation solution (300 mM NaOH and 1 mM EDTA). Electrophoresis was carried out at 27 V and 300 mA for 20 min at 4°C. Then the slides were rinsed with neutralization buffer (4 mM Tris, pH 7.5) and finally dehydrated few seconds in methanol.

To evaluate DNA damage (% tail DNA), the slides were stained with propidium iodide and analyzed using a fluorescence microscope BX 60 (Olympus; Rungis, France) equipped with an appropriate filter combination and a black-and-white camera (Andor Luca S) and driven by Komet 6.0 software (Andor™ Technology; Belfast, UK). For each experimental condition, 100 cells were analyzed, and the experiments were repeated tree times.

2.4.3 Cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay in combination with centromere labeling

The CBMN assay was performed according to the original method described by Fenech (Fenech, 2007), with minor modifications for AGS cells, while centromere labeling was performed as described by González (González et al., 2011). Cells were seeded at a concentration of 2.5 x 10^4 cells/chamber in LabTek™ 4-Chamber Slide™ (Nuc International; Villebon-sur-Yvette, France), and cultured under standard conditions (37°C, 5% CO_2). After 24 h culture, slides were treated with increasing concentrations of gastric extracts (0.067 – 0.13 – 0.27 – 0.53 g/l), vehicle control (2% gastric blank solution in DMEM), and appropriate clastogenic and aneugenic positive controls (10 ng/ml mitomycin C (MMC) and 25 nM colchicine, respectively). At the end of the treatment (24 h), the medium was removed and replaced by fresh medium containing 3 µg/ml cytochalasin B to inhibit cell division after mitosis. Following 24 h incubation, the culture medium was further changed and, after 2 h incubation, cells were washed in PBS and fixed (4% PAF). To discriminate chromosome losses and breakages, cells were incubated with CREST serum (1:1000 in 1% BSA/PBS) for 30 min. Cells were washed in 0.5% Triton X-100/PBS and incubated with secondary antibody Alexa Fluor® 488 goat anti-human (1:200 in 1% BSA/PBS) for 1 h. Cells were then washed in 0.5% Triton X-100/PBS and incubated with a 0.06 µg/ml solution of phalloidin-TRITC (tetramethylrhodamine B isothiocyanate) for 30 min to stain the cytoplasm. After two washes in 0.5% Triton X-100/PBS, cells were incubated with a solution of 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1:50000) for 10 min to stain the nuclei. Finally, the slides were mounted in Vectashield and stored in dark at 4°C until analysis. Micronuclei (MN) contained in binucleated cells were scored using a fluorescence microscope BX 60 (Olympus; Rungis, France) equipped with a black-and-white camera (Andor Luca S), and appropriate filters for DAPI, phalloidin-TRITC, and Alexa Fluor® 488.

Before the analysis, we calculated the cytokinesis block proliferation index (CBPI) on 500 cells to provide the average number of cell divisions completed by the cells, as previously described (Benameur et al., 2011; Kirsch-Volders et al., 2003). Micronucleus analysis results are expressed as a frequency of binucleated micronucleated (BNMN) cells per 1000 binucleated cells; scoring criteria were in accordance with those previously described (Fenech, 2007). Taking advantage of the centromeric labeling, micronuclei containing whole chromosome(s) positively labeled (centromeric micronuclei cell, C+MN), and acentric chromosome fragments that are not

stained due to the absence of centromere (acentromeric micronuclei, C−MN) were discriminated (González et al., 2011; Iarmarcovai et al., 2006; Mateuca et al., 2006; Natarajan et al., 1996).

2.5 Statistical analysis

Results of cytotoxicity and genotoxicity were expressed as the mean value of three independent experiments ± standard error of the mean (SEM). Data were submitted to statistical evaluation using one-way ANOVA. GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA) software was used to perform statistical analysis and to draw the graphics. The significance was compared to negative control (vehicle: 2% gastric blank solution in DMEM). Values were considered statistically significant starting from $p < 0.05$.

Relationships between bioaccessible PHEs and chromosome damage were investigated using two complementary methods, principal component analysis (PCA) and Spearman's correlation. Principal component analysis (PCA) is a mathematical technique adapted to quantitative variables that transforms *n* possibly correlated variables into a (smaller) number of uncorrelated variables referred to as principal component (Jolliffe, 2014; Reis et al., 2015). Moreover, Spearman's correlation is adapted to analyze non-linear monotonic relationships (increasing or decreasing) between the observation's rank of two defined characteristics (chemical composition and chromosome damage).

3. Results

3.1 Indoor dust PHEs concentrations

House dust samples collected from five selected houses in Estarreja were analyzed by ICP-MS to determine elemental concentrations (Table 1). The arithmetic means, geometric means and medians of all analyzed PHEs in the studied dust samples were calculated. Table 1 shows values for the 16 PHEs under study and compares the PHEs concentrations with those reported in the literature (Chattopadhyay et al., 2003; Chen et al., 2014; Deschamps et al., 2013; Kurt-Karakus, 2012; Lisiewicz et al., 2000; Rasmussen et al., 2001).

In all sites the major element was Al, whose median concentration was 11100 mg/kg, followed by trace elements Zn, Cu, Pb, Mn, Ba, Ni, Cr, Sn, V, and As. Co, Sb, Mo, Ga, and Cd were the less abundant PHEs (median concentrations ≤ 5 mg/kg). Notably, Al (6800-16200 mg/kg), Zn (991-5210 mg/kg), Pb (78-1180 mg/kg), Cu (158-407 mg/kg), and Mn (98-296 mg/kg) showed a wide range of values, reflecting the heterogeneity of indoor dust chemistry among the five sites under investigation.

The Estarreja levels for Zn (1520 mg/kg) and Cu (339 mg/kg) were higher than the ones reported for other cities (Chattopadhyay et al., 2003; Chen et al., 2014; Deschamps et al., 2013; Kurt-Karakus, 2012; Lisiewicz et al., 2000; Rasmussen et al., 2001). Pb median concentration in house dusts from Estarreja was equivalent to that reported for Canadian house dusts (Rasmussen et al., 2001), while it was nearly ten times higher than the ones from Turkey and Brazil (Deschamps et al., 2013; Kurt-Karakus, 2012). Median levels of Ni, Cr, As and Co were similar to the majority of those reported in the literature (Chattopadhyay et al., 2003; Chen et al., 2014; Deschamps et al., 2013; Kurt-Karakus, 2012; Lisiewicz et al., 2000; Rasmussen et al., 2001), whereas Ba and V were lower than the ones from China (Chen et al., 2014).

Samples	Location	n	Al	Zn	Cu	Pb	Mn	Ba	Ni	Cr	Sn	V	As	Co	Sb	Mo	Ga	Cd
Site 1	Estarreja, Portugal		11100	1520	303	78	193	103	81	67	33	19	9	5.4	4.2	4.0	2.3	1.0
Site 2	Estarreja, Portugal		16200	1110	339	147	296	71	70	77	19	23	19	6.6	7.1	4.7	4.0	1.8
Site 3	Estarreja, Portugal		6800	5210	407	266	98	90	64	25	25	12	10	3.4	2.0	1.2	0.9	2.2
Site 4	Estarreja, Portugal		15100	991	158	1180	228	71	65	61	13	23	14	5.0	4.6	2.7	3.1	1.2
Site 5	Estarreja, Portugal		8300	1590	350	229	126	134	85	88	18	11	16	5.3	4.4	4.4	1.2	0.8
Mean (*)	Estarreja. Portugal	5	11500	2084	311	380	188	94	73	63	21	18	13	5.1	4.4	3.4	2.3	1.4
SEM	Estarreja. Portugal	5	1644	706	37	181	32	10	4	10	3	2	2	0.5	0.7	0.6	0.5	0.2
Median (**)	Estarreja. Portugal	5	11100	1520	339	229	193	90	70	67	19	19	14	5.3	4.4	4.0	2.3	1.2
Min	Estarreja. Portugal	5	6800	991	158	78	98	71	64	25	13	11	9	3.4	2.0	1.2	0.9	0.8
Max	Estarreja. Portugal	5	16200	5210	407	1180	296	134	85	88	33	23	19	6.6	7.1	4.7	4.0	2.2
(Kurt-Karakus. 2012) **	Istanbul. Turkey	31		832	156	28	136		263	55				5.0				0.8
(Rasmussen et al.. 2001) **	Ottawa. Canada	50		633	157	222	267		52	69				8.8				4.3
(Chattopadhyay et al.. 2003) **	Sydney. Australia	82		372	93	76	48		15	65								1.6
(Lisiewicz et al.. 2000) **	Warsaw. Poland	27		1070	109	124			30	90								
(Chen et al.. 2014)**	Zi'an. China			400	67	145	547	865	34	129		68	12	40				
(Deschamps et al.. 2013)*	Brazil	50		242	64	29			108	546			45					

Min: minimum. Max: maximum. n: number of samples. * Value refers to the mean. ** Value refers to the median.

Table 1 PHEs concentrations (mg/kg) in house dust samples and comparison with other studies also focusing on house dust.

3.2 PHEs bioaccessibility in gastric extracts

In the present study, the PHE concentrations extracted in the gastric phase were considered to be the relevant measure of exposure. Since our study focuses on the fate of the PHEs in the gastric compartment following incidental ingestion of indoor dusts, by using the UBM we mimicked *in vitro* interactions between the dust and the gastric solutions to obtain bioaccessible PHEs (Table 2).

Samples	Al	Zn	Cu	Pb	Mn	Ba	Ni	Cr	Sn	V	As	Co	Sb	Mo	Ga	Cd
Site 1	2555	1260	82	52	98	45	32	16	3.8	6.4	3.6	2.0	0.5	0.2	0.8	0.7
	23	***83***	***27***	***67***	***51***	***43***	***39***	***23***	***12***	***34***	***40***	***37***	***12***	***4***	***35***	***69***
Site 2	2757	951	111	100	192	66	23	16	0.6	7.8	7.4	2.7	0.5	0.1	0.9	1.2
	17	***86***	***33***	***68***	***65***	***93***	***33***	***21***	***3***	***34***	***40***	***40***	***7***	***3***	***23***	***67***
Site 3	1072	4446	111	218	57	28	23	4.7	0.3	4.1	4.3	1.2	0.4	0.1	0.4	1.8
	16	***85***	***27***	***82***	***58***	***31***	***36***	***19***	***1***	***34***	***44***	***36***	***18***	***7***	***47***	***81***
Site 4	3114	658	58	245	157	49	21	9.8	1.2	11	8.3	2.1	0.5	0.1	1.1	0.9
	21	***66***	***37***	***21***	***69***	***70***	***33***	***16***	***9***	***48***	***59***	***41***	***11***	***3***	***35***	***80***
Site 5	4393	1443	46	165	81	29	35	15	1. 5	6.0	8.2	1.7	0.5	0.2	1.0	0.6
	53	***91***	***13***	***72***	***64***	***22***	***41***	***18***	***8***	***55***	***52***	***31***	***11***	***4***	***86***	***83***
Mean	2778	1752	82	156	117	44	27	12	1.5	7.1	6.3	1.9	0.5	0.1	0.9	1.1
	26	***82***	***27***	***62***	***61***	***52***	***36***	***19***	***7***	***41***	***47***	***37***	***12***	***4***	***45***	***76***
SEM	533	687	13	36	25	7	3	2	1	1	1	0.2	0.0	0.0	0.1	0.2
	7	***4***	***4***	***11***	***3***	***13***	***2***	***1***	***2***	***4***	***4***	***2***	***2***	***1***	***11***	***3***
Median	2757	1260	82	165	98	45	23	16	1.2	6.4	7.4	2.0	0.5	0.1	0.9	1.0
	21	***85***	***27***	***68***	***64***	***43***	***36***	***19***	***8***	***34***	***44***	***37***	***11***	***4***	***35***	***80***
Min	1072	658	46	52	57	28	21	4.7	0.3	4.1	3.6	1.2	0.4	0.1	0.4	0.6
	16	***66***	***13***	***21***	***51***	***22***	***33***	***16***	***1***	***34***	***40***	***31***	***7***	***3***	***23***	***67***
Max	4393	4446	111	245	192	66	35	16	3.8	11	8.3	2.7	0.5	0.2	1.1	1.8
	53	***91***	***37***	***82***	***69***	***93***	***41***	***23***	***12***	***55***	***59***	***41***	***18***	***7***	***86***	***83***

Min: minimum. Max: maximum. ***Bold and italic***: bioaccessible fraction (BAF)

Table 2 Bioaccessible PHEs concentrations (mg/kg) and PHEs bioaccessible fraction (BAF in %) determined in the gastric extracts.

Based on the experimental data (Table 2), the PHEs under study can be ordered by their median bioaccessibility in the gastric phase: Zn, Cd> Pb, Mn, As, Ba, Co, Ni, Ga, V, > Cu, Al, Cr, Sb, Sn, and Mo. While Zn and Cd were highly bioaccessible (85% and 80%, respectively), PHEs such as Cu, Al (except for site 5), Cr, Sb, Sn, and Mo were mainly in physicochemical forms that are not available to humans.

In the present study, the bioaccessibility of the studied PHEs was considerably lower than that reported for domestic dust in a previous study of Turner and Simmonds, which employed a simple surrogate (pepsin in 0.075 M HCl) for the human stomach. They found that the bioaccessibility of Al, Cu, Ni and Pb averaged between 60 and 100% (Turner and Simmonds, 2006), whereas our results are in accordance with those of Rasmussen (2004) Ni BAF: 30−40% and Pb BAF: 55−75%, that used an extraction protocol composed by 0.07 M HCl (Rasmussen, 2004). These discrepancies between the reported results are likely related to the different protocols used. Differences in fluid formulation, pH values, residence time or type of shaking within the various *in vitro* tests can significantly affect the degree to which the PHEs are extracted from the soil/dust matrix (Oomen et al., 2002).

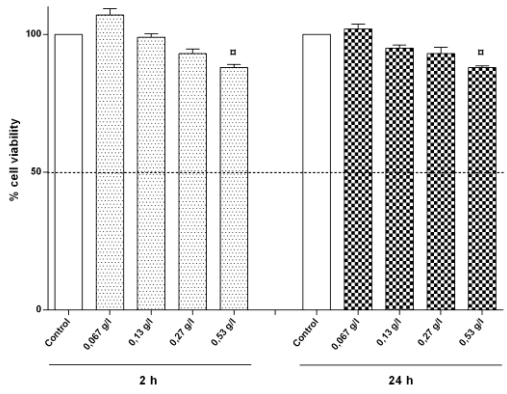
Results of the oral bioaccessibility testing indicate that a large proportion of the total Cu, Al, Cr, Sb, Sn, and Mo content in the indoor dust were not in bioaccessible forms, and are therefore unavailable to the residents. Moreover, such low BAF values (< 30%) suggested that, in the dust, these PHEs were associated to resistant mineral phases that were hardly dissolved by the acidic solutions used in the gastric phase of the UBM protocol. In a previous study on these indoor dusts that aimed at identifying likely environmental sources, Reis et al. (2015) suggested that Cu was probably related to waste materials of the CCE (Reis et al., 2015).

An overall analysis of the results obtained so far showed that the total concentrations of the studied PHEs were not elevated, although Zn, Pb and Cu dust contents were above the ones reported in the literature (Table 1). While major fractions of Cu dust content were not available for absorption in the digestive system, Zn was quite bioaccessible (Table 2). The biogeochemistry of Cd was also of notice, despite the low levels determined in the house dust samples (Table 1); on average 76% of the total Cd content in the house dust was available for absorption by the body (Table 2). Cd is currently ranked seventh on the Priority List of Hazardous Substances by the Agency for Toxic Substances and Diseases Registry (ATSDR 2013), who has derived a Minimum Risk Level (MRL) of 0.1 µg/kg/day for chronic duration oral exposure (≥ 1 year). It accumulates in the body and oral exposure to low levels of Cd over a long period of time can damage the kidneys.

Regardless the average PHEs levels in the house dust samples, investigation on the genotoxic potential of their bioaccessible fractions seemed important.

3.3 *In vitro* cytotoxicity

The "Child-Specific Exposure Factors Handbook" estimated that indoor dust ingestion rate among young children was about 60 mg/day, although these quantities would add up in case of geophagy or soil pica (U.S. Environmental Protection Agency, 2008). Because the average gastric volume of young children is about 500 ml and the ingestion rate of indoor dust was set at 60 mg/day giving thus an average concentration of 0.12 g/l ingested dust per day, the *in vitro* cytotoxicity of bioaccessible PHEs was assessed on AGS cells by using similar concentrations ranging from 0.067 g/l to 0.53 g/l (Fig.2). AGS cells were chosen as a relevant model for bioaccessibles PHEs, contained in gastric extracts, exposure; in addition, AGS cells were previously used to assay *in vitro* cytotoxicity and genotoxicity (alkaline comet and CBMN assays) (Alam-Escamilla et al., 2015; Koga et al., 2011).



Mean ± SEM values % cell viability of three independent experiments were determined. Statistical analysis versus the negative control was performed by one-way ANOVA: ¤ $p < 0.05$.

Fig. 2 Viability of AGS cells exposed for 2 h and 24 h to the

gastric extracts.

Except for the highest tested concentration (0.53 g/l), the percentage of AGS cells viability was not statistically different from the negative control after 2 and 24 h exposure to the gastric extracts, and it always remained above 80%.

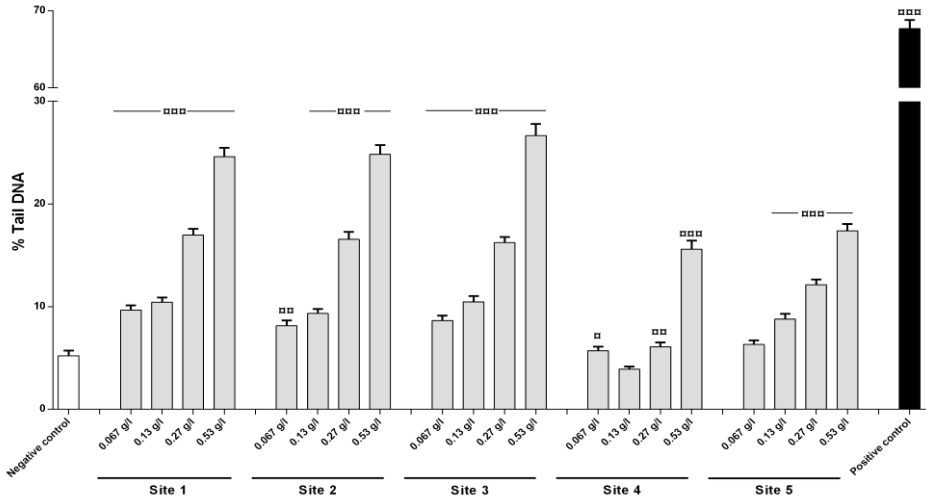
These results showed that the chosen concentrations were not cytotoxic and they could be used for the analysis of the genotoxic potential, as recommended by the OECD test guidelines (OECD, 2014b).

3.4 *In vitro* genotoxicity of gastric extracts from house dust

The *in vitro* genotoxicity of the gastric extracts was assessed in AGS cells using two complementary tests, namely the alkaline comet assay and the cytokinesis-block micronucleus (CBMN) in combination with centromere labeling assay.

3.4.1 Alkaline comet assay

DNA integrity of AGS cells exposed to the gastric extracts (0.067 – 0.13 – 0.27 – 0.53 g/l) was evaluated at molecular level by the alkaline comet assay (Fig. 3), which allowed us to perform a quantification of single- and double- strand breaks, as well as alkali-labile and abasic sites formation (Collins et al., 2008).



Mean ± SEM % tail DNA of three independent experiments were determined. Statistical analysis versus the negative control was performed by one-way ANOVA: ¤ $p < 0.05$, ¤¤ $p < 0.01$, ¤¤¤ $p < 0.001$.

