



# PACTES-BMP : génotoxicité des particules atmosphériques fines (PM<sub>2,5</sub>)

*Thierry Orsière*

*Equipe Biogénotoxicologie, Santé Humaine et Environnement, IMBE*

Séminaire annuel de restitution de l'Observatoire Hommes-Milieus du Bassin Minier de Provence

Trets, le 05 octobre 2015

Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie marine et continentale

# Dangerosité des particules atmosphériques

## Sources naturelles



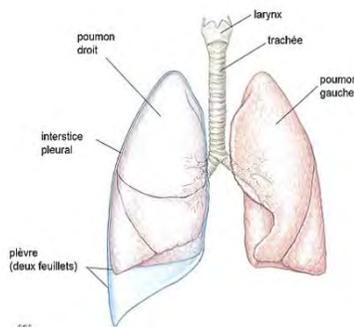
## Sources anthropiques



## Particules atmosphériques



## Impacts sanitaires multiples



*Altérations des fonctions respiratoires*



*Troubles cardio-vasculaires*



*Décès prématurés*

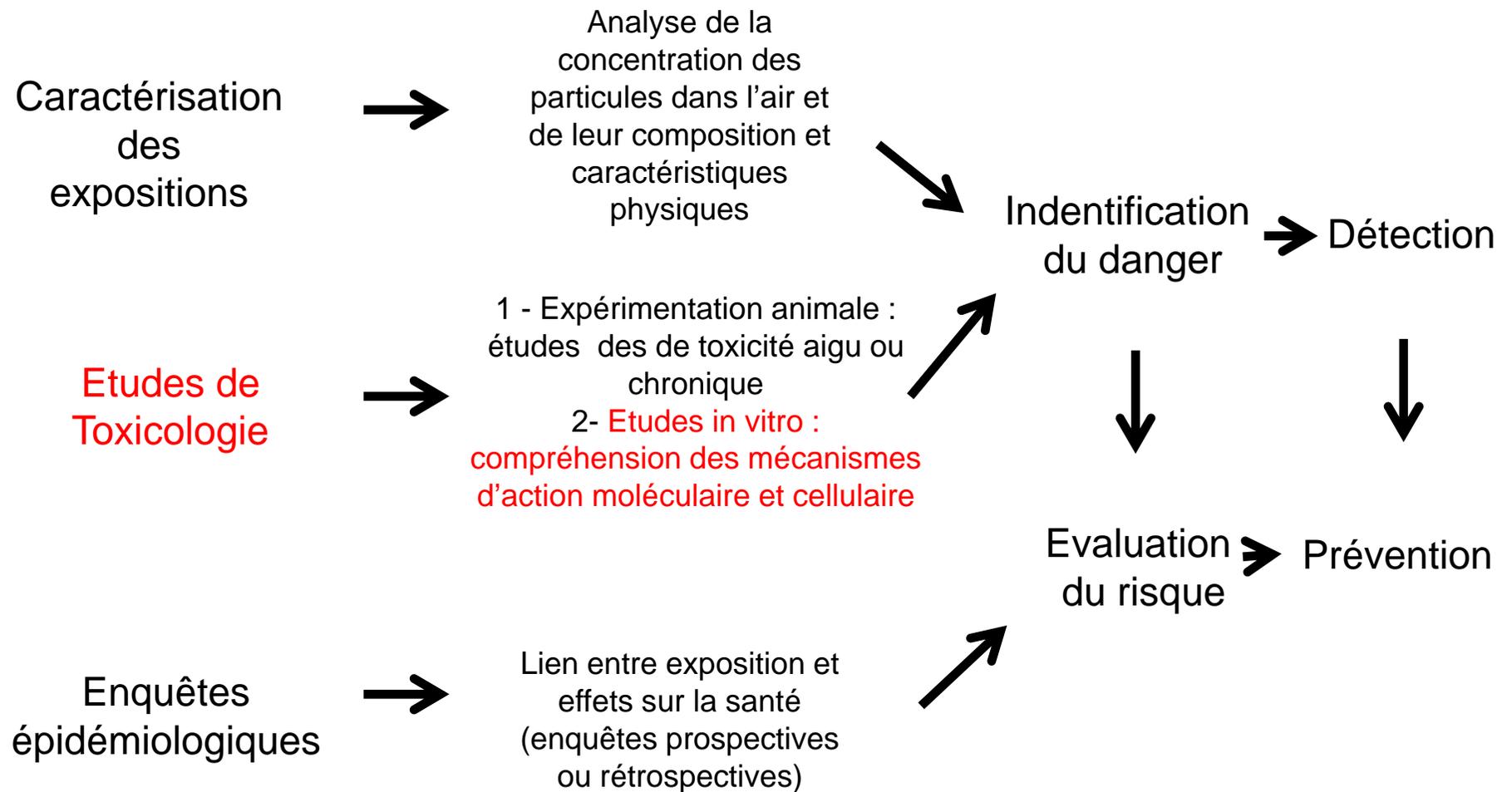
International Agency for Research on Cancer