Fig. 3 Primary DNA damage investigated by alkaline comet assay in AGS cells exposed for 2 h to gastric extracts.

A dose-dependent increase in the tail DNA content (% tail DNA) was observed after 2 h exposure to the gastric extracts from all sites with the exception of site 4, for which no significant induction of primary DNA lesions was noted at 0.13 g/l. Gastric extracts obtained from indoor dust of sites 1, 2 and 3 induced more severe primary DNA damage: following 2 h exposure at 0.53 g/l, a 4.7-fold, 4.8-fold and 5.1-fold increase in DNA damage were observed, respectively. When AGS cells were exposed for 2 h to 0.53 g/l gastric extracts obtained

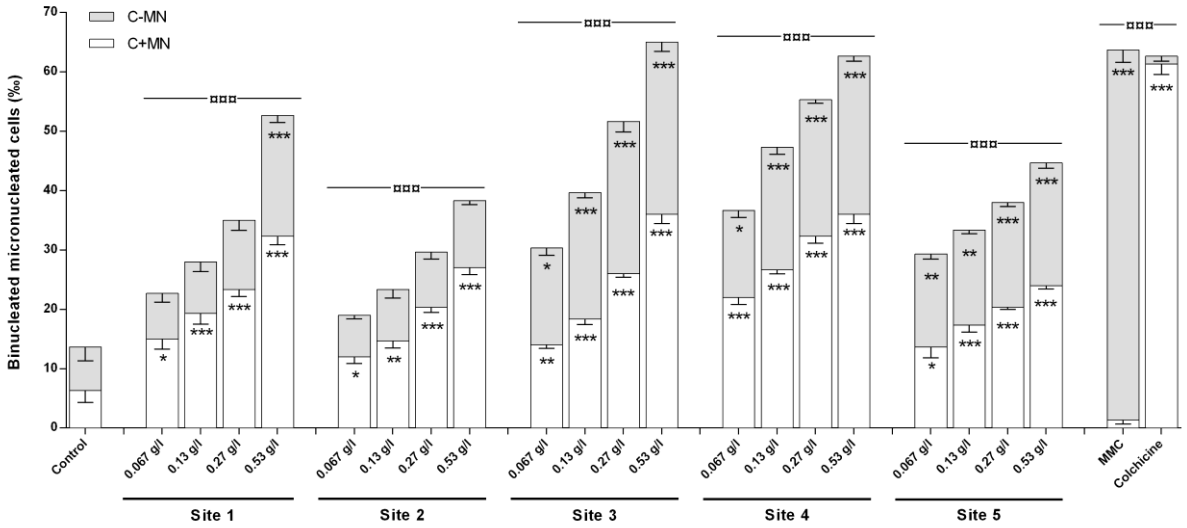
from indoor dust of sites 4 and 5, lower (3.0-fold and 3.3-fold, respectively) but still highly significant ($p < 0.001$) primary DNA damage were noted.

The lowest tested concentration (0.067 g/l) induced a highly significantly ($p < 0.001$) increase in primary DNA damage compared to negative control for sites 1 and 3, that for sites 2 and 4 was less significant ($p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively), while not-significant DNA lesions were quantified for site 5 at 0.067g/l. A significant increase ($p < 0.01$) relative to the negative control was observed for 0.27 g/l for site 4 and, for the same site, the only important induction in DNA damage was measured at 0.53 g/l.

Hereafter, the experimental data show that all gastric extracts induced primary DNA lesions although the ones corresponding to sites 1, 2 and 3 induced more severe DNA damage compared to those of sites 4 and 5.

3.4.2 Cytokinesis-block micronucleus assay (CBMN) in combination with centromere labeling

DNA integrity was evaluated at chromosomal level by the CBMN assay (Fig. 4), an *in vitro* test that determines the frequency of micronuclei formation in exposed AGS cells and in combination with centromere labeling allows the discrimination between direct and indirect chromosome damage.



Frequency of binucleated micronucleated cells, mean ± SEM of C-MN and C+MN of three independent experiments were determined. Statistical analysis versus the negative control was performed by one-way ANOVA: ¤¤¤ $p < 0.001$ for BNMN, and by two-way ANOVA: *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$ for C-MN and C+MN.

Fig. 4 Chromosome losses and breakages evidenced with CBMN in combination with centromere labeling in AGS cells exposed for 24 h to the gastric extracts.

The frequency of binucleated micronucleated (BNMN) AGS cells per 1000 binucleated cells increased in a dose-dependent manner ($p < 0.001$) after 24 h exposure, in all site samples. Gastric extracts corresponding to sites 3 and 4 induced more chromosome damage than sites 1, 2 and 5. At the highest tested concentration (0.53 g/l), for sites 3 and 4, a 4.3-fold increase in chromosome brakeage was observed after 24 h exposure, while the

frequency of binucleated micronucleated cells only increased up to 3.5-fold, 2.6-fold and 3.0-fold for sites 1, 2, and 5, respectively.

We further analyzed whether the bioaccessible fraction of the studied PHEs induced the formation of centromere positive (C+MN) or centromere negative micronuclei (C-MN) in AGS cells. Results showed that all gastric extracts induced dose-dependent increases of C+MN in binucleated AGS cells after 24 h, indicating an induction of aneugenic events such as chromosome migration abnormalities leading to chromosome losses. The gastric extract from site 4 was significantly ($p < 0.001$) the most aneugenic in AGS cells.

Gastric extracts obtained from indoor dust induced dose-dependent C-MN increases in binucleated AGS cells after 24 h exposure, indicating that clastogenic events (chromosome breakage, resulting of a partial chromosome loss) occurred. For sites 1, except for the highest concentration (0.53 g/l), and 2 no significant induction of C-MN was observed. The lowest concentration (0.067 g/l) was significantly different from the negative control for sites 3 and 4 ($p < 0.05$), as well as for site 5 ($p < 0.01$). A statistically significant ($p < 0.01$) induction of C-MN compared to the negative control was detected at 0.13 g/l for site 5. The gastric extract from site 3 was significantly ($p < 0.001$) the most clastogenic in AGS cells.

These results indicate that the gastric extracts obtained from indoor dust of sites 3 and 4 induced more severe dose-dependent chromosome damage than the ones from sites 1, 2 and 5. The extracts from sites 3 and 4 were responsible for the most severe clastogenic and aneugenic effects, respectively. Finally we observed that the gastric extracts from sites 3, 4 and 5 were efficient to induce chromosome breakages (C-MN) as well as chromosome losses (C+MN); conversely the gastric extracts from sites 1 and 2 induced mostly chromosome losses.

3.4.3 Multivariate analysis

Principal components analysis (PCA) was performed to unravel possible relationships between bioaccessible PHEs in gastric extracts and their genotoxicity, in terms of chromosome damage (Fig.5). The data matrix used to carry out the PCA was composed by the bioaccessible fraction of the 16 PHEs under study, in all sampled sites; in addition, C+MN, C-MN and BNMN were projected as supplementary variables. The two first components, PC1 and PC2, accounted for approximately 72% of the total variance of the dataset and were therefore selected to investigate geometrical relationships between the variables of interest.

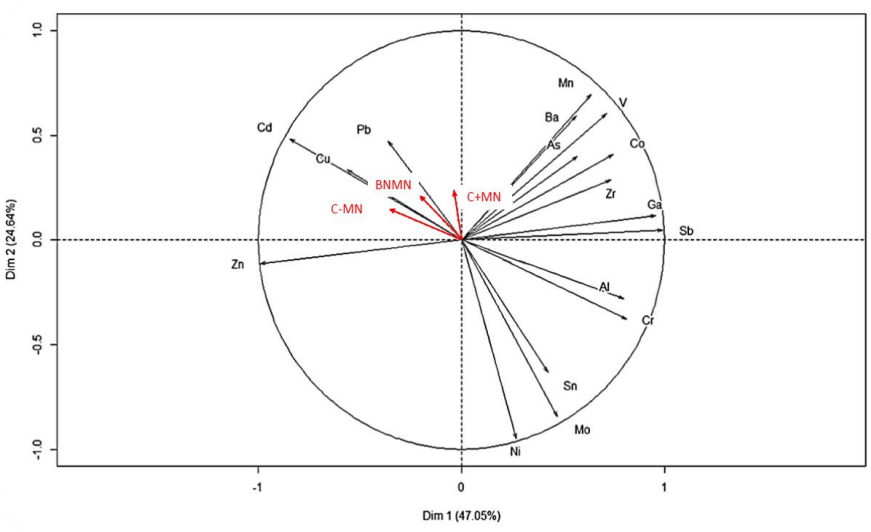


Fig. 5 Projections of the variables (PHEs) in the first factorial plane (PC1/PC2) of PCA analysis carried out for bioaccessible PHEs in gastric extracts of the five sites.

The results showed that the chromosome damage (BNMN, C+MN and C-MN) were associated to a PHEs cluster composed by Cd-Cu-Pb, and Zn to a certain extent (Fig.5). Other clusters in the factorial plane were composed by Ga-Sb, and Zr-Co-As-V-Ba-Mn, which were not related with chromosome damage. However, the diametric opposite projection of Al-Cr relative to Cd-Cu; and Ni-Mo-Sn relative to Pb suggested that these elements were negatively correlated and, therefore, had a likely inverse relationship with chromosome damage.

Spearman's correlation coefficients (*r*) were calculated between chromosome damage (C+MN, C-MN and BNMN) and PHEs concentrations in the gastric extracts to better support the interpretation of PCA results (Table 3).

	BNMN		**C+MN**		**C-MN**	
	r	**p-value**	**r**	**p-value**	**r**	**p-value**
Al	-0,14	2,71E-01	-0,14	2,99E-01	-0,13	3,16E-01
Zn	0,18	1,77E-01	0,00	9,84E-01	***0,34***	***7,07E-03***
Cu	-0,20	1,27E-01	-0,12	3,73E-01	-0,26	4,63E-02
Pb	***0,55***	***4,67E-06***	***0,32***	***1,23E-02***	***0,72***	***8,63E-11***
Mn	-0,17	1,98E-01	0,02	8,70E-01	-0,35	6,33E-03
Ba	-0,27	3,72E-02	-0,03	8,27E-01	-0,49	7,15E-05
Ni	-0,28	3,29E-02	-0,28	2,91E-02	-0,23	7,93E-02
Cr	-0,50	5,01E-05	-0,31	1,47E-02	-0,62	9,77E-08
Sn	-0,15	2,64E-01	0,01	9,54E-01	-0,29	2,41E-02
V	0,18	1,73E-01	***0,28***	***3,01E-02***	0,04	7,50E-01
As	0,05	7,31E-01	-1,74E-03	9,89E-01	0,09	4,97E-01
Co	-0,35	6,20E-03	-0,10	4,25E-01	-0,56	3,05E-06
Sb	-0,20	1,28E-01	-0,01	9,56E-01	-0,38	3,06E-03
Mo	-0,42	8,36E-04	-0,33	1,08E-02	-0,46	2,35E-04
Ga	-0,09	5,07E-01	0,01	9,33E-01	-0,18	1,68E-01
Cd	0,14	2,85E-01	0,05	6,98E-01	0,22	9,78E-02

r: Spearman's correlation coefficient. ***Bold and italic***: positive and significant (from p < 0.05) correlation.

Table 3 Spearman's correlation coefficient and p values between chromosome damage and bioaccessible PHEs concentrations.

Pb showed significant (from $p < 0.05$) correlations with all chromosome damage BNMN ($r = 0.55$), C+MN ($r = 0.32$) and C-MN ($r = 0.72$) induced by gastric extracts in AGS cells. The induction of aneugenic events (C+MN) was also significantly ($p < 0.05$) correlated with V ($r = 0.28$). Finally, Zn also induced significant ($p < 0.01$) clastogenic events ($r = 0.34$) in AGS cells. In addition significant (from $p < 0.05$) negative correlations were highlighted between PHEs and chromosome damage: (1) BNMN induction with Ba, Ni, Cr and Co ($r = -0.27$, $r = -0.28$, $r = -0.50$ and $r = -0.35$, respectively); (2) C+MN induction with Ni, Cr and Mo ($r = -0.28$, $r = -0.31$ and $r = -$

0.33, respectively); and (3) C-MN induction with Cu, Mn, Ba, Cr, Co, Sb and Mo (r = -0.26, r = -0.35, r = -0.49, r = -0.62, r = -0.56, r = -0.38 and r = -0.46, respectively).

The joint interpretation of the results produced by the statistical tools used to investigate relationships between PHEs and genotoxic effects allows further detailing the effects detected in AGS cells exposed to the gastric extracts. Whilst, in Figure 5 Cu and Cd were projected associated with BNMN, C+MN and C-MN inductions, the correlation coefficients were not statistically significant (Table 3). Thus, Pb came forth as the PHE likely to be directly related with the observed chromosome damage. Pb-induced clastogenic events seem to be prevalent over aneugenic events such as chromosome migration abnormalities leading to chromosome losses. Both PCA and Spearman's correlation highlighted a weak positive influence of V on C+MN induction and of Zn on C-MN induction in AGS cells. Finally the combination of the two methods shows few negative correlations: (1) BNMN induction with Ni and Cr; (2) C+MN induction with Ni, Mo, and Cr to a certain extend; and (3) C-MN induction with Cr, and Sb to a certain extend.

4. Discussion

Indoor settled dust is a mixture of displaced soil particles, outside airborne particles transferred either by wind, pets or shoes, and particles produced directly in the indoor environment (Glorennec et al., 2012). Hence, the chemical composition of indoor dust particles is influenced by both indoor and outdoor sources, which may partially explain the higher PHE contents usually found in indoor dust relative to exterior soil (Rasmussen et al 2001; Reis et al., 2015). Thereupon, improvement of residential exposure assessments is achieved by dividing soil ingestion into separate categories for indoor house dust and exterior soil. In this study, exposure of AGS cells to the UBM gastric extracts aimed at testing a novel methodology for human exposure assessment studies while evaluating the importance of incorporating the bioaccessible fraction (as a proxy of bioavailability) in risk assessment studies. Utilizing this measure of exposure may be of uppermost importance, especially when the total PHEs contents in the environmental media are close to the established regulatory screening values.

The cytotoxicity and genotoxicity assays of the gastric fractions extracted from indoor dust were carried out in AGS cells. To avoid non-specific DNA fragmentation by apoptosis under severe cytotoxic conditions, AGS cells were treated with gastric extracts concentrations inducing less than 20% of cellular death. The genotoxicity was assessed with two complementary tests. The alkaline comet assay enabled the detection of single- and double-strand breaks directly produced or associated with incomplete excision repair, as well as alkali-labile sites (Collins et al., 2008; Karlsson et al., 2015). While, the CBMN assay with centromeric labeling (CREST antibodies) was suitable to determine *in vitro* chromosomal damage and to distinguish between clastogenic (chromosomal breaks) and aneugenic (disruption of the mitotic apparatus) effects. The data presented showed that the five tested extracts had dose-dependent genotoxic properties *in vitro*.

In the five samples selected to this exploratory study, PHEs dust contents were not elevated, although Zn, Pb and Cu concentrations were above the ones reported in some recent studies (Table 1). However, the average bioaccessible fraction of Cu in the indoor dust samples under study was 27% (Table 2), which decreased the potential health risk posed by the element to the residents. Notably, the geometrical relationships between the

PHEs of concern and the damages induced on AGS cells displayed in the PCA loadings plot suggested that chromosome damage (BNMN, C+MN and C-MN) were associated to Cd, Cu, Pb, and Zn to a certain extent (Fig.5). Whilst Cu was primarily not in bioaccessible forms and Cd contents were weak, Pb came forth as potential inducer of clastogenic effects (C-MN), aneugenic effects (C+MN) and global chromosome damage (BNMN). To a certain extent, chromosome damage seemed to be influenced by V and Zn concentrations in the extracts for aneugenic and clastogenic effects, respectively.

The alkaline comet assay results indicated that the gastric extracts obtained from sites 1, 2 and 3 induced the most severe primary DNA damage, meaning that these samples affected more severely the DNA integrity of AGS cells. Sites 1, 2 and 3 presented the highest Cu concentrations in the gastric extracts, while no other PHE showed the highest concentrations in these three extracts. Whilst dust Cu concentrations were elevated (Table 1) only a 27% fraction was on average solubilized by the gastric fluids, the results achieved indicated that the bioaccessible Cu concentrations (Table 2) were likely related to primary DNA damage. It is well established in the literature that some PHEs, namely Cu, may directly damage lipids, proteins, and DNA due to their capacity to generate hydroxyl radicals, ROS production and DNA damage increased concomitantly (Delfino et al., 2011), which further supports the likely genotoxic potential suggested by our results. In these three sites (1, 2 and 3) the range of total Cu concentrations (303-407 mg/kg) was close or below the soil screening values for potentially unacceptable risk (residential soil use) provided by some EU countries (Carlon 2007).

The CBMN assay results showed that the gastric extracts obtained from sites 3 and 4 induced the highest global chromosome damage (aneugenic and clastogenic effects) in AGS cells. Besides sites 3 and 4, the gastric extract from site 5 was also efficient to induce chromosome breakages (C-MN). These three house dust samples were the ones having the highest total and bioaccessible concentrations of Pb. According to the literature, Pb is able to induce either clastogenic or aneugenic effects, suggesting a potential health risk in populations exposed to this PHE (Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 2007; García-Lestón et al., 2010). Gastric extract from site 3, with the highest Zn concentrations, showed the most severe clastogenic effects, while the extracts from site 4, with the highest V concentrations, presented the most severe aneugenic effects. These results were also in accordance with the literature and the multivariate analysis results. V is found in different oxidation states, the most common being vanadium pentoxide is known to induce aneugenic events (Zhong et al., 1994). Concerning Zn exposure, even if at low concentrations this PHE acts as a protector of genome stability, at concentrations higher than physiologic ones, weak clastogenic effects were reported (Roney et al., 2006).

From all the above, and as a first attempt to untangle the effects on AGS cells of exposure to a chemical mixture (represented by the UBM gastric extracts) several interrelations have to be highlighted. Cu was probably the prevalent PHE inducing primary DNA damage, while Pb was the most prevalent PHE inducing chromosome-damaging effects. Whilst methodology development is the main purpose of this study, the results achieved are relevant to human health risk assessment considerations, as clastogenic compounds are clearly associated with increased risk of carcinogenesis. Additionally, as a single mutation is still considered to be able to give rise to a clonal expansion and to a tumor, no threshold value can be established for direct DNA

damaging agents. Preventive strategies and further investigations (i.e. inflammation, oxidative stress and DNA repair) should first be considered in such situations.

5. Conclusions

The pilot study described in this article proposes an interdisciplinary approach integrating environmental and health data derived from indoor dust samples collected from households of Estarreja. This study did not envisaged achieving further information on the diagnosis, spreading or prevention of disease in the studied area.

The association of alkaline comet and CBMN assays proved to be effective tools to investigate cellular and chromosomal alterations induced by bioaccessible PHEs in environmental samples. In fact, our study restates the necessity of combining different methods when evaluating mixture's genotoxicity, as genotoxicity involve both direct and indirect mechanisms and various endpoints. Moreover, the method associating CBMN assay and CREST anti-kinetochore antibody labeling for centromere detection allowed us to reveal the mechanism of action (clastogenic or aneugenic) of bioaccessible PHEs. The combined interpretation of the bioaccessible data and genotoxicity results is well complemented by the association of two statistical methods (geometric: PCA and analytic: Spearman's correlations) that turned out to be decisive to understand the role and action mechanisms of the bioaccessible PHEs in a human cell model.