World Health Organization

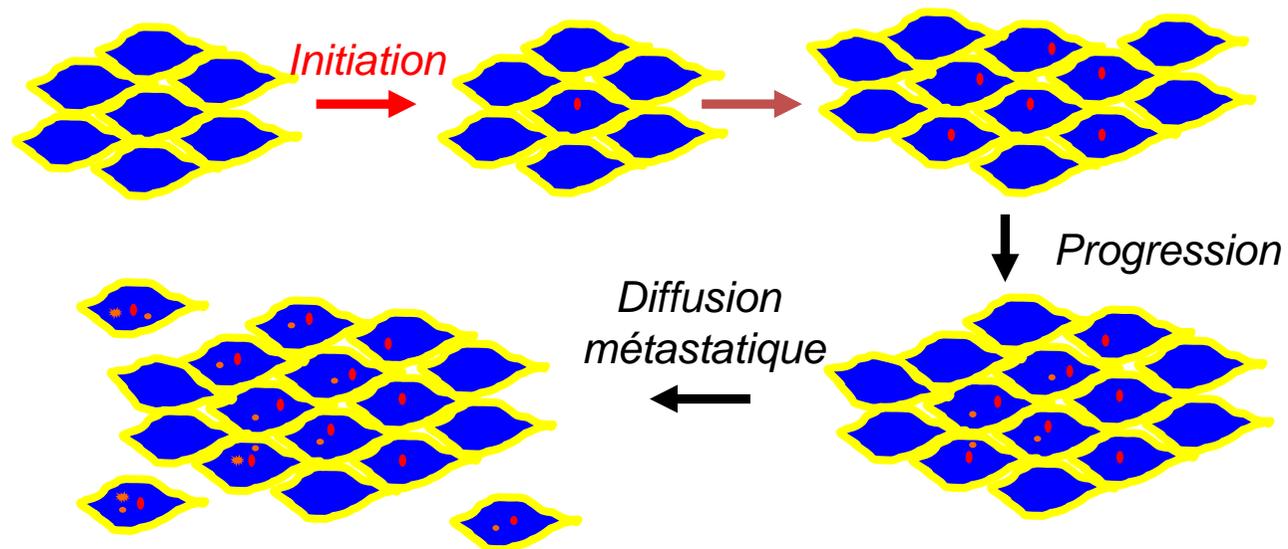
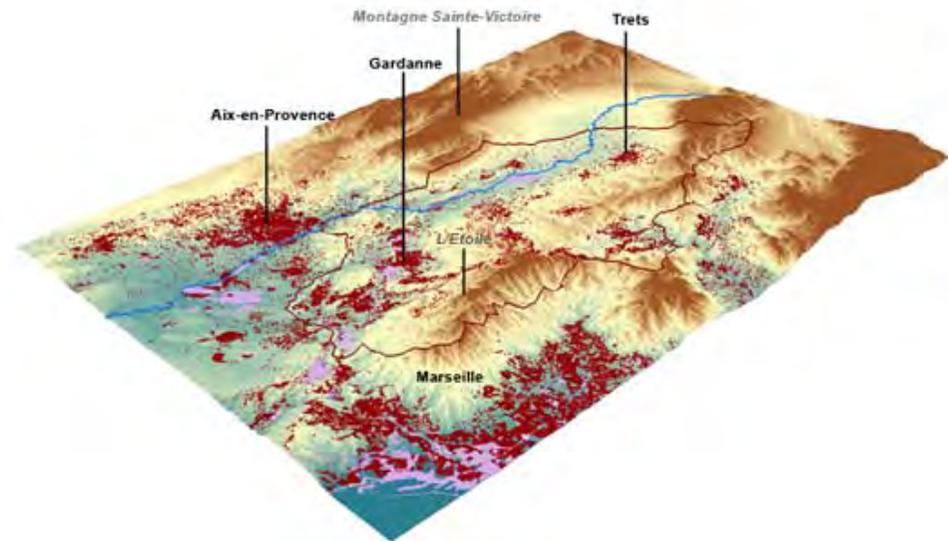
17 octobre 2013 : IARC : Particulate matter, a major component of outdoor air pollution, was evaluated separately and was also classified as carcinogenic to humans (Group 1).