The option of selecting house dust samples with PHEs concentrations in the range of the current EU soil screening values for potentially unacceptable risk, unraveled the potential of this methodology to provide further information that can be used for science-based decision-making in regulatory policies, such as deriving soil screening values that are currently lacking in Portugal. This methodology could be used for a large-scale study with numerous sampling sites that might enable to correlate indoor dust PHEs concentrations with household attributes and exterior contribution. The statistically significant responses between sites characteristics, PHEs concentrations, bioaccessibility and genotoxicity could provide information on PHEs sources, as well as a better estimation of human exposure and associated health risks. Also, concerning the chemical characterization, nitro and oxidized PAHs concentrations should be determined as well as metals' speciation to obtain a finer characterization.

It is our aim to further develop this methodology to be used in broader studies, encompassing larger areas and comprehensive datasets, to correlate indoor dust PHEs concentrations with the physical environment of the house, as well as with exterior anthropogenic contributions. Establishing links between site characteristics, PHEs concentrations and their speciation, bioaccessibility and genotoxicity is likely to provide an accurate characterization of sources, pathways and fate of environmental PHEs, enabling more effective assessment of human exposure and associated health risks. This investigation must also be extended to other environmental contaminants, such as nitro and oxidized PAHs.

Acknowledgments

Funding for this research were provided by the Labex DRIIHM, Réseau des Observatoires Hommes – Millieux – Centre National de la Recherche Scientifique (ROHM–CNRS) and ECCOREV.

The authors want to express their gratitude to J. Pompili for her technical help, K. Sallah for his statistical analysis performed, as well as C. Uboldi for her precious help to write this article.

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 2007. Toxicological profile for lead.

Anetor, J.I., Wanibuchi, H., Fukushima, S., 2007. Arsenic exposure and its health effects and risk of cancer in developing countries: micronutrients as host defence. Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP 8, 13–23.

Aung, N.N., Yoshinaga, J., Takahashi, J., 2004. Exposure assessment of lead among Japanese children. Environ. Health Prev. Med. 9, 257–261. doi:10.1007/BF02898139

Benameur, L., Orsière, T., Rose, J., Botta, A., 2011. Detection of environmental clastogens and aneugens in human fibroblasts by cytokinesis-blocked micronucleus assay associated with immunofluorescent staining of CENP-A in micronuclei. Chemosphere 84, 676–680. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.03.027

Carlon, C. (Ed.) (2007). Derivation methods of soil screening values in Europe. A review and evaluation of national procedures towards harmonization. European Commission, Joint Research Centre, Ispra, EUR 22805-EN, 306 pp.

Chang, L., Magos, L., Suzuki, T., eds, 1996. Toxicology of metals.

Chattopadhyay, G., Lin, K.C.-P., Feitz, A.J., 2003. Household dust metal levels in the Sydney metropolitan area. Environ. Res. 93, 301–307. doi:10.1016/S0013-9351(03)00058-6

Chen, H., Lu, X., Li, L.Y., 2014. Spatial distribution and risk assessment of metals in dust based on samples from nursery and primary schools of Xi'an, China. Atmos. Environ. 88, 172–182. doi:10.1016/j.atmosenv.2014.01.054

Collins, A.R., Duthie, S.J., Dobson, V.L., 1993. Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. Carcinogenesis 14, 1733–1735.

Collins, A.R., Oscoz, A.A., Brunborg, G., Gaivão, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C.C., Štětina, R., 2008. The comet assay: topical issues. Mutagenesis 23, 143–151. doi:10.1093/mutage/gem051

Davis, S., Mirick, D.K., 2006. Soil ingestion in children and adults in the same family. J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol. 16, 63–75.

De Boeck, M., Kirsch-Volders, M., Lison, D., 2003. Cobalt and antimony: genotoxicity and carcinogenicity. Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen., Metals and Human Cancer 533, 135–152. doi:10.1016/j.mrfmmm.2003.07.012

Delfino, R.J., Staimer, N., Vaziri, N.D., 2011. Air pollution and circulating biomarkers of oxidative stress. Air Qual. Atmosphere Health 4, 37–52. doi:10.1007/s11869-010-0095-2

Denys, S., Caboche, J., Tack, K., Rychen, G., Wragg, J., Cave, M., Jondreville, C., Feidt, C., 2012. In vivo validation of the unified BARGE method to assess the bioaccessibility of arsenic, antimony, cadmium, and lead in soils. Environ. Sci. Technol. 46, 6252–6260. doi:10.1021/es3006942

Denys, S., Tack, K., Caboche, J., Delalain, P., 2009. Bioaccessibility, solid phase distribution, and speciation of Sb in soils and in digestive fluids. Chemosphere 74, 711–716. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.09.088

Deschamps, E., Weidler, P.G., Friedrich, F., Weiss, C., Diabaté, S., 2013. Characterization of indoor dust from Brazil and evaluation of the cytotoxicity in A549 lung cells. Environ. Geochem. Health 36, 225–233. doi:10.1007/s10653-013-9560-9

Fenech, M., 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. Nat. Protoc. 2, 1084–1104. doi:10.1038/nprot.2007.77

García-Lestón, J., Méndez, J., Pásaro, E., Laffon, B., 2010. Genotoxic effects of lead: An updated review. Environ. Int. 36, 623–636. doi:10.1016/j.envint.2010.04.011

Gebel, T., 1997. Arsenic and antimony: comparative approach on mechanistic toxicology. Chem. Biol. Interact. 107, 131–144. doi:10.1016/S0009-2797(97)00087-2

Glorennec, P., Lucas, J.-P., Mandin, C., Le Bot, B., 2012. French children's exposure to metals via ingestion of indoor dust, outdoor playground dust and soil: Contamination data. Environ. Int. 45, 129–134. doi:10.1016/j.envint.2012.04.010

González, N.V., Nikoloff, N., Soloneski, S., Larramendy, M.L., 2011. A combination of the cytokinesis-block micronucleus cytome assay and centromeric identification for evaluation of the genotoxicity of dicamba. Toxicol. Lett. 207, 204–212. doi:10.1016/j.toxlet.2011.09.013

Granero, S., Domingo, J.L., 2002. Levels of metals in soils of Alcalá de Henares, Spain: Human health risks. Environ. Int. 28, 159–164. doi:10.1016/S0160-4120(02)00024-7

Gron, C., Andersen, L., 2003. Human Bioaccessibility of HeavyMetals and PAH from Soil. Danish Environmental Protection Agency (Environmental Project No. 840).

Iarmarcovai, G., Botta, A., Orsière, T., 2006. Number of centromeric signals in micronuclei and mechanisms of aneuploidy. Toxicol. Lett. 166, 1–10. doi:10.1016/j.toxlet.2006.05.015

Ibanez, Y., Le Bot, B., Glorennec, P., 2010. House-dust metal content and bioaccessibility: A review. Eur. J. Mineral. 22, 629–637. doi:10.1127/0935-1221/2010/0022-2010

Jolliffe, I., 2014. Principal Component Analysis, in: Wiley StatsRef: Statistics Reference Online. John Wiley & Sons, Ltd.

Kang, Y., Cheung, K.C., Wong, M.H., 2011. Mutagenicity, genotoxicity and carcinogenic risk assessment of indoor dust from three major cities around the Pearl River Delta. Environ. Int. 37, 637–643. doi:10.1016/j.envint.2011.01.001

Kang, Y., Yin, Y., Man, Y., Li, L., Zhang, Q., Zeng, L., Luo, J., Wong, M.H., 2013. Bioaccessibility of polychlorinated biphenyls in workplace dust and its implication for risk assessment. Chemosphere 93, 924–930. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.05.057

Karlsson, H.L., Di Bucchianico, S., Collins, A.R., Dusinska, M., 2015. Can the comet assay be used reliably to detect nanoparticle-induced genotoxicity? Environ. Mol. Mutagen. 56, 82–96. doi:10.1002/em.21933

Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surrallés, J., Vanhauwaert, A., Wakata, A., 2003. Report from the in vitro micronucleus assay working group. Mutat. Res. 540, 153–163.

Kurt-Karakus, P.B., 2012. Determination of heavy metals in indoor dust from Istanbul, Turkey: Estimation of the health risk. Environ. Int. 50, 47–55. doi:10.1016/j.envint.2012.09.011

Lee, J.-C., Son, Y.-O., Pratheeshkumar, P., Shi, X., 2012. Oxidative stress and metal carcinogenesis. Free Radic. Biol. Med. 53, 742–757. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.06.002

Lin, Y., Fang, F., Wang, F., Xu, M., 2015. Pollution distribution and health risk assessment of heavy metals in indoor dust in Anhui rural, China. Environ. Monit. Assess. 187, 4763. doi:10.1007/s10661-015-4763-4

Lisiewicz, M., Heimburger, R., Golimowski, J., 2000. Granulometry and the content of toxic and potentially toxic elements in vacuum-cleaner collected, indoor dusts of the city of Warsaw. Sci. Total Environ. 263, 69–78. doi:10.1016/S0048-9697(00)00667-7

Maertens, R.M., Yang, X., Zhu, J., Gagne, R.W., Douglas, G.R., White, P.A., 2008. Mutagenic and Carcinogenic Hazards of Settled House Dust I: Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Content and Excess Lifetime Cancer Risk from Preschool Exposure. Environ. Sci. Technol. 42, 1747–1753. doi:10.1021/es702449c

Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P.V., Decordier, I., Kirsch-Volders, M., 2006. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. Biochimie, Facets of Environmental Nuclear Toxicology 88, 1515–1531. doi:10.1016/j.biochi.2006.07.004

Mohmand, J., Eqani, S.A.M.A.S., Fasola, M., Alamdar, A., Mustafa, I., Ali, N., Liu, L., Peng, S., Shen, H., 2015. Human exposure to toxic metals via contaminated dust: Bio-accumulation trends and their potential risk estimation. Chemosphere 132, 142–151. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.03.004

Natarajan, A.T., Boei, J.J., Darroudi, F., Van Diemen, P.C., Dulout, F., Hande, M.P., Ramalho, A.T., 1996. Current cytogenetic methods for detecting exposure and effects of mutagens and carcinogens. Environ. Health Perspect. 104, 445–448.

Niu, J., Rasmussen, P.E., Hassan, N.M., Vincent, R., 2010. Concentration Distribution and Bioaccessibility of Trace Elements in Nano and Fine Urban Airborne Particulate Matter: Influence of Particle Size. Water. Air. Soil Pollut. 213, 211–225. doi:10.1007/s11270-010-0379-z

OECD, 2014. Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing.

Oomen, A., Hack, A., Minekus, M., Zeijdner, E., Cornelis, C., Schoeters, G., Verstraete, W., Van de Wiele, T., Wragg, J., Rompelberg, C., Sips, A., Van Wijnen, J., 2002. Comparison of five in vitro digestion models to study the bioaccessibility of soil contaminants. Environ. Sci. Technol. 36, 3326–3334.

Patinha, C., Reis, A.P., Dias, A.C., Abduljelil, A.A., Noack, Y., Robert, S., Cave, M., Silva, E.F. da, 2014. The mobility and human oral bioaccessibility of Zn and Pb in urban dusts of Estarreja (N Portugal). Environ. Geochem. Health 37, 115–131. doi:10.1007/s10653-014-9634-3

Pohren, R. de S., Rocha, J.A.V., Leal, K.A., Vargas, V.M.F., 2012. Soil mutagenicity as a strategy to evaluate environmental and health risks in a contaminated area. Environ. Int. 44, 40–52. doi:10.1016/j.envint.2012.01.008

Rasmussen, P., 2004. Can metal concentrations in indoor dust be predicted from soil geochemistry? Can. J. Anal. Sci. Spectrosc. 49, 166–174.

Rasmussen, P.E., Levesque, C., Chénier, M., Gardner, H.D., Jones-Otazo, H., Petrovic, S., 2013. Canadian House Dust Study: Population-based concentrations, loads and loading rates of arsenic, cadmium, chromium, copper, nickel, lead, and zinc inside urban homes. Sci. Total Environ. 443, 520–529. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.11.003

Rasmussen, P.E., Subramanian, K.S., Jessiman, B.J., 2001. A multi-element profile of house dust in relation to exterior dust and soils in the city of Ottawa, Canada. Sci. Total Environ. 267, 125–140. doi:10.1016/S0048-9697(00)00775-0

Reis, A.P., Costa, S., Santos, I., Patinha, C., Noack, Y., Wragg, J., Cave, M., Sousa, A.J., 2015. Investigating relationships between biomarkers of exposure and environmental copper and manganese levels in house dusts from a Portuguese industrial city. Environ. Geochem. Health 1–20. doi:10.1007/s10653-015-9724-x

Reis, A.P., Patinha, C., Noack, Y., Robert, S., Dias, A.C., 2014. Assessing human exposure to aluminium, chromium and vanadium through outdoor dust ingestion in the Bassin Minier de Provence, France. Environ. Geochem. Health 36, 303–317. doi:10.1007/s10653-013-9564-5

Roney, N., Osierb, M., Paikoff, S.J., Smith, C.V., Williamsa, M., de Rosa, C.T., 2006. ATSDR evaluation of the health effects of zinc and relevance to public health. Toxicol. Ind. Health 22, 423–493.

Tchounwou, P.B., Yedjou, C.G., Patlolla, A.K., Sutton, D.J., 2012. Heavy metal toxicity and the environment. EXS 101, 133–164. doi:10.1007/978-3-7643-8340-4_6

Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. Environ. Mol. Mutagen. 35, 206–221.

Tulve, N.S., Suggs, J.C., McCurdy, T., Cohen Hubal, E.A., Moya, J., 2002. Frequency of mouthing behavior in young children. J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol. 12, 259–264.

Turner, A., Simmonds, L., 2006. Elemental concentrations and metal bioaccessibility in UK household dust. Sci. Total Environ. 371, 74–81. doi:10.1016/j.scitotenv.2006.08.011

U.S. Environmental Protection Agency, 2008. Child-Specific Exposure Factors Handbook (No. EPA/600/R-06/096F). National Center for Environmental Assessment.

U.S. Environmental Protection Agency, 2000. TRW RECOMMENDATIONS FOR SAMPLING AND ANALYSIS OF SOIL AT LEAD (Pb) SITES.

Wang, W., Wu, F.-Y., Huang, M.-J., Kang, Y., Cheung, K.C., Wong, M.H., 2013a. Size fraction effect on phthalate esters accumulation, bioaccessibility and in vitro cytotoxicity of indoor/outdoor dust, and risk assessment of human exposure. J. Hazard. Mater. 261, 753–762. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.04.039

Wang, W., Wu, F., Zheng, J., Wong, M.H., 2013b. Risk assessments of PAHs and Hg exposure via settled house dust and street dust, linking with their correlations in human hair. J. Hazard. Mater. 263, Part 2, 627–637. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.10.023

WHO, 1996. Trace elements in human nutrition and health (No. 532). World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Wragg, J., Cave, M., Basta, N., Brandon, E., Casteel, S., Denys, S., Gron, C., Oomen, A., Reimer, K., Tack, K., Van de Wiele, T., 2011. An inter-laboratory trial of the unified BARGE bioaccessibility method for arsenic, cadmium and lead in soil. Sci. Total Environ. 409, 4016–4030. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.05.019

Zhong, B.-Z., Gu, Z.-W., Wallace, W.E., Whong, W.-Z., Ong, T., 1994. Genotoxicity of vanadium pentoxide in Chinese hamster V79 cells. Mutat. Res. Toxicol. 321, 35–42. doi:10.1016/0165-1218(94)90118-X

2.2 Résultats et discussion

Les poussières intérieures sont un mélange de particules extérieures importées par le vent, les chaussures, les animaux, et de particules produites directement à l'intérieur (ex. émissions particulaires de tabac et de cuisine) (Glorennec et al., 2012). Les concentrations en EPTs et les risques sanitaires sont plus importants dans les poussières intérieures par rapport aux sols extérieurs (Ibanez et al., 2010; Niu et al., 2010; Rasmussen et al., 2001; Reis et al., 2015), en partie dû à la double provenance de ces particules.

Les concentrations médianes en Zn et en Cu étaient supérieures à celles documentées dans de récentes études (Chattopadhyay et al., 2003; Chen et al., 2014; Kurt-Karakus, 2012; Lisiewicz et al., 2000; Rasmussen et al., 2001), et la concentration médiane en Pb était équivalente à celle mesurée dans des maisons canadiennes (Rasmussen et al., 2001). L'étude de la bioaccessibilité des EPTs révèle d'importantes variations inter et intra-EPTs en fonction des sites de prélèvements : Zn et Cd ont des % de bioaccessibilité élevés (85 et 80%, respectivement), alors que d'autres EPTs (Cu, Cr, Sb, Sn, Mo et Al) sont sous des formes essentiellement non disponibles pour l'absorption.

La toxicité des extraits gastriques issus des poussières de sols a été étudiée en termes de cytotoxicité et de génotoxicité *in vitro* sur des cellules gastriques humaines (AGS). Les résultats de l'étude de cytotoxicité démontrent l'absence d'altération du métabolisme mitochondrial par les extraits gastriques après 2h et 24 h d'exposition des cellules AGS. Nous avons ainsi pu déterminer les concentrations à évaluer dans le cadre de l'étude des mécanismes physiopathologiques sous-jacents aux lésions primaires à l'ADN et aux dommages chromosomiques suite à l'ingestion de poussières de sols, à savoir 0,067 – 0,13 – 0,27 et 0,53 g/l. Ces concentrations en poussières de sols ont été choisies en tenant compte de plusieurs paramètres : la concentration finale de poussière dans les extraits gastriques (26,7 g/l) dans la méthode UBM, la quantité de poussière moyenne ingérée par les enfants en bas-âge admise par l'INVS (60 mg) ainsi que le volume gastrique moyen pour ces enfants (500 ml). Cette gamme de concentration nous permet d'approcher les concentrations pouvant être retrouvées quotidiennement dans l'estomac de ces enfants (environ 0,12 g/l).

Les résultats des études de génotoxicité *in vitro* réalisées à partir des extraits gastriques sur les cellules AGS sont présentés de façon synthétique dans le Tableau 8. En ce qui concerne la colonne correspondant au test des comètes, les concentrations notées sont les

concentrations les plus faibles à partir desquelles une réponse effet-dose est observée. Les colonnes intitulées « BNMN », « C+MN » et « C-MN » représentent, respectivement, les interprétations issues de la détermination des fréquences en cellules binucléées micronucléées, en évènements aneugènes et en évènements clastogènes. Une négativité dans une quelconque de ces colonnes est représentée en gris. Une positivité en BNMN est représentée en vert, en C+MN en jaune, et en C-MN en rouge.

Sites	Comètes	BNMN	C+MN	C-MN
1	0,067 g/l			
2	0,067 g/l			
3	0,067 g/l			
4	0,27 g/l			
5	0,13 g/l			

Tableau 8. Tableau récapitulatif des effets génotoxiques observés après exposition des cellules AGS aux extraits gastriques.

Des lésions primaires à l'ADN doses-dépendantes ont été observées sur les cellules AGS sur tous les sites. On peut noter que ces lésions apparaissent dès la plus faible concentration sur les sites 1, 2 et 3. Sur ces trois sites, les concentrations en Cu dans les extraits gastriques étaient les plus élevées, bien que seul 27% du Cu dans les poussières de sols ait été solubilisé dans les sucs gastriques. Les résultats obtenus tendent à montrer l'importance du Cu bioaccessible dans l'induction de dommages primaires à l'ADN. Le Cu est connu pour convertir le peroxyde d'hydrogène en radicaux hydroxyles *via* les réactions de Fenton et d'Haber-Weiss (Lee et al., 2012). Ces ERO, très réactives, endommagent les macromolécules cellulaires et peuvent causer des dommages à l'ADN doses-dépendants (Delfino et al., 2011), ce qui soutient nos observations.

Les résultats du test du micronoyau centromérique ont montrés que tous les extraits gastriques induisaient une augmentation des BNMN et des évènements aneugènes. Des évènements clastogènes ont été notés pour les sites 1, 3, 4 et 5. Cependant, sur le site 1 seule la concentration la plus élevée génère la positivité du résultat. Les trois échantillons présentant les plus fortes concentrations totales et bioaccessibles en Pb sont les sites 3, 4 et 5, ceux ayant engendrés des réponses clastogènes doses-dépendantes dès la plus faible

concentration testée (0,067 g/l). Selon la littérature, le Pb est capable d'induire indifféremment des dommages clastogènes et aneugènes, suggérant un risque sanitaire potentiel pour les populations exposées à cet EPT (Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 2007; García-Lestón et al., 2010). L'extrait gastrique du site 3 avec la plus forte concentration en Zn montre les plus importants effets clastogènes, alors que l'extrait du site 4 avec la plus forte concentration en V présentait les plus importants effets aneugènes. Ces observations sont en accord avec la littérature. En effet la forme la plus commune de V est le vanadium pentoxyde qui est connu pour ses effets aneugènes (Zhong et al., 1994) ; et le Zn à fortes concentrations induits de faibles effets clastogènes (Roney et al., 2006).

Finalement, nos observations concernant les relations entre les composés bioaccessibles et les dommages chromosomiques ont été corroborées par l'analyse statistique faite à l'aide de la PCA et des corrélations de Spearman. Les relations géométriques entre EPTs et les dommages chromosomiques induits sur les cellules AGS, présentées dans le graphique de PCA, suggèrent que les dommages chromosomiques (BNMN, C+MN et C-MN) étaient associés aux EPTs suivants : Cd, Cu et Pb, ainsi qu'au Zn dans une certaine mesure. Cependant les corrélations entre le Cu et le Cd et les dommages chromosomiques n'étaient pas significatives ; à l'inverse du Pb significativement et positivement corrélé aux BNMN, C+MN et C-MN et du Zn significativement et positivement corrélé au C-MN. De plus, le test de Spearman a montré une corrélation significativement positive entre le V et l'induction de C+MN, ce qui pourrait expliquer la position de la projection de la flèche C+MN sur le graphique de PCA. Par ailleurs, ces tests nous ont montré la présence d'EPTs significativement et négativement corrélés avec les dommages chromosomiques : (1) Ni et Cr avec l'induction de BNMN, (2) Ni, Mo, et Cr dans une certaine mesure avec l'induction de C+MN, (3) Cr, et Sb dans une certaine mesure avec l'induction de C-MN. Dans cette étude, le Cr apparait donc « protecteur » chromosomique vis-à-vis des extraits gastriques testés. Il est bien connu que la valence du chrome impacte considérablement ses propriétés toxicologiques.

2.3 Conclusion

L'étude pilote présentée dans notre article propose une nouvelle approche méthodologique pour évaluer l'impact des EPTs contenus dans les poussières de sols. Les maisons sélectionnées dans notre étude se situaient dans l'OHM-Estarreja. L'objectif de notre étude a consisté à tester la faisabilité d'une méthodologie associant bioaccessibilité et tests de génotoxicité *in vitro*. Les résultats de nos travaux, bien que situés au cœur de l'OMH Esterraja, territoire où les actions anthropiques sur l'environnement sont particulièrement bien documentées, ne contribuent ni à la connaissance des sources de contaminations des poussières de sols intérieures dans ce territoire, ni à fournir des informations l'étiologie de pathologies humaines dans cette zone. En effet, le nombre de site de prélèvement nous interdit toute interprétation de cette nature.

La génotoxicité *in vitro* a été investiguée à l'aide du test des comètes et du test du micronoyau. Ces deux tests sont considérés comme complémentaires, car ils s'intéressent à différents paramètres de génotoxicité : l'un aux les lésions primaires de l'ADN et l'autre aux dommages chromosomiques. De plus, l'association du test du micronoyau au marquage centromérique permet l'étude des mécanismes d'actions sous-jacents à l'exposition des cellules aux composés. Enfin, l'interprétation combinée des résultats de génotoxicité avec les données sur la bioaccessibilité des EPTs est complétée par l'emploi d'outils statistiques qui s'avèrent être un élément clé pour l'interprétation des données. Notons qu'il est très rare d'appliquer ce traitement statistique des données relatives aux propriétés génotoxiques d'un environnement.

Cette méthodologie pourrait être utilisée à plus grande échelle et confrontée aux connaissances en matière de génotoxicité afin d'en apprécier l'informativité. De nombreux sites d'échantillonnage pourraient permettre de corréler les concentrations en EPTs dans les poussières intérieures avec les caractéristiques des sites de prélèvement et d'estimer la part de la contribution extérieure. Des réponses statistiquement significatives entre les caractéristiques des sites, les concentrations en EPTs, la bioaccessibilité et la génotoxicité des EPTs dans les sucs gastriques pourraient fournir des informations importantes sur les sources émettrices d'EPTs, et permettre une meilleure estimation de l'exposition humaine et des risques sanitaires associés. De tels résultats générés dans le cadre de travaux sur l'OHM-Estarreja pourraient aider les politiques réglementaires en charge de la qualité des sols au Portugal à définir les concentrations maximales en EPTs dans les sols, seuils au-délà desquels des risques sanitaires ne pourraient être exclus.

III. Poussières de sols intérieurs et extérieurs provenant d'une école maternelle de Trets : caractérisation et génotoxicité de la fraction bioaccessible – Données préliminaires

3.1 Introduction

Cette étude porte sur des poussières de sols prélevées à l'intérieur et à l'extérieur de l'école maternelle Les Colombes à Trets. C'est un continuum entre caractérisation chimique des poussières, détermination de la bioaccessibilité des composés dans les fluides gastriques et étude de la génotoxicité potentielle de ces composés bioaccessibles. Ce travail s'inscrit dans la continuité des travaux précédemment décrits. En effet, le site de réalisation de cette étude sur l'exposition des enfants en bas-âge au sein de leur école, a été déterminé suite à l'étude des $PM_{2.5}$ dans l'OHM-BMP qui avait montré des résultats intéressants en termes de génotoxicité des particules atmosphériques sur le site de l'école Edmond Brun à Trets (Figure 26). De plus, la méthodologie utilisée est développée dans l'article sur les EPTs contenus dans les poussières de sols

3.2 Matériel et méthodes

La campagne de prélèvement s'est déroulée à l'école maternelle des Colombes à Trets. La Figure 26, la situe par rapport à l'école Edmond Brun où avaient eues lieu la collection de $PM_{2.5}$.



Figure 26. Carte de Trets avec l'école maternelle Les Colombes et l'école Edmond Brun situées en France.

Les prélèvements ont été réalisés en janvier-février 2015 dans deux salles de classe de petite section (élèves de 2,5 à 4 ans), le dortoir et dans la cour (Figure 17). Les prélèvements ont été réalisés à l'aide de pelles et de balayettes à usage unique (une pour chaque lieu de prélèvement), les poussières ainsi collectées ont été placées dans des boîtes en aluminium et conservées à l'abri de la lumière et de l'humidité. Les prélèvements des deux salles de classe ont été mélangés, les quantités récoltées n'étant pas suffisantes. Dans la cour, trois prélèvements ont eu lieu : un dans la cour proprement dite, un sur les jeux d'enfant et un troisième au pied d'un mur dégradé. Le prélèvement de la cour a été subdivisé en trois échantillons : < 50 µm, 50-100 µm et 100-250 µm, afin d'étudier l'impact éventuel de la granulométrie des poussières sur leur composition et leur potentiel génotoxique. Au total, sept prélèvements sont donc disponibles.

La caractérisation chimique des poussières est réalisée sur la composante minérale par ICP-MS et sur la composante organique par GC-MS. Une caractérisation de la composante minérale a également été réalisée sur les extraits gastriques, afin de déterminer les fractions bioaccessibles de chaque composé.

Les études de cytogénotoxicité ont été réalisées *in vitro* sur les cellules gastriques humaines (AGS). L'étude de la cytotoxicité a été étudiée par le test XTT puis la génotoxicité a été évaluée en termes de lésions primaires à l'ADN par le test des comètes et de dommages chromosomiques grâce au test du micronoyau avec marquage centromérique (cf. Matériel et méthodes et article sur les EPTs contenus dans les poussières intérieures). Etant donné que nous nous sommes intéressés au devenir des composés organiques (HAPs) dans les extraits gastriques et que ceux-ci nécessitent bien souvent une activation métabolique pour être réactifs vis-à-vis de l'ADN, nous allons également réaliser le test du micronoyau avec du S9 mix.

3.3 Résultats

Les résultats présentés sont des données préliminaires, dans le sens où certaines expériences sont en cours de réalisation à ce jour. Les résultats y sont discutés mais aucune conclusion ne peut être faite dans ce manuscrit de thèse.

3.3.1 Caractérisation chimique

Dans ce manuscrit, seules les données acquises sur les composés inorganiques sont présentées, les résultats concernant les composés organiques sont à ce jour en cours de traitement.

3.3.1.1 Composés inorganiques dans les poussières

Les concentrations (mg/kg) en composés inorganiques dans les poussières ont été mesurées par ICP-MS au CEREGE, selon une méthodologie décrite dans la partie Matériel et méthodes. La moyenne, l'erreur standard à la moyenne (SEM), la médiane, les valeurs minimale et maximale ont été calculées pour chaque élément inorganique analysé (Tableau 9).

Sites	Al	Fe	Ca	Na	As	Cr	Mn	Ni	Pb	V	Zn
1	2804	4421	56994	41242	2	18	105	34	13	7	383
2	2484	15600	49956	35418	4	22	129	26	45	7	484
3	5267	7122	52755	14589	67	63	179	54	19	12	281
5	6274	8872	69295	37213	5	25	189	13	73	18	623
7	2759	4803	78210	19565	2	13	157	6	9	9	289
Moyenne	3918	8164	61442	29605	16	28	152	27	32	11	412
SEM	775	2027	5339	5260	13	9	16	8	12	2	64
Médiane	2804	7122	56994	35418	4	22	157	26	19	9	383
Min	2484	4421	49956	14589	2	13	105	6	9	7	281
Max	6274	15600	78210	41242	67	63	189	54	73	18	623

Tableau 9. Concentration en composés inorganiques (mg/kg) dans les poussières de sols sur les sites de prélèvement dans l'école de Trets.

Les éléments majeurs présents sur les différents sites de prélèvement sont le Ca (médiane : 56994 mg/kg), le Na (médiane : 35418 mg/kg), l'Al (médiane : 2804 mg/kg) et le Fe (médiane : 7122 mg/kg), qui sont suivis par les éléments traces Zn, Mn, Ni, Cr, Pb, V, et As. D'importantes variations des concentrations en composés inorganiques ont été observées en fonction des sites, notamment pour les composés majeurs, ainsi que pour l'As (2-67 mg/kg), le Cr (13-63 mg/kg) et le Pb (9-73 mg/kg), reflétant une composition hétérogène des poussières intérieures et extérieures sur nos sites. Ces différences ne sont pas dues au caractère intérieur ou extérieur des poussières. L'importante variabilité de l'As est liée à sa valeur maximale mesurée sur le site 3, correspondant au prélèvement de poussières sur le terrain de jeu des enfants. Hors, il a précédemment été montré que les bois des jeux pour enfants sont traités avec des produits contenant de fortes concentrations en As, se retrouvant alors dans les terres et les poussières alentours (Button et al., 2009).

L'étude française menée par Glorennec et al., 2012 sur l'exposition d'enfants en bas-âge à des poussières prélevées sur des aires de jeux a montré des valeurs médianes supérieures en Mn (394 mg/kg), en Pb (27 mg/kg), en V (23 mg/kg) et en As (8 mg/kg), et des valeurs médianes égales en Cr (25 mg/kg) à celles mesurées à Trets. D'autre part, Reis et al., 2014 investiguant les poussières de sols dans des aires de jeux au sein de l'OHM-BMP a montré des valeurs médianes supérieures en Pb (42 mg/kg) et des valeurs médianes inférieures en Zn (217 mg/kg) à celles mesurées à Trets. Les poussières prélevées dans les maisons à Estarreja présentaient des valeurs médianes plus élevées pour la majorité des composés inorganiques, exception faite du Mn qui présente des valeurs similaires.

3.3.1.2 Composés inorganiques bioaccessibles dans les extraits gastriques

Les composés bioaccessibles ont été extraits par la méthode *in vitro* UBM mimant la dissolution des poussières dans les sucs gastriques. Les concentrations en composés inorganiques dans les extraits gastriques ont également été mesurées par ICP-MS à Estarreja. Ces deux méthodes ont été décrites dans la partie Matériel et méthodes. La moyenne, l'erreur standard à la moyenne (SEM), la médiane, les valeurs minimale et maximale ont été calculées pour chaque élément inorganique analysé (Tableau 10).

Sites	Al	Fe	Ca	Na	As	Cr	Mn	Ni	Pb	V	Zn
1	251	226	68855	40349	0,8	2	84	2	12	1,4	494
	9	***5***	***121***	***98***	***31***	***10***	***80***	***7***	***89***	***20***	***129***
2	372	448	71853	40102	1,4	4	82	2	21	1,9	647
	15	***3***	***144***	***113***	***38***	***18***	***64***	***9***	***46***	***27***	***134***
3	259	269	69965	13436	45	10	142	2	13	1,7	262
	5	***4***	***133***	***92***	***67***	***15***	***79***	***3***	***70***	***14***	***93***
5	447	431	86964	34489	0,9	2	145	4	107	2,9	676
	7	***5***	***125***	***93***	***20***	***8***	***77***	***27***	***146***	***16***	***108***
7	109	323	95010	17263	0,4	1	99	1	7	1,4	304
	4	***7***	***121***	***88***	***19***	***8***	***63***	***16***	***79***	***15***	***105***
Moyenne	288	340	78529	29128	9,7	4	110	2	32	1,9	477
	8	***5***	***129***	***97***	***35***	***12***	***72***	***12***	***86***	***19***	***114***
SEM	58	44	5264	5754	8,8	2	14	0	19	0,3	85
	2	***1***	***4***	***4***	***9***	***2***	***4***	***4***	***17***	***2***	***8***
Médiane	259	323	71853	34489	0,9	2	99	2	13	1,7	494
	7	***5***	***125***	***93***	***31***	***10***	***77***	***9***	***79***	***16***	***108***
Min	109	226	68855	13436	0,4	1	82	1	7	1,4	262
	4	***3***	***121***	***88***	***19***	***8***	***63***	***3***	***46***	***14***	***93***
Max	447	448	95010	40349	45	10	145	4	107	2,9	676
	15	***7***	***144***	***113***	***67***	***18***	***80***	***27***	***146***	***27***	***134***

Gras et italique : fraction bioaccessible (FBa).

Tableau 10. Concentration en composés inorganiques (mg/kg) dans les extraits gastriques et la fraction bioaccessible (%).

D'après les résultats obtenus les composés inorganiques mesurés peuvent être classés en fonction de leur médiane : Ca, Zn, Na > Pb, Mn > As, V, Cr, Ni, Al et Fe. Les % de bioaccessibilité médian du Ca et du Zn, ainsi que les valeurs maximales pour Na et Pb sont supérieurs à 100%, ce qui est certainement dû à des problèmes analytiques. Cependant ces composés présentent des % de bioaccessibilité élevés alors que d'autres comme le Ni, le Fe et l'Al (FBa < 10%) étaient essentiellement sous des formes non disponibles pour l'absorption humaine. Pour les composés ayant une FBa < 30%, à savoir As, V, Cr, Ni, Al et Fe, nous pouvons supposer qu'ils sont principalement associés à des phases minérales qui se dissolvent difficilement dans les solutions gastriques utilisées au cours de l'UBM. En effet, de nombreuses études portant sur la minéralogie des sols, la distribution des phases solides et la bioaccessibilité orale ont montré que les composés inorganiques provenant de sources géogéniques sont principalement dans des phases minérales non ou peu solubles dans les fluides du tractus digestif humain (Denys et al., 2007; Reis et al., 2014; Wragg et al., 2007).

L'étude de Reis et al., 2014 menée dans l'OHM-BMP présentaient des valeurs médianes inférieures pour le Zn (150 mg/kg) et le Pb (22 mg/kg) mais une valeur médiane en Al (1147 mg/kg) largement supérieure. Dans l'article sur les poussières de sols à Estarreja, les concentrations médianes en EPTs étaient largement supérieures aux concentrations trouvées à Trets, sauf pour le Ni qui présente des valeurs médianes équivalentes (98 et 99 mg/kg) et l'Al qui a une FBa plus faible à Trets (7% contre 21% à Estarreja). La fraction bioaccessible des composés est quant à elle supérieure à Trets pour les éléments suivants : Zn, Pb, Ni, Cr, V et As. Ces composés bien que présents en plus faibles quantités à Trets sont globalement plus bioaccessibles que ceux observés à Estarreja.

3.3.2 Test de cytotoxicité in vitro

La détermination du pourcentage de viabilité cellulaire a été réalisée à l'aide du test XTT. La viabilité des cellules AGS a été déterminée après 2 h et 24 h de contact pour chacun des sept extraits gastriques à quatre concentrations (0,067 – 0,13 – 0,27 – 0,53 g/l). La Figure 27

représente la cytotoxicité moyenne des extraits gastrique pour chaque concentration après 2 h et 24 h d'exposition.

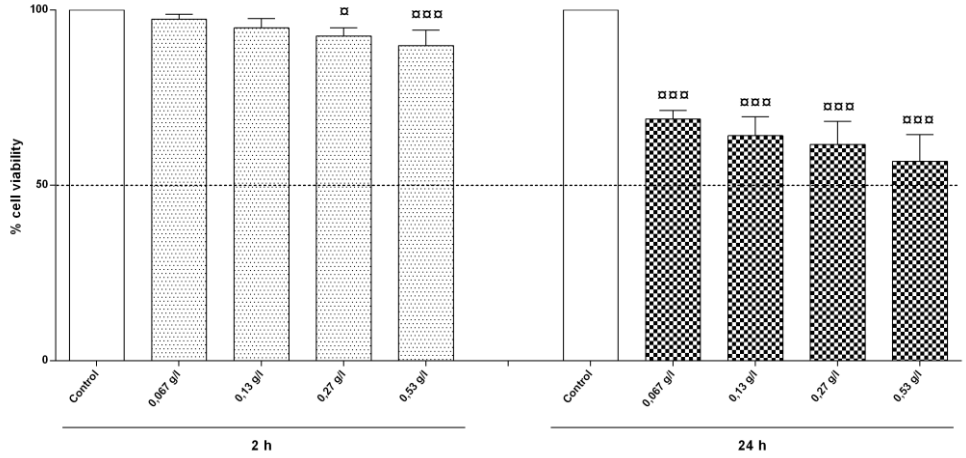


Figure 27. Viabilité des AGS après exposition aux extraits gastriques pendant 2 h et 24 h. Moyenne ± SEM du % de viabilité cellulaire, avec ¤ $p < 0,05$, ¤¤ $p < 0,01$ et ¤¤¤ $p < 0,001$.

Dès 2 h d'exposition des AGS aux extraits gastriques nous mettons en évidence pour les concentrations les plus élevées (0,27 et 0,53 g/l) une diminution significative (respectivement, $p < 0,05$ et $p < 0,001$) du % de viabilité cellulaire. Quant à une exposition de 24 h des cellules aux extraits on observe une diminution significative (avec $p < 0,001$) du % de viabilité cellulaire pour toutes les concentrations. Ces résultats tendent à montrer la capacité des extraits gastriques à altérer le système de respiration cellulaire de façon plus importante à 24 h d'exposition qu'après 2 h d'exposition. De plus, les valeurs des SEM (erreurs standard à la moyenne) nous permettent de supposer que les résultats de cytotoxicité observés sont similaires sur les sept extraits gastriques.

Grâce aux résultats de cytotoxicité, nous avons pu déterminer les concentrations et la cinétique à observer dans le cadre de l'étude des mécanismes physiopathologiques sous-jacents aux lésions primaires à l'ADN et aux dommages chromosomique, à savoir une exposition aux concentrations en extraits gastriques de 0,13 et 0,53 g/l. Ce choix de concentrations est en accord avec les recommandations de l'OCDE ayant fixé un seuil de cytotoxicité recommandé à 55 ± 5 % pour le test du micronoyau (OCDE 487), alors que la cytotoxicité tolérée pour réaliser le test des comètes ne doit pas excéder 80% (OECD, 2014b).

3.3.3 Tests de génotoxicité in vitro

Dans ce manuscrit, seules les données acquises sur les lésions primaires à l'ADN sont décrites, les résultats concernant les dommages chromosomiques sont à ce jour en cours d'acquisition.

Test des comètes en milieu alcalin

L'impact des extraits gastriques (0,13 et 0,53 g/l) a été étudié à un niveau moléculaire, en termes de lésions à l'ADN par le test des comètes en milieu alcalin, après 2 h de contact avec les cellules AGS (Figure 28).

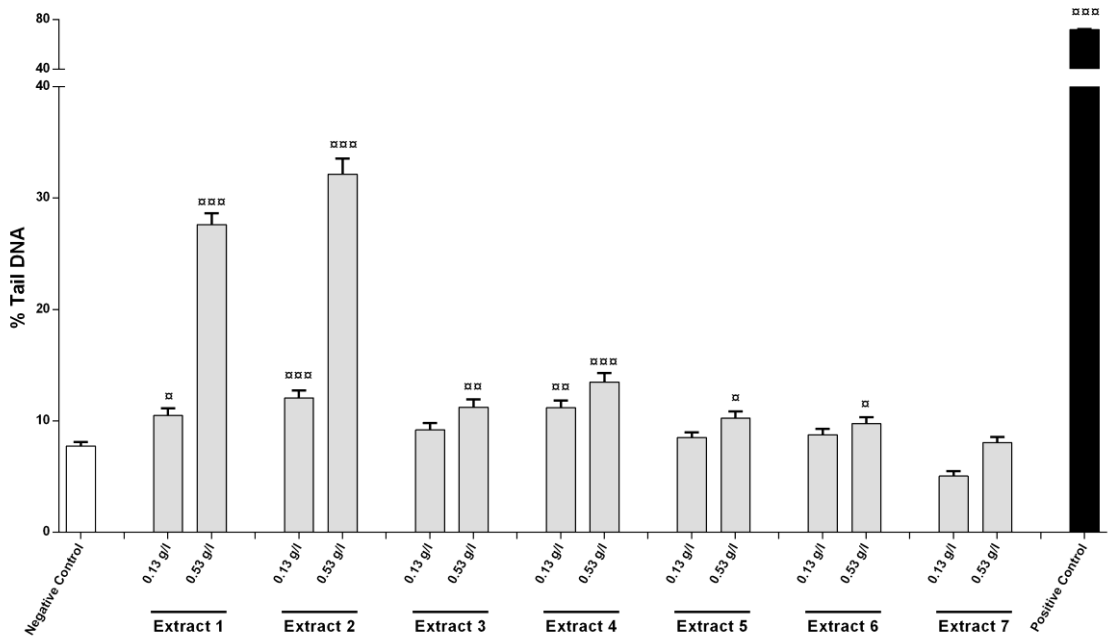


Figure 28. Lésions primaires à l'ADN observées avec le test des comètes après 2 h d'exposition des cellules AGS aux extraits gastriques. Moyenne ± SEM du « *% Tail DNA* » de trois expériences indépendantes, avec ¤ $p < 0,05$; ¤¤ $p < 0,01$ et ¤¤¤ $p < 0,001$.

Tous les extraits gastriques induisent une réponse dose-dépendante du « *% Tail DNA* » après 2 h d'exposition des cellules AGS, excepté pour l'extrait 7 qui n'induit pas de dommages à l'ADN. Les extraits 1 et 2 sont ceux qui induisent les plus sévères dommages à l'ADN, avec des augmentations respectives de 2,6 et 2,7 entre 0,13 et 0,53 g/l ; alors que pour les autres extrait les augmentations sont plus modérées allant de 1,1 pour l'extrait 6, à 1,2 pour les extraits 3, 4 et 5 et jusqu'à 1,6 pour l'extrait 7.

Les extraits gastriques 1, 2 et 4 sont significativement (avec respectivement : $p < 0,05$; $p < 0,001$ et $p < 0,01$) différents du contrôle négatif, les autres extraits (3, 5, 6, et 7) n'induisent pas de lésions à l'ADN à la concentration de 0,13 g/l. A la concentration de 0,53 g/l seul l'extrait gastrique 7 n'induit pas de dommages à l'ADN, les autres sont significativement différents du contrôle négatif, avec $p < 0,05$ pour les extraits 5 et 6, $p < 0,01$ pour l'extrait 3, et finalement $p < 0,001$ pour les extraits 1, 2 et 4.

Ces résultats montrent que les extraits gastriques 1 et 2 provenant des poussières de sols récoltées à l'intérieur (salles de classe et dortoir), sont ceux causant les plus sévères lésions primaires à l'ADN. Les extraits 5, 6 et 7 provenaient du même site de prélèvement mais les poussières ont été séparées en trois échantillons en fonction de leur granulométrie. L'extrait 7, issu de la fraction granulométrique la plus élevée (100 – 250 µm) n'induit pas de lésion primaire à l'ADN. En ce qui concerne les extraits 5 et 6, pas de différence significative entre les factions granulométriques < 50 µm et 50 – 100 µm ont été observées.

Dans le cadre de ces travaux de recherche, le test du micronoyau est actuellement en cours de réalisation. A l'issue de cette étude, les résultats acquis pourront faire l'objet de comparaisons entre : (1) les compositions chimiques des poussières de sols et des extraits gastriques, la fraction bioaccessible de ces composés et les potentiels génotoxiques *in vitro* des extraits gastriques sur les cellules AGS, et (2) les constituants des matières particulaires atmosphériques et de sols sur le site de Trets, en hiver, et de leurs dommages chromosomiques.

Partie VI. Conclusion générale et perspectives

Notre travail de doctorat avait pour objectif d'étudier la génotoxicité *in vitro* de contaminants environnementaux particulaires. Au-delà de leurs concentrations, les connaissances sur la nature des particules et sur leurs toxicités potentielles sont des informations clés pour les structures en charge de la prévention des effets de l'environnement sur la santé des populations. Nous nous sommes intéressés aux particules atmosphériques et de sols car elles peuvent avoir au sein d'un OHM des sources d'émission communes et les enfants en bas-âge constituent une population susceptible d'y être co-exposée.

Tout d'abord, nous avons investigué la génotoxicité *in vitro* de particules atmosphériques fines émises, dans l'OHM-BMP, en été et hiver, sous trois influences différentes, à savoir : industrielle, urbaine et trafic routier. Le second objectif de notre thèse était de développer une nouvelle approche méthodologique permettant d'associer l'étude de la bioaccessibilité des EPTs, contenus dans les poussières de sols de maisons situées dans l'OHM-Estarreja, à l'évaluation *in vitro* de leur génotoxicité. Dans un troisième temps, nous nous sommes attachés à définir la génotoxicité *in vitro* de poussières de sols intérieures et extérieures d'une école maternelle située sur un site urbain de l'OHM-BMP, poussières susceptibles d'être ingérées par des enfants en bas-âge.

Les prérequis fondamentaux nécessaires à la bonne réalisation de notre travail étaient de connaître les compositions chimiques des contaminants particulaires prélevés. Nous avons investigués les teneurs en composés inorganiques et/ou organiques dans les contaminants particulaires et dans les fractions qui en ont été extraites. Pour les poussières de sol, en déterminant leurs fractions bioaccessibles dans les sucs gastriques, nous avons mis en place une nouvelle stratégie méthodologique *in vitro* susceptible de mieux rendre compte des niveaux d'exposition aux EPTs par ingestion.

Les études de cytogénotoxicité des extraits issus des contaminants particulaires ont été réalisées sur des modèles cellulaires représentatifs des tissus cibles compte tenu des voies d'exposition : des cellules pulmonaires humaines (NHLF) pour l'étude des $PM_{2.5}$ inhalées, et

des cellules gastriques humaines (AGS) pour l'étude des poussières ingérées. Afin de mettre en évidence les relations entre les compositions chimiques des extraits et les dommages chromosomiques, nous avons utilisés deux tests statistiques, à savoir : l'analyse en composantes principales, méthode purement descriptive, et les corrélations de Spearman.

Les principaux résultats obtenus, les conclusions et les perspectives pour chacune de ces trois études sont synthétisées dans le Tableau 11.

Etude n°1	Etude n°2	Etude n°3
Principaux résultats		
Caractérisation chimique		
Concentrations $PM_{2.5}$: ▪ OHM-BMP > valeur seuil OMS ▪ × 2 en hiver : trafic routier et urbain Compositions chimiques très variables en fonction sites / saison : ▪ Concentrations métaux été > hiver : site trafic routier +++ ▪ Concentrations HAPs hiver > été : sites trafic routier et urbain +++ processus de combustion	Concentrations médianes Cu, Pb et Zn dans les poussières de sols > autres études % de bioaccessibilité : Zn, Cd > Pb, Mn, As, Ba, Co, Ni, Ga, V, > Cu, Al, Cr, Sb, Sn et Mo ▪ Zn et Cd % de bioaccessibilité élevés ▪ Cu, Cr, Sb, Sn, Mo et Al majoritairement non bioaccessibles	Concentrations médianes en EPTs dans les poussières de sols : ▪ < autres études ▪ As aire de jeu très élevée origine probable produit de traitement du bois des jeux % de bioaccessibilité : Ca, Zn, Na > Pb, Mn > As, V, Cr, Ni, Al et Fe ▪ Ca, Zn et Na exclusivement bioaccessibles ▪ Ni, Fe et Al majoritairement non bioaccessibles
Etude de la cytotoxicité in vitro		
Altération métabolisme mitochondrial cellules NHLF après 24 h, concentrations maximales : ▪ 3 µg/ml extraits hydrophiles ▪ 1 µg/ml extraits lipophiles	Pas d'altération métabolisme mitochondrial cellules AGS après 2 h et 24 h : 0,067 – 0,13 – 0,27 et 0,53 g/	Altération métabolisme mitochondrial des cellules AGS après 2 h et 24 h : 0,13 et 0,53 g/
Etude de la génotoxicité in vitro		
▪ Extraits hydrophiles : C+MN majoritairement ▪ Extraits lipophiles (± S9 mix) : C-MN majoritairement Outils statistiques - induction C-MN ▪ Ca et Zn : extraits hydrophiles ▪ Acénaphtylène : extraits lipophiles ± S9 mix ▪ Benzo[a]pyrène : extraits lipophiles + S9 mix Induction C-MN sur sites centrale thermique, trafic routier et ville +++	Réponses dose-dépendantes : ▪ Sites 1, 2 et 3 : lésions primaires de l'ADN dès 0,067 g/l, lien probable avec Cu ▪ Sites 3, 4 et 5 : induction C-MN dès 0,067 g/l, lien probable avec Pb Outils statistiques - induction dommages chromosomiques : ➢ BNMN, C+MN et C-MN : Pb ➢ C-MN : Zn ➢ C+MN : V	Lésions primaires à l'ADN doses-dépendante : ▪ Sites 1 et 2 = prélèvements intérieurs : lésions primaires +++ ▪ Sites 5, 6 et 7 = même prélèvement mais granulométrie différente. Granulométrie la plus élevée pas d'induction de dommages à l'ADN.
Conclusion		
C-MN : effets complexes, sans seuil Priorisation actions de préventions sur les sites : centrale thermique, trafic routier et urbain ↓ Activités anthropiques liées à la combustion : risque +++	Prise en compte bioaccessibilité Pertinence association des 2 tests de génotoxicité Modèle cellulaire sensible et représentatif Outils statistiques intéressants, informativité à vérifier sur une plus vaste étude et à comparer avec les connaissances en génotoxicité	As dans les bois pour les jeux d'enfants Extraits gastriques des poussières intérieures susceptibles d'induire d'importantes lésions primaires à l'ADN Importance de la fraction granulométrique : PM < 100 µm induction des dommages à l'ADN / au-delà pas d'induction
Perspectives		
OHM-BMP problématique : stockage des boues rouges ↓ Investiguer les $PM_{2.5}$ et poussières de sols en associant caractérisation chimique et évaluation génotoxicité Approfondir les techniques : ▪ $PM_{2.5}$ dans leur intégralité : effets agonistes / antagonistes / additifs ▪ Bioaccessibilité fluides physiologiques ▪ Composition chimique (nitro-/ oxy-HAPs) ▪ Toxicité (stress oxydant, d'inflammation, mutagenèse)	Etude à grande échelle des poussières de sols intérieures et extérieures pour : ▪ Evaluer la contribution polluants particulaires extérieurs à l'intérieur ▪ Etudier l'influence des sources des contaminants sur la bioaccessibilité ▪ Puissance statistique suffisante pour mettre en évidence des relations entre EPTs bioaccessibles et impact génotoxique ▪ Participer à l'élaboration des concentrations règlementaires en EPTs dans les sols	Liens entre mécanismes génotoxiques et composés présents dans les extraits gastriques Croiser les résultats avec les études : ▪ $PM_{2.5}$ en hiver sur le site de Trets, lien entre les composition chimique et dommages chromosomiques ▪ Poussières intérieures Estarreja : similitudes bioaccessibilité des EPTs et/ou influence EPTs bioaccessibles sur la génotoxicité ?

Tableau 11. Principaux résultats, conclusions et perspectives des trois études réalisées.

Au cours de l'étude des particules atmosphériques fines dans l'OHM-BMP, nous avons observés des dépassements en $PM_{2.5}$ par rapport au seuil règlementaire de 10 $\mu g/m^3$ fixé par l'OMS. Les valeurs mesurées au sein de l'OHM-BMP n'excèdent pas les mesures en d'autres points dans la région PACA aux mêmes périodes. Les teneurs atmosphériques en $PM_{2.5}$ et en HAPs étaient doublées en hiver sur les sites urbain et trafic routier. Les compositions chimiques présentaient de fortes disparités avec des variations inter-saisonnières : des concentrations en composés inorganiques plus élevées en été et des concentrations en composés organiques plus élevées en hiver, favorisées par les phénomènes de combustion et d'accumulation (AirPaca, 2012; Li et al., 2006). Les contaminants particulaires prélevés aux alentours des sites centrale thermique, trafic routier et urbain ont été les plus efficients à induire des évènements clastogènes. Ces dommages chromosomiques ont été influencés par divers éléments : (1) l'induction de C-MN par le Ca et le Zn dans les extraits hydrophiles ; (2) l'induction de BNMN, C+MN et C-MN par l'acénaphtylène et l'induction de BNMN et C-MN par le naphtalène dans les extraits lipophiles sans activation métabolique ; et (3) l'induction de C-MN par le benzo[a]pyrène dans les extraits lipophiles avec activation métabolique.

La nature génotoxique des particules fines confirme l'intérêt pour la santé des populations des stratégies de réduction des émissions particulaires mises en place ces dernières années dans la région PACA. Les sites de la centrale thermique, trafic routier et urbain sont ceux pour lesquels des propriétés clastogènes des $PM_{2.5}$ ont été observées. Du fait de la difficulté de définir des seuils d'innocuité pour les événements clastogènes, des actions de prévention pourraient être prioritairement mises en place de manière à réduire l'émission des particules présentant ces propriétés.

Afin de compléter cette investigation *in vitro*, et de conforter les résultats précédents, il serait intéressant d'étudier l'impact génotoxique et la bioaccessibilité des $PM_{2.5}$ directement dans les fluides pulmonaires. Une évaluation des mécanismes d'action sous-jacents, notamment les lésions oxydatives et les cytokines inflammatoires, pourrait être réalisée. En outre, afin d'établir la relation entre ces mécanismes et les composés particulaires, il conviendrait de caractériser plus finement les composés inorganiques (en définissant la spéciation des métaux) et organiques (en évaluant les processus de nitrosation et d'oxydation qui surviennent dans l'atmosphère).

Nous avons dans un second temps porté notre intérêt sur les poussières de sols susceptibles d'être ingérées par des enfants en bas-âge. L'étude pilote réalisée à partir des poussières de sols prélevées dans 5 maisons de l'OHM-Estarreja a permis de mettre au point une nouvelle approche méthodologique pour étudier l'impact génotoxique des EPTs bioaccessibles.

Bien que certains EPTs soient très abondants dans les poussières de sols, ils peuvent présenter de faibles pourcentages de bioaccessibilité, et inversement, confirmant ainsi l'intérêt de prendre ce paramètre en compte lorsqu'on veut estimer simultanément l'exposition aux contaminants ingérés et leur génotoxicité. L'évaluation des dommages chromosomiques *via* le test du micronoyau avec marquage centromérique (Fenech, 2007; González et al., 2011) associée à l'évaluation des dommages primaires à l'ADN par le test des comètes (Collins et al., 1993; Tice et al., 2000) permet d'estimer deux paramètres complémentaires de génotoxicité. Le modèle cellulaire choisi est une lignée cellulaire immortalisée considérée comme la plus représentative des tissus exposés aux sucs gastriques. Il s'agit des cellules gastriques humaines (AGS) qui ont permis de révéler un effet génotoxique dose-dépendant des extraits gastriques testés. Des anomalies de ségrégation des chromosomes doses-dépendantes ont été générées par tous les extraits gastriques. A contrario, des anomalies structurelles doses-dépendantes ont été observées que pour quelques sites de prélèvements. L'association des deux tests statistiques suggère l'influence de certains EPTs sur les dommages chromosomiques : (1) le Pb sur les dommages chromosomiques globaux BNMN, C+MN et C-MN, (2) le Zn sur les C-MN, et (3) le V sur les C+MN. Les résultats de notre étude valide la faisabilité de cette nouvelle méthodologie. Ils invitent à construire une étude à plus grande échelle dans laquelle la définition des prélèvements dans le temps et dans l'espace au sein de l'OHM Esterraja permettrait d'appréhender l'impact des activités anthropiques sur la toxicité potentielle des poussières de sols sur ce territoire.

Des réponses statistiquement significatives entre les caractéristiques des sites, les concentrations en EPTs, la bioaccessibilité et la génotoxicité des EPTs dans les sucs gastriques pourraient fournir des informations importantes sur les sources émettrices d'EPTs et sur la part de la contribution de la pollution extérieure en intérieur. Elles pourraient aussi permettre une meilleure estimation de l'exposition humaine et des risques sanitaires associés dans le périmètre de l'OHM-Estarreja. Enfin, de tels travaux pourraient aider à la

définition de concentrations règlementaires en EPTs dans les sols. Une étude à plus grande échelle est également nécessaire pour évaluer l'informativité des outils statistiques que nous avons employés (PCA et corrélation de Spearman) pour documenter les impacts des composés chimiques en termes de génotoxicité.

Dans un dernier temps, nous nous sommes intéressés à l'étude sur les poussières extérieures et intérieures colléctées dans une école maternelle située au sein de l'OHM-BMP dans un site où les particules ont essentiellement pour origine la pollution urbaine. La collecte ayant été initiée que récemment, nous ne disposons que de données préliminaires qui révèlent la présence d'As dans les poussières récoltées sur l'aire de jeux pour enfants. Cet Arsenic pourrait provenir des produits de traitement des bois des strutures de l'aire de jeux. Les teneurs en EPTs dans les poussières et dans les extraits ne semblent apparemment pas influencées par le lieu de collecte extérieur versus intérieur des poussières. Le test des comètes révèle des lésions primaires à l'ADN plus importantes pour les extraits gastriques provenant des poussières intérieures. La granulométrie semble aussi être un facteur important, en effet les fractions de poussières inférieures 100 µm induisent des dommages à l'ADN, au-delà aucune induction n'a été notée à ce jour. La poursuite de l'étude nous permettra d'établir potentiellement des liens entre les mécanismes génotoxiques et les composés présents dans les extraits gastriques, et ainsi de valider ou non l'utilisation des outils statistiques dans la compréhension des mécanismes génotoxiques. De plus, à l'issue de l'étude, le croisement des résultats avec ceux des précédentes parties de mon travail pourrait permettre de : (1) déterminer s'il existe un lien sur le site de Trets en hiver entre compositions chimiques et dommages chromosomiques observés pour les $PM_{2.5}$ et les poussières de sols, et (2) valider la méthodologie et voir s'il existe des similitudes entre les EPTs bioaccessibles et les résultats observés en génotoxicité.

Les deux OHM ayant fait l'objet de nos travaux sont confrontés à des problématiques impactant fortement l'environnement et dont les effets sanitaires restent à ce jour à documenter. Tout d'abord, dans l'OHM-BMP, la question du stockage de la Bauxaline (résidus solides issus de l'usine d'alumine) sur le site de Mange-Garri à Bouc-Bel-Air est sujet à débats depuis fin 2014. En effet, la problématique des « boues rouges » est multiple. La granulométrie des résidus étant assez fine, le risque d'envol de particules est présent. De plus, les résidus présentent des concentrations importantes en certains métaux, qui, en

fonction de leur spéciation, peuvent présenter une toxicité potentielle (https://www.ohm-...article424). Plusieurs études ont été réalisées, pour réaliser une caractérisation physico-chimique des poussières aux alentours du site de stockage, ou encore pour évaluer la perception de cette pollution par les populations. On constate donc qu'il existe des préoccupations de pollution des sols du fait d'une actuelle gestion des boues rouges. *A contrario*, L'OHM-Estarreja fait face à une pollution des sols qui relève essentiellement d'anciennes pratiques de rejets des déchets par les industries. Bien que le relarguage des déchets par les industries soit une pratique révolue, les sols n'en restent pas moins pollués par des métaux lourds. La pollution des sols est à ce jour bien mieux documentée que la pollution atmosphérique. En effet dans cette zone où les usines relevant de la chimie organique se sont développées, le benzène, élément traceur de ce type de pollution n'est pas dosé. Pour avoir une approche holistique des risques sanitaires encourus par les populations, et plus encore par les enfants en bas-âge, sur ces sites à fortes contaminations particulaires, il serait nécessaire d'associer des études des particules atmosphériques et de sol dans un même espace/temps sur les OHM BMP et Estarreja. A ces études de caractérisation physico-chimique et génotoxique des fractions particulaires, il était apparût fortement intéressant lors de l'étude PACTES-BMP de documenter l'aspect social. En effet, il convient de noter que l'appropriation du bien fondé des stratégies de prévention passe par leur acceptation.

Dans le cadre d'investigations des risques *in vitro*, il conviendrait d'associer les études physico-chimiques des phases minérales et organiques des particules de sols et atmosphériques à la caractérisation de la bioaccessibilité des constituants particulaires dans les fluides physiologiques cibles (pulmonaires et gastriques), et à la détermination de la génotoxicité des composés bioaccessibles sur des modèles cellulaires ou tissulaires humains. Les prélèvements des particules atmosphériques et des poussières de sols devraient être faits de manière coordonnée dans des lieux idéalement fréquentés par des enfants en bas-âges (crèches, écoles maternelles et primaires). Pour approfondir les connaissances sur l'impact granulométrique, les particules pourraient être séparées en fractions de granulométrie variable. Une vingtaine de sites de prélèvements devraient permettre d'obtenir une bonne représentation des différentes sources d'émission des particules au sein de chaque OHM et offrir un nombre de données suffisant pour avoir une puissance statistique satisfaisante. Sur chaque site il serait intéressant de faire des collectes à

l'intérieur et à l'extérieur, ainsi que de faire deux campagnes de prélèvements une en été et l'autre en hiver.

La bioaccessibilité des composés particulaires peut être mesurée par des techniques *in vitro* simulant le « lessivage » des matrices solides dans des fluides physiologiques pulmonaires et gastriques, en tenant compte des conditions physico-chimiques et des temps de résidence. La bioaccessibilité des poussières de sols serait ici encore évaluée par la méthode UBM, celle des particules atmosphériques par la méthode GAMBLE, adaptée pour les composés inorganiques et organiques présents dans les fluides alvéolaires (Julien et al., 2011).

La cytogénotoxicité *in vitro* des composés particulaires atmosphériques et de sols bioaccessibles continuera d'être évaluée sur deux types cellulaires humains, chacun représentatif d'une exposition par inhalation ou par ingestion. Pour l'ingestion le modèle cellulaire AGS reste un choix privilégié, alors que pour l'étude des particules inhalées le modèle le plus pertinent utilisé actuellement est les cellules BEAS-2B (cellules épithéliales bronchiques humaines). Afin de compléter les études génotoxiques *in vitro* réalisées à l'aide du test des comètes en solution alcaline et du test du micronoyau avec marquage centromérique, des études pourraient investiguer les phénomènes physiologiques provoqués par l'exposition des cellules aux composés bioaccessibles, parmi lesquels nous pouvons citer :

- Les dommages à l'ADN tels que les cassures double-brins mis en évidence par la recherche de la forme phosphorylée de l'histone H2AX (γH2AX) et de la protéine ATM (Ataxia-telangiectasia-mutated) ;
- La mort cellulaire par apoptose mise en évidence par la mesure de la caspase-3 activée, et la nécrose à l'aide d'un colorant vital de type iodure de propidium ;
- L'apparition de stress oxydant mise en évidence par la détermination des espèces réactives de l'oxygène (ERO), la translocation nucléaire de NRF2, et par le ratio GSH/GSSG) ;
- L'initiation d'une réponse inflammatoire mise en évidence par la translocation de NfκB et le relargage de médiateurs de l'inflammation (TNFα, IL-1β, IL-6 et IL-8) dans le milieu de culture cellulaire.

Ce type d'analyse multiparamétrique peut être réalisé à l'aide de plate-forme d'imagerie cellulaire (ex. l'Arrayscan de Thermo-Fisher). Cette analyse permet la quantification simultanée des cassures double-brins de l'ADN, de l'apoptose, du stress oxydant, et de l'inflammation et leurs suivis dans le temps.

Références bibliographiques

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 2007. Toxicological profile for lead.

AirPaca, 2012. Impact brûlage qualité de l'air.

Akbari, M., Morevati, M., Croteau, D., Bohr, V.A., 2015. The role of DNA base excision repair in brain homeostasis and disease. DNA Repair, Cutting-edge Perspectives in Genomic Maintenance 32, 172–179. doi:10.1016/j.dnarep.2015.04.029

Akhtar, U.S., McWhinney, R.D., Rastogi, N., Abbatt, J.P.D., Evans, G.J., Scott, J.A., 2010. Cytotoxic and proinflammatory effects of ambient and source-related particulate matter (PM) in relation to the production of reactive oxygen species (ROS) and cytokine adsorption by particles. Inhal. Toxicol. 22 Suppl 2, 37–47. doi:10.3109/08958378.2010.518377

Alam-Escamilla, D., Estrada-Muñiz, E., Solís-Villegas, E., Elizondo, G., Vega, L., 2015. Genotoxic and cytostatic effects of 6-pentadecyl salicylic anacardic acid in transformed cell lines and peripheral blood mononuclear cells. Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen. 777, 43–53. doi:10.1016/j.mrgentox.2014.11.008

Albertini, R.J., Anderson, D., Douglas, G.R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A.T., Norppa, H., Shuker, D.E., Tice, R., Waters, M.D., Aitio, A., 2000. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety. Mutat. Res. 463, 111–172.

Anetor, J.I., Wanibuchi, H., Fukushima, S., 2007. Arsenic exposure and its health effects and risk of cancer in developing countries: micronutrients as host defence. Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP 8, 13–23.

Anikeenok, M.O., Il'inskaia, O.N., 2008. [Genotoxicity of Helicobacter pylori deltaPAI in DNA comet assay]. Tsitologiia 50, 1005–1008.

Annesi-Maesano, I., Caillaud, D., Lavaud, F., Moreau, D., Le Moullec, Y., Taytard, A., Pauli, G., Charpin, D., 2008. Exposition aux particules atmosphériques fines et développement des maladies allergiques de l'enfant. Résultats épidémiologiques issus de l'étude des six villes

(ISAAC-2 France). Rev. Fr. Allergol. Immunol. Clin. 48, 427–433. doi:10.1016/j.allerg.2008.03.004

Aung, N.N., Yoshinaga, J., Takahashi, J., 2004. Exposure assessment of lead among Japanese children. Environ. Health Prev. Med. 9, 257–261. doi:10.1007/BF02898139

Averbeck, D., 2000. Mécanismes de réparation et mutagenèse radio-induite chez les eucaryotes supérieurs. Cancer/Radiothérapie 4, 335–354. doi:10.1016/S1278-3218(00)00008-1

Baulig, A., Garlatti, M., Bonvallot, V., Marchand, A., Barouki, R., Marano, F., Baeza-Squiban, A., 2003. Involvement of reactive oxygen species in the metabolic pathways triggered by diesel exhaust particles in human airway epithelial cells. Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol. 285, L671–L679. doi:10.1152/ajplung.00419.2002

Benameur, L., Orsière, T., Rose, J., Botta, A., 2011. Detection of environmental clastogens and aneugens in human fibroblasts by cytokinesis-blocked micronucleus assay associated with immunofluorescent staining of CENP-A in micronuclei. Chemosphere 84, 676–680. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.03.027

Bhattacharjee, S., Zhao, Y., Hill, J.M., Culicchia, F., Kruck, T.P.A., Percy, M.E., Pogue, A.I., Walton, J.R., Lukiw, W.J., 2013. Selective accumulation of aluminum in cerebral arteries in Alzheimer's disease (AD). J. Inorg. Biochem. 126, 35–37. doi:10.1016/j.jinorgbio.2013.05.007

Bignold, L.P., 2009. Mechanisms of clastogen-induced chromosomal aberrations: A critical review and description of a model based on failures of tethering of DNA strand ends to strand-breaking enzymes. Mutat. Res. Mutat. Res. 681, 271–298. doi:10.1016/j.mrrev.2008.11.004

Billet, S., Abbas, I., Goff, J.L., Verdin, A., André, V., Lafargue, P.-E., Hachimi, A., Cazier, F., Sichel, F., Shirali, P., Garçon, G., 2008. Genotoxic potential of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons-coated onto airborne Particulate Matter (PM2.5) in human lung epithelial A549 cells. Cancer Lett. 270, 144–155. doi:10.1016/j.canlet.2008.04.044

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

Bonnefoy, A., 2010. Compréhension des mécanismes de formation des adduits exocycliques à l'ADN par les dérivés aromatiques nitrés. Aix-Marseille Université.

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

Brook, R.D., Rajagopalan, S., Pope, C.A., Brook, J.R., Bhatnagar, A., Diez-Roux, A.V., Holguin, F., Hong, Y., Luepker, R.V., Mittleman, M.A., Peters, A., Siscovick, D., Smith, S.C., Whitsel, L., Kaufman, J.D., 2010. Particulate Matter Air Pollution and Cardiovascular Disease An Update to the Scientific Statement From the American Heart Association. Circulation 121, 2331–2378. doi:10.1161/CIR.0b013e3181dbece1

Brüggemann, E., Gerwig, H., Gnauk, T., Müller, K., Herrmann, H., 2009. Influence of seasons, air mass origin and day of the week on size-segregated chemical composition of aerosol particles at a kerbside. Atmos. Environ. 43, 2456–2463. doi:10.1016/j.atmosenv.2009.01.054

Butte, W., Heinzow, B., 2002. Pollutants in house dust as indicators of indoor contamination. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 175, 1–46.

Button, M., Jenkin, G.R.T., Harrington, C.F., Watts, M.J., 2009. Human toenails as a biomarker of exposure to elevated environmental arsenic. J. Environ. Monit. JEM 11, 610–617. doi:10.1039/b817097e

Calcabrini, A., Meschini, S., Marra, M., Falzano, L., Colone, M., Berardis, B.D., Paoletti, L., Arancia, G., Fiorentini, C., 2004. Fine environmental particulate engenders alterations in human lung epithelial A549 cells. Environ. Res. 95, 82–91. doi:10.1016/j.envres.2003.07.011

Chang, E.E., Chiang, P.C., Lu, P.H., Ko, Y.W., 2001. Comparisons of metal leachability for various wastes by extraction and leaching methods. Chemosphere 45, 91–99. doi:10.1016/S0045-6535(01)00002-9

Chang, L., Magos, L., Suzuki, T., eds, 1996. Toxicology of metals.

Chattopadhyay, G., Lin, K.C.-P., Feitz, A.J., 2003. Household dust metal levels in the Sydney metropolitan area. Environ. Res. 93, 301–307. doi:10.1016/S0013-9351(03)00058-6

Chen, H., Lu, X., Li, L.Y., 2014. Spatial distribution and risk assessment of metals in dust based on samples from nursery and primary schools of Xi'an, China. Atmos. Environ. 88, 172–182.

doi:10.1016/j.atmosenv.2014.01.054

Collins, A.R., Duthie, S.J., Dobson, V.L., 1993. Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. Carcinogenesis 14, 1733–1735.

Collins, A.R., Oscoz, A.A., Brunborg, G., Gaivão, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C.C., Štětina, R., 2008. The comet assay: topical issues. Mutagenesis 23, 143–151. doi:10.1093/mutage/gem051

Commission fédérale de l'hygiène de l'air (CFHA), 2013. Les poussières fines en Suisse, Rapport de la CFHA - Recherche Google. Berne.

Cooke, T.F., 1991. Indoor air pollutants. A literature review. Rev. Environ. Health 9, 137–160.

Cubison, M., Alfarra, M., Allan, J., Bower, K., Coe, H., McFiggans, G., Whitehead, J., Williams, P., Zhang, Q., Jimenez, J., Hopkins, J., Lee, J., 2006. The characterisation of pollution aerosol in a changing photochemical environment. ATMOSPHERIC Chem. Phys. 6, 5573–5588.

Davis, S., Mirick, D.K., 2006. Soil ingestion in children and adults in the same family. J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol. 16, 63–75.

De Boeck, M., Kirsch-Volders, M., Lison, D., 2003. Cobalt and antimony: genotoxicity and carcinogenicity. Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen., Metals and Human Cancer 533, 135–152. doi:10.1016/j.mrfmmm.2003.07.012

Delfino, R.J., Staimer, N., Vaziri, N.D., 2011. Air pollution and circulating biomarkers of oxidative stress. Air Qual. Atmosphere Health 4, 37–52. doi:10.1007/s11869-010-0095-2

Denys, S. [b1] (analytic), Caboche, J. [b1] (analytic), Tack, K. [b1] (analytic), Delalain, P. [b1] (analytic), 2007. Bioaccessibility of lead in high carbonate soils. J. Environ. Sci. Health Part A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng., Bioaccessibility of soil contaminants (English) 42, 1331–1339.

Denys, S., Caboche, J., Tack, K., Rychen, G., Wragg, J., Cave, M., Jondreville, C., Feidt, C., 2012. In vivo validation of the unified BARGE method to assess the bioaccessibility of arsenic, antimony, cadmium, and lead in soils. Environ. Sci. Technol. 46, 6252–6260. doi:10.1021/es3006942

Denys, S., Tack, K., Caboche, J., Delalain, P., 2009. Bioaccessibility, solid phase distribution, and speciation of Sb in soils and in digestive fluids. Chemosphere 74, 711–716. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.09.088

Dergham, M., Lepers, C., Verdin, A., Billet, S., Cazier, F., Courcot, D., Shirali, P., Garçon, G., 2012. Prooxidant and Proinflammatory Potency of Air Pollution Particulate Matter (PM2.5–0.3) Produced in Rural, Urban, or Industrial Surroundings in Human Bronchial Epithelial Cells (BEAS-2B). Chem. Res. Toxicol. 25, 904–919. doi:10.1021/tx200529v

Deschamps, E., Weidler, P.G., Friedrich, F., Weiss, C., Diabaté, S., 2013. Characterization of indoor dust from Brazil and evaluation of the cytotoxicity in A549 lung cells. Environ. Geochem. Health 36, 225–233. doi:10.1007/s10653-013-9560-9

Dickey, J.S., Redon, C.E., Nakamura, A.J., Baird, B.J., Sedelnikova, O.A., Bonner, W.M., 2009. H2AX: functional roles and potential applications. Chromosoma 118, 683–692. doi:10.1007/s00412-009-0234-4

DiStefano, E., Eiguren-Fernandez, A., Delfino, R.J., Sioutas, C., Froines, J.R., Cho, A.K., 2009. Determination of metal-based hydroxyl radical generating capacity of ambient and diesel exhaust particles. Inhal. Toxicol. 21, 731–738. doi:10.1080/08958370802491433

Dockery, D.W., Pope, C.A., 1994. Acute Respiratory Effects of Particulate Air Pollution. Annu. Rev. Public Health 15, 107–132. doi:10.1146/annurev.pu.15.050194.000543

Dominici, L., Guerrera, E., Villarini, M., Fatigoni, C., Moretti, M., Blasi, P., Monarca, S., 2013. Evaluation of *In Vitro* Cytoxicity and Genotoxicity of Size-Fractionated Air Particles Sampled during Road Tunnel Construction. BioMed Res. Int. 2013, e345724. doi:10.1155/2013/345724

DREAL, Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement, n.d. Pollution aux particules fines : Eléments de stratégie pour une politique de réduction ambitieuse en PACA.

Duker, A.A., Carranza, E.J.M., Hale, M., 2005. Arsenic geochemistry and health. Environ. Int. 31, 631–641. doi:10.1016/j.envint.2004.10.020

Eisenbrand, G., Pool-Zobel, B., Baker, V., Balls, M., Blaauboer, B.J., Boobis, A., Carere, A., Kevekordes, S., Lhuguenot, J.-C., Pieters, R., Kleiner, J., 2002. Methods of in vitro toxicology. Food Chem. Toxicol. 40, 193–236. doi:10.1016/S0278-6915(01)00118-1

Elmore, S., 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. Toxicol. Pathol. 35, 495–516. doi:10.1080/01926230701320337

Evdokimov, A.N., Lavrik, O.I., Petruseva, I.O., 2014. Model DNA for investigation of

mechanism of nucleotide excision repair. Biopolym. Cell 30, 167–183.

Faiz, Y., Tufail, M., Javed, M.T., Chaudhry, M.M., Naila-Siddique, 2009. Road dust pollution of Cd, Cu, Ni, Pb and Zn along Islamabad Expressway, Pakistan. Microchem. J. 92, 186–192. doi:10.1016/j.microc.2009.03.009

Fenech, M., 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. Nat. Protoc. 2, 1084–1104. doi:10.1038/nprot.2007.77

Fenech, M., 2002. Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer. Drug Discov. Today 7, 1128–1137. doi:10.1016/S1359-6446(02)02502-3

Fenech, M., Crott, J.W., 2002. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes—evidence for breakage–fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen., Chromosomal Aberrations: Perspectives for the 21st Century 504, 131–136. doi:10.1016/S0027-5107(02)00086-6

Fink, S.L., Cookson, B.T., 2005. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. Infect. Immun. 73, 1907–1916. doi:10.1128/IAI.73.4.1907-1916.2005

Fukasawa, K., 2005. Centrosome amplification, chromosome instability and cancer development. Cancer Lett. 230, 6–19. doi:10.1016/j.canlet.2004.12.028

Gábelová, A., Valovičová, Z., Lábaj, J., Bačová, G., Binková, B., Farmer, P.B., 2007. Assessment of oxidative DNA damage formation by organic complex mixtures from airborne particles PM10. Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen. 620, 135–144. doi:10.1016/j.mrfmmm.2007.03.003

García-Lestón, J., Méndez, J., Pásaro, E., Laffon, B., 2010. Genotoxic effects of lead: An updated review. Environ. Int. 36, 623–636. doi:10.1016/j.envint.2010.04.011

Gardeur-Algros, E., 2013. Essais de bioaccessibilité : un moyen d'approcher la biodisponibilité en vue d'affiner la dose d'exposition par voie orale dans les EQRS. Presented at the Intersol'2013, Lyon, France, p. 33.

Gauderman, W.J., Avol, E., Gilliland, F., Vora, H., Thomas, D., Berhane, K., McConnell, R., Kuenzli, N., Lurmann, F., Rappaport, E., Margolis, H., Bates, D., Peters, J., 2004. The Effect of Air Pollution on Lung Development from 10 to 18 Years of Age. N. Engl. J. Med. 351, 1057–1067. doi:10.1056/NEJMoa040610

Gebel, T., 1997. Arsenic and antimony: comparative approach on mechanistic toxicology. Chem. Biol. Interact. 107, 131–144. doi:10.1016/S0009-2797(97)00087-2

Gimbert, F., 2006. Cinétiqe de transfert de polluants métalliques du sol à l'escargot. Université de Franche-Comté.

Glorennec, P., Lucas, J.-P., Mandin, C., Le Bot, B., 2012. French children's exposure to metals via ingestion of indoor dust, outdoor playground dust and soil: Contamination data. Environ. Int. 45, 129–134. doi:10.1016/j.envint.2012.04.010

Goix, S., 2012. Origine et impact des pollutions liées aux activités minières sur l'environnement (eau-sol-atmosphère) et la santé, cas de Oruro (Bolivie) (phd). Université de Toulouse, Université Toulouse III - Paul Sabatier.

González, N.V., Nikoloff, N., Soloneski, S., Larramendy, M.L., 2011. A combination of the cytokinesis-block micronucleus cytome assay and centromeric identification for evaluation of the genotoxicity of dicamba. Toxicol. Lett. 207, 204–212. doi:10.1016/j.toxlet.2011.09.013

Granero, S., Domingo, J.L., 2002. Levels of metals in soils of Alcalá de Henares, Spain: Human health risks. Environ. Int. 28, 159–164. doi:10.1016/S0160-4120(02)00024-7

Gron, C., Andersen, L., 2003. Human Bioaccessibility of HeavyMetals and PAH from Soil. Danish Environmental Protection Agency (Environmental Project No. 840).

Gualtieri, M., Mantecca, P., Corvaja, V., Longhin, E., Perrone, M.G., Bolzacchini, E., Camatini, M., 2009. Winter fine particulate matter from Milan induces morphological and functional alterations in human pulmonary epithelial cells (A549). Toxicol. Lett. 188, 52–62. doi:10.1016/j.toxlet.2009.03.003

Guetens, G., De Boeck, G., Highley, M., van Oosterom, A.T., de Bruijn, E.A., 2002. Oxidative DNA damage: biological significance and methods of analysis. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 39, 331–457.

Gutiérrez-Castillo, M.E., Olivos-Ortiz, M., De Vizcaya-Ruiz, A., Cebrián, M.E., 2005. Chemical characterization of extractable water soluble matter associated with PM10 from Mexico City during 2000. Chemosphere 61, 701–710. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.03.063

Gutiérrez-Castillo, M.E., Roubicek, D.A., Cebrián-García, M.E., De Vizcaya-Ruíz, A., Sordo-Cedeño, M., Ostrosky-Wegman, P., 2006. Effect of chemical composition on the induction of DNA damage by urban airborne particulate matter. Environ. Mol. Mutagen. 47, 199–211.

doi:10.1002/em.20186

Hamon, R. e., McLaughlin, M. j., Naidu, R., Correll, R., n.d. Long-term changes in cadmium bioavailability in soil. Environ. Sci. Technol. Easton Pa USA 3699.

Hanna, N., Parfait, B., Vidaud, D., Vidaud, M., 2005. [Mutation mechanisms and their consequences]. Médecine Sci. MS 21, 969–980. doi:10.1051/medsci/20052111969

Han, S., Lemire, J., Appanna, V.P., Auger, C., Castonguay, Z., Appanna, V.D., 2013. How aluminum, an intracellular ROS generator promotes hepatic and neurological diseases: the metabolic tale. Cell Biol. Toxicol. 29, 75–84. doi:10.1007/s10565-013-9239-0

Harrison, R., Smith, D., Kibble, A., 2004. What is responsible for the carcinogenicity of PM2.5? Occup. Environ. Med. 61, 799–805. doi:10.1136/oem.2003.010504

Hartwig, A., 2013. Metal interaction with redox regulation: an integrating concept in metal carcinogenesis? Free Radic. Biol. Med. 55, 63–72. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.11.009

Hoeijmakers, J.H.J., 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. Nature 411, 366–374. doi:10.1038/35077232

Hoffmann, B., Moebus, S., Möhlenkamp, S., Stang, A., Lehmann, N., Dragano, N., Schmermund, A., Memmesheimer, M., Mann, K., Erbel, R., Jöckel, K.-H., 2007. Residential Exposure to Traffic Is Associated With Coronary Atherosclerosis. Circulation 116, 489–496. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.693622

IARC (International Agency for Research on Cancer), 2013. IARC: Outdoor air pollution a leading environmental cause of cancer deaths. Press Release N°221.

IARC, International Agency for Research on Cancer, 2012. Arsenic, metals, fibres and dusts, in: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, France, p. 501.

Iarmarcovai, G., Botta, A., Orsière, T., 2006. Number of centromeric signals in micronuclei and mechanisms of aneuploidy. Toxicol. Lett. 166, 1–10. doi:10.1016/j.toxlet.2006.05.015

Ibanez, Y., Le Bot, B., Glorennec, P., 2010. House-dust metal content and bioaccessibility: A review. Eur. J. Mineral. 22, 629–637. doi:10.1127/0935-1221/2010/0022-2010

IBGE, Institut Bruxellois pour la Gestion de l'Environnement, 2009. Les particules fines (PM10, PM2,5).

Instituto Nacional de Estatisticas, INE, 2011. Censos - Resultados definitivos. Portugal - 2011.

INVS, Institut de Veille Sanitaire, 2012. Quantités de terre et poussières ingérées oar un enfant de moins de 6 ans et bioaccessibilité des polluants. Etats des connaissances et propositions.

INVS, Institut de Veille Sanitaire, 2011. APHEKOM Report.

Jolliffe, I., 2014. Principal Component Analysis, in: Wiley StatsRef: Statistics Reference Online. John Wiley & Sons, Ltd.

Jomova, K., Valko, M., 2011. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. Toxicology 283, 65–87. doi:10.1016/j.tox.2011.03.001

Julien, C., Esperanza, P., Bruno, M., Alleman, L.Y., 2011. Development of an in vitro method to estimate lung bioaccessibility of metals from atmospheric particles. J. Environ. Monit. JEM 13, 621–630. doi:10.1039/c0em00439a

Kang, Y., Cheung, K.C., Wong, M.H., 2011. Mutagenicity, genotoxicity and carcinogenic risk assessment of indoor dust from three major cities around the Pearl River Delta. Environ. Int. 37, 637–643. doi:10.1016/j.envint.2011.01.001

Kang, Y., Yin, Y., Man, Y., Li, L., Zhang, Q., Zeng, L., Luo, J., Wong, M.H., 2013. Bioaccessibility of polychlorinated biphenyls in workplace dust and its implication for risk assessment. Chemosphere 93, 924–930. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.05.057

Kaonga, B., Kgabi, N.A., 2010. Investigation into presence of atmospheric particulate matter in Marikana, mining area in Rustenburg Town, South Africa. Environ. Monit. Assess. 178, 213–220. doi:10.1007/s10661-010-1683-1

Karlsson, H.L., Di Bucchianico, S., Collins, A.R., Dusinska, M., 2015. Can the comet assay be used reliably to detect nanoparticle-induced genotoxicity? Environ. Mol. Mutagen. 56, 82–96. doi:10.1002/em.21933

Kelly, F.J., 2003. Oxidative stress: its role in air pollution and adverse health effects. Occup. Environ. Med. 60, 612–616. doi:10.1136/oem.60.8.612

Kim, Y.J., Kim, E.-H., Hahm, K.B., 2012. Oxidative stress in inflammation-based gastrointestinal tract diseases: Challenges and opportunities. J. Gastroenterol. Hepatol. 27, 1004–1010. doi:10.1111/j.1440-1746.2012.07108.x

Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate,

M., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surrallés, J., Vanhauwaert, A., Wakata, A., 2003. Report from the in vitro micronucleus assay working group. Mutat. Res. 540, 153–163.

Kirsch-Volders, M., Vanhauwaert, A., De Boeck, M., Decordier, I., 2002. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen., Chromosomal Aberrations: Perspectives for the 21st Century 504, 137–148. doi:10.1016/S0027-5107(02)00087-8

Knaapen, A.M., Shi, T., Borm, P.J.A., Schins, R.P.F., 2002. Soluble metals as well as the insoluble particle fraction are involved in cellular DNA damage induced by particulate matter. Mol. Cell. Biochem. 234-235, 317–326. doi:10.1023/A:1015970023889

Kocbach, A., Herseth, J.I., Låg, M., Refsnes, M., Schwarze, P.E., 2008. Particles from wood smoke and traffic induce differential pro-inflammatory response patterns in co-cultures. Toxicol. Appl. Pharmacol. 232, 317–326. doi:10.1016/j.taap.2008.07.002

Kok, T.M.C.M., Driece, H.A.L., Hogervorst, J.G.F., Briedé, J.J., 2006. Toxicological assessment of ambient and traffic-related particulate matter: A review of recent studies. Mutat. Res. Mutat. Res. 613, 103–122. doi:10.1016/j.mrrev.2006.07.001

Krokan, H.E., Nilsen, H., Skorpen, F., Otterlei, M., Slupphaug, G., 2000. Base excision repair of DNA in mammalian cells. FEBS Lett., Birmingham Issue 476, 73–77. doi:10.1016/S0014-5793(00)01674-4

Kumagai, Y., Shimojo, N., 2002. Possible mechanisms for induction of oxidative stress and suppression of systemic nitric oxide production caused by exposure to environmental chemicals. Environ. Health Prev. Med. 7, 141–150. doi:10.1007/BF02897942

Kunkel, T.A., Erie, D.A., 2005. Dna Mismatch Repair*. Annu. Rev. Biochem. 74, 681–710. doi:10.1146/annurev.biochem.74.082803.133243

Kunzli, N., Jerrett, M., Mack, W.J., Beckerman, B., LaBree, L., Gilliland, F., Thomas, D., Peters, J., Hodis, H.N., 2005. Ambient Air Pollution and Atherosclerosis in Los Angeles. Environ. Health Perspect. 113, 201–206. doi:10.1289/ehp.7523

Kurt-Karakus, P.B., 2012. Determination of heavy metals in indoor dust from Istanbul, Turkey: Estimation of the health risk. Environ. Int. 50, 47–55. doi:10.1016/j.envint.2012.09.011

Lee, J.-C., Son, Y.-O., Pratheeshkumar, P., Shi, X., 2012. Oxidative stress and metal

carcinogenesis. Free Radic. Biol. Med. 53, 742–757. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.06.002

Lehmann, A.R., 2005. The role of SMC proteins in the responses to DNA damage. DNA Repair 4, 309–314. doi:10.1016/j.dnarep.2004.07.009

Lepers, C., Dergham, M., Armand, L., Billet, S., Verdin, A., Andre, V., Pottier, D., Courcot, D., Shirali, P., Sichel, F., 2014. Mutagenicity and clastogenicity of native airborne particulate matter samples collected under industrial, urban or rural influence. Toxicol. In Vitro 28, 866–874. doi:10.1016/j.tiv.2014.03.011

Lepeule, J., Laden, F., Dockery, D., Schwartz, J., 2012. Chronic Exposure to Fine Particles and Mortality: An Extended Follow-up of the Harvard Six Cities Study from 1974 to 2009. Environ. Health Perspect. 120, 965. doi:10.1289/ehp.1104660

Li, J., Zhang, G., Li, X.D., Qi, S.H., Liu, G.Q., Peng, X.Z., 2006. Source seasonality of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in a subtropical city, Guangzhou, South China. Sci. Total Environ. 355, 145–155. doi:10.1016/j.scitotenv.2005.02.042

Li, M.-H., Fan, L.-C., Mao, B., Yang, J.-W., Choi, A.M.K., Cao, W.-J., Xu, J.-F., 2015. Short Term Exposure to Ambient Fine Particulate Matter (PM2.5) Increases Hospitalizations and Mortality of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. Chest. doi:10.1378/chest.15-0513

Li, N., Sioutas, C., Cho, A., Schmitz, D., Misra, C., Sempf, J., Wang, M., Oberley, T., Froines, J., Nel, A., 2003. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. Environ. Health Perspect. 111, 455–460.

Li, N., Xia, T., Nel, A.E., 2008. The role of oxidative stress in ambient particulate matter-induced lung diseases and its implications in the toxicity of engineered nanoparticles. Free Radic. Biol. Med. 44, 1689–1699. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.01.028

Lin, Y., Fang, F., Wang, F., Xu, M., 2015. Pollution distribution and health risk assessment of heavy metals in indoor dust in Anhui rural, China. Environ. Monit. Assess. 187, 4763. doi:10.1007/s10661-015-4763-4

Lioy, P.J., Freeman, N.C.G., Millette, J.R., 2002. Dust: a metric for use in residential and building exposure assessment and source characterization. Environ. Health Perspect. 110, 969–983.

Li, P.-Y., Chang, Y.-C., Tzang, B.-S., Chen, C.-C., Liu, Y.-C., 2007. Antibiotic amoxicillin induces DNA lesions in mammalian cells possibly via the reactive oxygen species. Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen. 629, 133–139. doi:10.1016/j.mrgentox.2007.02.005

Lisiewicz, M., Heimburger, R., Golimowski, J., 2000. Granulometry and the content of toxic and potentially toxic elements in vacuum-cleaner collected, indoor dusts of the city of Warsaw. Sci. Total Environ. 263, 69–78. doi:10.1016/S0048-9697(00)00667-7

Liu, G., Li, J., Wu, D., Xu, H., 2015. Chemical composition and source apportionment of the ambient PM2.5 in Hangzhou, China. Particuology 18, 135–143. doi:10.1016/j.partic.2014.03.011

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

Lu, X., Wang, L., Li, L.Y., Lei, K., Huang, L., Kang, D., 2010. Multivariate statistical analysis of heavy metals in street dust of Baoji, NW China. J. Hazard. Mater. 173, 744–749. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.09.001

MacNee, W., Donaldson, K., 2000. Exacerbations of copd*: Environmental mechanisms. Chest 117, 390S–397S. doi:10.1378/chest.117.5_suppl_2.390S

Maertens, R.M., Bailey, J., White, P.A., 2004. The mutagenic hazards of settled house dust: a review. Mutat. Res. Mutat. Res., The Sources and Potential Hazards of Mutagens in Complex Environmental Matrices 567, 401–425. doi:10.1016/j.mrrev.2004.08.004

Maertens, R.M., Yang, X., Zhu, J., Gagne, R.W., Douglas, G.R., White, P.A., 2008. Mutagenic and Carcinogenic Hazards of Settled House Dust I: Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Content and Excess Lifetime Cancer Risk from Preschool Exposure. Environ. Sci. Technol. 42, 1747–1753. doi:10.1021/es702449c

Maron, D., Ames, B., 1983. Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test.

Maroni, M., Seifert, B., Lindvall, T., 1995. Indoor Air Quality: A Comprehensive Reference Book. Elsevier.

Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P.V., Decordier, I., Kirsch-Volders, M., 2006. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. Biochimie,

Facets of Environmental Nuclear Toxicology 88, 1515–1531. doi:10.1016/j.biochi.2006.07.004

McKone, T.E., Thatcher, T.L., Fisk, W.J., Sextro, R.G., Sohn, M.D., Delp, W.W., Riley, W.J., 2002. Factors Affecting the Concentration of Outdoor Particles Indoors: Existing Data and Data Needs (No. LBNL--49570). Ernest Orlando Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, CA (US).

Mehta, M., Chen, L.-C., Gordon, T., Rom, W., Tang, M., 2008. Particulate matter inhibits DNA repair and enhances mutagenesis. Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen. 657, 116–121. doi:10.1016/j.mrgentox.2008.08.015

Meza-Figueroa, D., De la O-Villanueva, M., De la Parra, M.L., 2007. Heavy metal distribution in dust from elementary schools in Hermosillo, Sonora, México. Atmos. Environ. 41, 276–288. doi:10.1016/j.atmosenv.2006.08.034

Michael, S., Montag, M., Dott, W., 2013. Pro-inflammatory effects and oxidative stress in lung macrophages and epithelial cells induced by ambient particulate matter. Environ. Pollut. 183, 19–29. doi:10.1016/j.envpol.2013.01.026

Mohmand, J., Eqani, S.A.M.A.S., Fasola, M., Alamdar, A., Mustafa, I., Ali, N., Liu, L., Peng, S., Shen, H., 2015. Human exposure to toxic metals via contaminated dust: Bio-accumulation trends and their potential risk estimation. Chemosphere 132, 142–151. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.03.004

Møller, P., Danielsen, P.H., Karottki, D.G., Jantzen, K., Roursgaard, M., Klingberg, H., Jensen, D.M., Christophersen, D.V., Hemmingsen, J.G., Cao, Y., Loft, S., 2014. Oxidative stress and inflammation generated DNA damage by exposure to air pollution particles. Mutat. Res. Mutat. Res. 762, 133–166. doi:10.1016/j.mrrev.2014.09.001

Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T., Sawyer, J., 1985. Analysis of trifluorothymidine-resistant (TFTr) mutants of L5178Y/TK+/- mouse lymphoma cells. Mutat. Res. 151, 161–174.

Morgan, R.K., Taylor, E., 2004. Copper Accumulation in Vineyard Soils in New Zealand. Environ. Sci. 15693430 1, 139.

Nakamura, J., Swenberg, J.A., 1999. Endogenous Apurinic/Apyrimidinic Sites in Genomic DNA of Mammalian Tissues. Cancer Res. 59, 2522–2526.

Natarajan, A.T., Boei, J.J., Darroudi, F., Van Diemen, P.C., Dulout, F., Hande, M.P., Ramalho, A.T., 1996. Current cytogenetic methods for detecting exposure and effects of mutagens and carcinogens. Environ. Health Perspect. 104, 445–448.

Niu, J., Rasmussen, P.E., Hassan, N.M., Vincent, R., 2010. Concentration Distribution and Bioaccessibility of Trace Elements in Nano and Fine Urban Airborne Particulate Matter: Influence of Particle Size. Water. Air. Soil Pollut. 213, 211–225. doi:10.1007/s11270-010-0379-z

Nriagu, J.O., 1988. A silent epidemic of environmental metal poisoning? Environ. Pollut., Toxic Substance in the Environment 50, 139–161. doi:10.1016/0269-7491(88)90189-3

Nunes, T.V., Pio, C.A., 1993. Carbonaceous aerosols in industrial and coastal atmospheres. Atmospheric Environ. Part Gen. Top. 27, 1339–1346. doi:10.1016/0960-1686(93)90259-2

OCDE, 2014. Test No. 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

OECD, 2014a. Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

OECD, 2014b. Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing.

Oecd / Ocde, 1997. Essai n° 471: Essai de mutation réverse sur des bactéries. OECD Publishing / Éditions OCDE.

Oh, S.M., Kim, H.R., Park, Y.J., Lee, S.Y., Chung, K.H., 2011. Organic extracts of urban air pollution particulate matter (PM2.5)-induced genotoxicity and oxidative stress in human lung bronchial epithelial cells (BEAS-2B cells). Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen., 5th IWGT Meeting Report, August 17-19th, 2009, Basel, Switzerland 723, 142–151. doi:10.1016/j.mrgentox.2011.04.003

Oomen, A., Hack, A., Minekus, M., Zeijdner, E., Cornelis, C., Schoeters, G., Verstraete, W., Van de Wiele, T., Wragg, J., Rompelberg, C., Sips, A., Van Wijnen, J., 2002. Comparison of five in vitro digestion models to study the bioaccessibility of soil contaminants. Environ. Sci. Technol. 36, 3326–3334.

Orsière, T., De Méo, M., 2005. Toxicologie, Génotoxicité et Mutagenèse, 2nd ed. Alain Viala and Alain Botta.

Pakkanen, T.A., Loukkola, K., Korhonen, C.H., Aurela, M., Mäkelä, T., Hillamo, R.E., Aarnio, P., Koskentalo, T., Kousa, A., Maenhaut, W., 2001. Sources and chemical composition of atmospheric fine and coarse particles in the Helsinki area. Atmos. Environ. 35, 5381–5391. doi:10.1016/S1352-2310(01)00307-7

Patinha, C., Reis, A.P., Dias, A.C., Abduljelil, A.A., Noack, Y., Robert, S., Cave, M., Silva, E.F. da, 2014. The mobility and human oral bioaccessibility of Zn and Pb in urban dusts of Estarreja (N Portugal). Environ. Geochem. Health 37, 115–131. doi:10.1007/s10653-014-9634-3

Phillips, J.L., Singh, N.P., Lai, H., 2009. Electromagnetic fields and DNA damage. Pathophysiology, Electromagnetic Fields (EMF) Special Issue 16, 79–88. doi:10.1016/j.pathophys.2008.11.005

Pieniazek, S.N., Hingorani, M.M., Beveridge, D.L., 2011. Dynamical Allosterism in the Mechanism of Action of DNA Mismatch Repair Protein MutS. Biophys. J. 101, 1730–1739. doi:10.1016/j.bpj.2011.08.039

Poggio, L., Vrščaj, B., Schulin, R., Hepperle, E., Ajmone Marsan, F., 2009. Metals pollution and human bioaccessibility of topsoils in Grugliasco (Italy). Environ. Pollut. 157, 680–689. doi:10.1016/j.envpol.2008.08.009

Pohren, R. de S., Rocha, J.A.V., Leal, K.A., Vargas, V.M.F., 2012. Soil mutagenicity as a strategy to evaluate environmental and health risks in a contaminated area. Environ. Int. 44, 40–52. doi:10.1016/j.envint.2012.01.008

Pope III, C.A., Dockery, D.W., 2006. Health Effects of Fine Particulate Air Pollution: Lines that Connect. J. Air Waste Manag. Assoc. Air Waste Manag. Assoc. 56, 709–742.

Pope III C, Burnett RT, Thun MJ, et al, 2002. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. JAMA 287, 1132–1141. doi:10.1001/jama.287.9.1132

Putaud, J.-P., Raes, F., Van Dingenen, R., Brüggemann, E., Facchini, M.-C., Decesari, S., Fuzzi, S., Gehrig, R., Hüglin, C., Laj, P., Lorbeer, G., Maenhaut, W., Mihalopoulos, N., Müller, K., Querol, X., Rodriguez, S., Schneider, J., Spindler, G., Brink, H. ten, Tørseth, K., Wiedensohler, A., 2004. A European aerosol phenomenology—2: chemical characteristics of particulate matter at kerbside, urban, rural and background sites in Europe. Atmos. Environ. 38, 2579–2595. doi:10.1016/j.atmosenv.2004.01.041

Raes, F., Dingenen, R.V., Vignati, E., Wilson, J., Putaud, J.-P., Seinfeld, J.H., Adams, P., 2000. Formation and cycling of aerosols in the global troposphere. Atmos. Environ. 34, 4215–4240. doi:10.1016/S1352-2310(00)00239-9

Rasmussen, P., 2004. Can metal concentrations in indoor dust be predicted from soil geochemistry? Can. J. Anal. Sci. Spectrosc. 49, 166–174.

Rasmussen, P., Beauchemin, S., Nugent, M., Dugandzic, R., Lanouette, M., Chenier, M., 2008. Influence of matrix composition on the bioaccessibility of copper, zinc, and nickel in urban residential dust and soil. Hum. Ecol. RISK Assess. 14, 351–371.

Rasmussen, P.E., Levesque, C., Chénier, M., Gardner, H.D., Jones-Otazo, H., Petrovic, S., 2013. Canadian House Dust Study: Population-based concentrations, loads and loading rates of arsenic, cadmium, chromium, copper, nickel, lead, and zinc inside urban homes. Sci. Total Environ. 443, 520–529. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.11.003

Rasmussen, P.E., Subramanian, K.S., Jessiman, B.J., 2001. A multi-element profile of house dust in relation to exterior dust and soils in the city of Ottawa, Canada. Sci. Total Environ. 267, 125–140. doi:10.1016/S0048-9697(00)00775-0

Reis, A.P., Costa, S., Santos, I., Patinha, C., Noack, Y., Wragg, J., Cave, M., Sousa, A.J., 2015. Investigating relationships between biomarkers of exposure and environmental copper and manganese levels in house dusts from a Portuguese industrial city. Environ. Geochem. Health 1–20. doi:10.1007/s10653-015-9724-x

Reis, A.P., Patinha, C., Noack, Y., Robert, S., Dias, A.C., 2014. Assessing human exposure to aluminium, chromium and vanadium through outdoor dust ingestion in the Bassin Minier de Provence, France. Environ. Geochem. Health 36, 303–317. doi:10.1007/s10653-013-9564-5

Renkawitz, J., Lademann, C.A., Jentsch, S., 2014. Mechanisms and principles of homology search during recombination. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 15, 369–383. doi:10.1038/nrm3805

Risom, L., Møller, P., Loft, S., 2005. Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen., Linking Toxicology to Epidemiology: Biomarkers and New Technologies 592, 119–137. doi:10.1016/j.mrfmmm.2005.06.012

Rohr, A.C., Wyzga, R.E., 2012. Attributing health effects to individual particulate matter constituents. Atmos. Environ. 62, 130–152. doi:10.1016/j.atmosenv.2012.07.036

Roney, N., Osierb, M., Paikoff, S.J., Smith, C.V., Williamsa, M., de Rosa, C.T., 2006. ATSDR

evaluation of the health effects of zinc and relevance to public health. Toxicol. Ind. Health 22, 423–493.

Ruby, M.V. [b1] (analytic), Schoof, R. [b2] (analytic), Brattin, W. [b3] (analytic), Goldade, M. [b3] (analytic), Post, G. (analytic), Harnois, M. [b4] (analytic), Mosby, D.E. (analytic), Casteel, S.W. (analytic), Berti, W. [b5] (analytic), Carpenter, M. [b6] (analytic), Edwards, D. [b7] (analytic), Cragin, D. [b8] (analytic), Chappell, W. [b9] (analytic), 1999. Advances in evaluating the oral bioavailability of inorganics in soil for use in human health risk assessment (English). Env. Sci Technol 33, 3697–3705.

Salameh, D., Detournay, A., Pey, J., Pérez, N., Liguori, F., Saraga, D., Bove, M.C., Brotto, P., Cassola, F., Massabò, D., Latella, A., Pillon, S., Formenton, G., Patti, S., Armengaud, A., Piga, D., Jaffrezo, J.L., Bartzis, J., Tolis, E., Prati, P., Querol, X., Wortham, H., Marchand, N., 2015. PM2.5 chemical composition in five European Mediterranean cities: A 1-year study. Atmospheric Res. 155, 102–117. doi:10.1016/j.atmosres.2014.12.001

Saunders, W.S., Shuster, M., Huang, X., Gharaibeh, B., Enyenihi, A.H., Petersen, I., Gollin, S.M., 2000. Chromosomal instability and cytoskeletal defects in oral cancer cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97, 303–308.

Schärer, O.D., 2013. Nucleotide Excision Repair in Eukaryotes. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 5, a012609. doi:10.1101/cshperspect.a012609

Schilirò, T., Bonetta, S., Alessandria, L., Gianotti, V., Carraro, E., Gilli, G., 2015. PM10 in a background urban site: Chemical characteristics and biological effects. Environ. Toxicol. Pharmacol. 39, 833–844. doi:10.1016/j.etap.2015.02.008

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

Sharma, A.K., Jensen, K.A., Rank, J., White, P.A., Lundstedt, S., Gagne, R., Jacobsen, N.R., Kristiansen, J., Vogel, U., Wallin, H., 2007. Genotoxicity, inflammation and physico-chemical properties of fine particle samples from an incineration energy plant and urban air. Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen. 633, 95–111. doi:10.1016/j.mrgentox.2007.05.013

Simkhovich, B.Z., Kleinman, M.T., Kloner, R.A., 2008. Air Pollution and Cardiovascular Injury: Epidemiology, Toxicology, and Mechanisms. J. Am. Coll. Cardiol. 52, 719–726.

doi:10.1016/j.jacc.2008.05.029

Suen, W., Spiro, T.G., Sowers, L.C., Fresco, J.R., 1999. Identification by UV resonance Raman spectroscopy of an imino tautomer of 5-hydroxy-2'-deoxycytidine, a powerful base analog transition mutagen with a much higher unfavored tautomer frequency than that of the natural residue 2'-deoxycytidine. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96, 4500–4505.

Sun, Y., Zhuang, G., Tang, A.A., Wang, Y., An, Z., 2006. Chemical characteristics of PM2.5 and PM10 in haze-fog episodes in Beijing. Environ. Sci. Technol. 40, 3148–3155.

Szigeti, T., Mihucz, V.G., Óvári, M., Baysal, A., Atılgan, S., Akman, S., Záray, G., 2013. Chemical characterization of PM2.5 fractions of urban aerosol collected in Budapest and Istanbul. Microchem. J., XIV Hungarian - Italian Symposium on Spectrochemistry: Analytical Techniques and Preservation of Natural Resources, Sumeg (Hungary), October 5-7, 2011 107, 86–94. doi:10.1016/j.microc.2012.05.029

Tchounwou, P.B., Yedjou, C.G., Patlolla, A.K., Sutton, D.J., 2012. Heavy metal toxicity and the environment. EXS 101, 133–164. doi:10.1007/978-3-7643-8340-4_6

Teixeira, E.C., Mattiuzi, C.D.P., Agudelo-Castañeda, D.M., Garcia, K. de O., Wiegand, F., 2013. Polycyclic aromatic hydrocarbons study in atmospheric fine and coarse particles using diagnostic ratios and receptor model in urban/industrial region. Environ. Monit. Assess. 185, 9587–9602. doi:10.1007/s10661-013-3276-2

Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. Environ. Mol. Mutagen. 35, 206–221.

Tong, S.T.Y., Lam, K.C., 2000. Home sweet home? A case study of household dust contamination in Hong Kong. Sci. Total Environ. 256, 115–123. doi:10.1016/S0048-9697(00)00471-X

Tulve, N.S., Suggs, J.C., McCurdy, T., Cohen Hubal, E.A., Moya, J., 2002. Frequency of mouthing behavior in young children. J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol. 12, 259–264.

Tulve, N., Suggs, J., McCurdy, T., Cohen Hubla, E., Moya, J., 2002. Frequency of mouthing behavior in young children. J Expo Anal Env. Epidemiol 12, 259–264.

Turner, A., Simmonds, L., 2006. Elemental concentrations and metal bioaccessibility in UK household dust. Sci. Total Environ. 371, 74–81. doi:10.1016/j.scitotenv.2006.08.011

U.S. Environmental Protection Agency, 2008. Child-Specific Exposure Factors Handbook (No. EPA/600/R-06/096F). National Center for Environmental Assessment.

U.S. Environmental Protection Agency, 2000. TRW RECOMMENDATIONS FOR SAMPLING AND ANALYSIS OF SOIL AT LEAD (Pb) SITES.

Valavanidis, A., Fiotakis, K., Vlachogianni, T., 2008. Airborne particulate matter and human health: toxicological assessment and importance of size and composition of particles for oxidative damage and carcinogenic mechanisms. J. Environ. Sci. Health Part C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev. 26, 339–362. doi:10.1080/10590500802494538

Wang, W., Wu, F.-Y., Huang, M.-J., Kang, Y., Cheung, K.C., Wong, M.H., 2013a. Size fraction effect on phthalate esters accumulation, bioaccessibility and in vitro cytotoxicity of indoor/outdoor dust, and risk assessment of human exposure. J. Hazard. Mater. 261, 753–762. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.04.039

Wang, W., Wu, F., Zheng, J., Wong, M.H., 2013b. Risk assessments of PAHs and Hg exposure via settled house dust and street dust, linking with their correlations in human hair. J. Hazard. Mater. 263, Part 2, 627–637. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.10.023

Wang, X., Chancellor, G., Evenstad, J., Farnsworth, J.E., Hase, A., Olson, G.M., Sreenath, A., Agarwal, J.K., 2009. A Novel Optical Instrument for Estimating Size Segregated Aerosol Mass Concentration in Real Time. Aerosol Sci. Technol. 43, 939–950. doi:10.1080/02786820903045141

Watanabe, T., Hirayama, T., 2001. Genotoxicity of Soil. Journal of Health Science 47, 433–438. doi:http://doi.org/10.1248/jhs.47.433

Whitby, K.T., 1978. The physical characteristics of sulfur aerosols. Atmospheric Environ. 1967, Proceedings of the International Symposium 12, 135–159. doi:10.1016/0004-6981(78)90196-8

WHO, 2014. OMS | Qualité de l'air ambiant (extérieur) et santé [WWW Document]. WHO. URL http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs313/fr/ (accessed 7.10.15).

WHO, 1996. Trace elements in human nutrition and health (No. 532). World Health Organization, Geneva, Switzerland.

WHO Regional Office for Europe, 2006. Air quality guidelines: Global update 2005, Particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide. Indian J. Med. Res. 492.

WHO, World Health organization, 2013. IARC: Outdoor air pollution a leading env ironmental cause of cancer deaths.

Wragg, J. [b1] (analytic), Cave, M. [b1] (analytic), Nathanail, P. [b2] (analytic), 2007. A study of the relationship between arsenic bioaccessibility and its solid-phase distribution in soils from Wellingborough, UK. J. Environ. Sci. Health Part A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng., Bioaccessibility of soil contaminants (English) 42, 1303–1315.

Wragg, J., Cave, M., Basta, N., Brandon, E., Casteel, S., Denys, S., Gron, C., Oomen, A., Reimer, K., Tack, K., Van de Wiele, T., 2011. An inter-laboratory trial of the unified BARGE bioaccessibility method for arsenic, cadmium and lead in soil. Sci. Total Environ. 409, 4016–4030. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.05.019

Wyatt, M.D., Pittman, D.L., 2006. Methylating agents and DNA repair responses: methylated bases and sources of strand breaks. Chem. Res. Toxicol. 19, 1580–1594. doi:10.1021/tx060164e

Xue, W., Warshawsky, D., 2005. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: A review. Toxicol. Appl. Pharmacol. 206, 73–93. doi:10.1016/j.taap.2004.11.006

Yamamoto, M., Wakata, A., Aoki, Y., Miyamae, Y., Kodama, S., 2014. Chromosome loss caused by DNA fragmentation induced in main nuclei and micronuclei of human lymphoblastoid cells treated with colcemid. Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen. 762, 10–16. doi:10.1016/j.mrfmmm.2014.02.002

Yang, J., Xu, Z.-P., Huang, Y., Hamrick, H.E., Duerksen-Hughes, P.J., Yu, Y.-N., 2004. ATM and ATR: sensing DNA damage. World J. Gastroenterol. WJG 10, 155–160.

Yang, M., Jiang, L., Huang, H., Zeng, S., Qiu, F., Yu, M., Li, X., Wei, S., 2014. Dietary Exposure to Aluminium and Health Risk Assessment in the Residents of Shenzhen, China. PLoS ONE 9, e89715. doi:10.1371/journal.pone.0089715

Zhang, Q., Pi, J., Woods, C.G., Andersen, M.E., 2009. Phase I to II cross-induction of xenobiotic metabolizing enzymes: A feedforward control mechanism for potential hormetic responses. Toxicol. Appl. Pharmacol. 237, 345–356. doi:10.1016/j.taap.2009.04.005

Zheng, M., Wan, T.S.M., Fang, M., Wang, F., 1997. Characterization of the non-volatile organic compounds in the aerosols of Hong Kong— identification, abundance and origin.

Atmos. Environ. 31, 227–237. doi:10.1016/1352-2310(96)00173-2

Zhong, B.-Z., Gu, Z.-W., Wallace, W.E., Whong, W.-Z., Ong, T., 1994. Genotoxicity of vanadium pentoxide in Chinese hamster V79 cells. Mutat. Res. Toxicol. 321, 35–42. doi:10.1016/0165-1218(94)90118-X

Sites internet

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gcms_schematic.gif, vu le 23.9.2015

http://grasland.script.univ-paris-diderot.fr/STAT98/stat98_6/stat98_6.htm, vu le 30.10.2015

https://www.ohm-provence.org, vu le 6.10.2015

https://www.ohm-provence.org/spip.php?article424, vu le 10.12.2015

http://www.ohm-estarreja.cnrs.fr/, vu le 6.10.2015

http://www.senat.fr/rap/l00-261/l00-261123.html, vu le 27.8.2015

http://www.snv.jussieu.fr/vie/dossiers/dommages_adn/dommages_adn.html vu le 2.9.2015

Résumé

Les particules sont devenues une source d'exposition humaine préoccupante. Cela concerne les particules atmosphériques, mais aussi les particules de sol, que les jeunes enfants peuvent inhaler et ingérer. Nous avons étudié, au moyen des tests du micronoyau et des comètes *in vitro*, le potentiel génotoxique de particules atmosphériques et de sols prélevées au sein de deux Observatoires Hommes-Milieux : Bassin Minier de Provence (France) et Estarreja (Portugal). Nous avons démontré que les particules atmosphériques fines ($PM_{2.5}$) anthropiques issues des phénomènes de combustion étaient plus génotoxiques que celles produites par les industries minérales. Nous avons ensuite développé une nouvelle méthodologie associant la caractérisation chimique d'éléments potentiellement toxiques constitutifs de poussières de sols, leur bioaccessibilité et l'évaluation de leur génotoxicité. Nous avons enfin étudié l'impact génotoxique des fractions bioaccessibles de poussières de sol dans un lieu où nous avons documenté les caractéristiques des particules atmosphériques. Notre travail a permis d'identifier les relations entre le potentiel génotoxique *in vitro* des particules testées avec les sites de prélèvement, les sources émettrices de particules et leur composition chimique.

Mots clés

Génotoxicité, particules fines ($PM_{2.5}$), poussières de sol, caractérisation chimique, bioaccessibilité, pollution atmosphérique.

Abstract

The particles have become a major source concerning human exposure. This concerns the atmospheric particles, but also the soil particles, that young children can inhale and ingest. We investigated, using the micronucleus and comet assays *in vitro*, the genotoxic potential of atmospheric particles and soil dust collected in the Human-Environment Observatories: Provence Coal Field (France) and Estarreja (Portugal). We demonstrated that the fine atmospheric particles ($PM_{2.5}$) emitted after combustion were more genotoxic than the ones emitted by mineral industries. Then, we developed a new methodology combining the chemical characterization of potentially harmful components of soil dust, their bioaccessibility and the evaluation of their genotoxicity. We finally studied the genotoxic impact of bioaccessible fractions extracted from soil dust in a sampling site where we already studied the atmospheric particles. Our work allowed us to identify a link between the *in vitro* genotoxic potential of the tested particles and the sampling sites, the emission sources of particles and their chemical composition.

Keywords

Genotoxicity, fine particles ($PM_{2.5}$), soil dust, chemical characterization, bioaccessibility, atmospheric pollution.