# Approches des effets sur la santé des particules atmosphériques PM 2.5



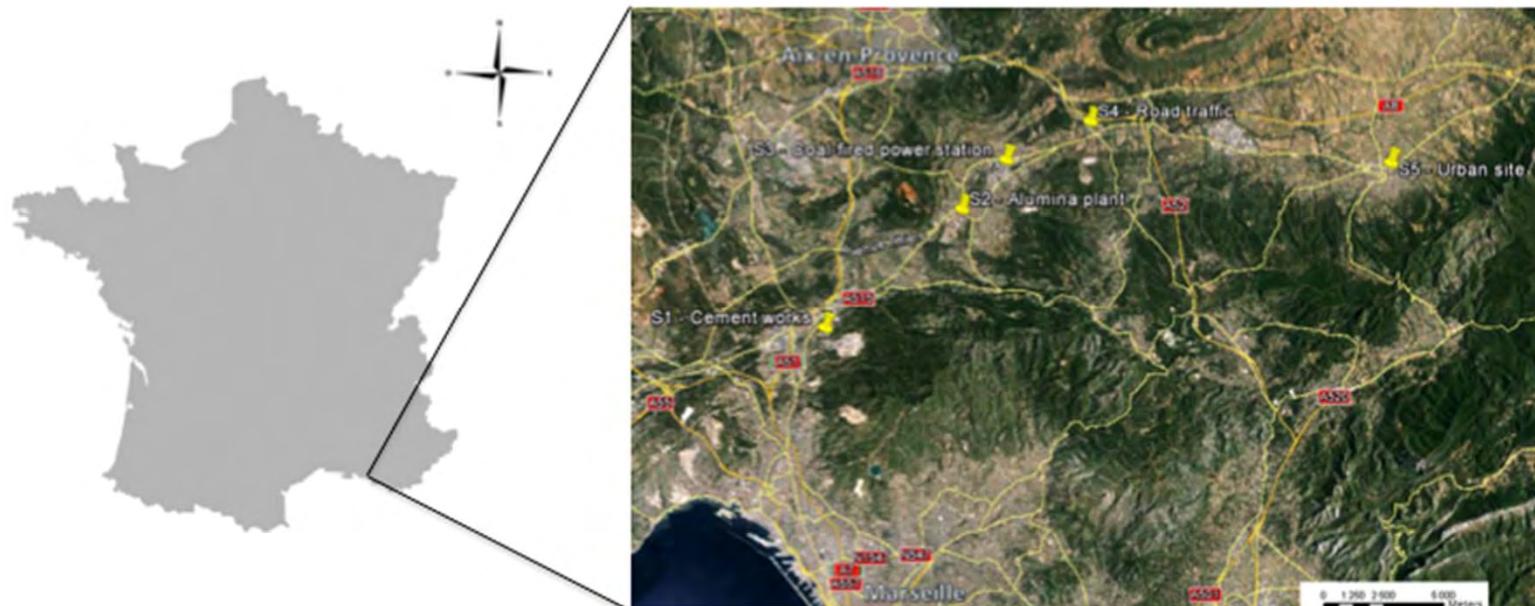
# Génotoxicité des PM2.5 sur le périmètre de l'OHM-BMP ?

- Industries minières
  - Cimenterie
  - Usine d'alumine
  - Centrale thermique
- Intense trafic routier
- Activités urbaines



# 5 sites d'études au sein de l'OHM - BMP

S1 : Bouc Bel Air (Cimenterie) - S2 : Gardanne (Usine d'Alumine) - S3 :  
Meyreuil (Centrale Thermique) –  
S4 : Fuveau (Trafic Routier) - S5 : Trets (Centre-Ville)



Contribution des industries minières , du trafic routier, des activités urbaines d'une ville de taille modeste

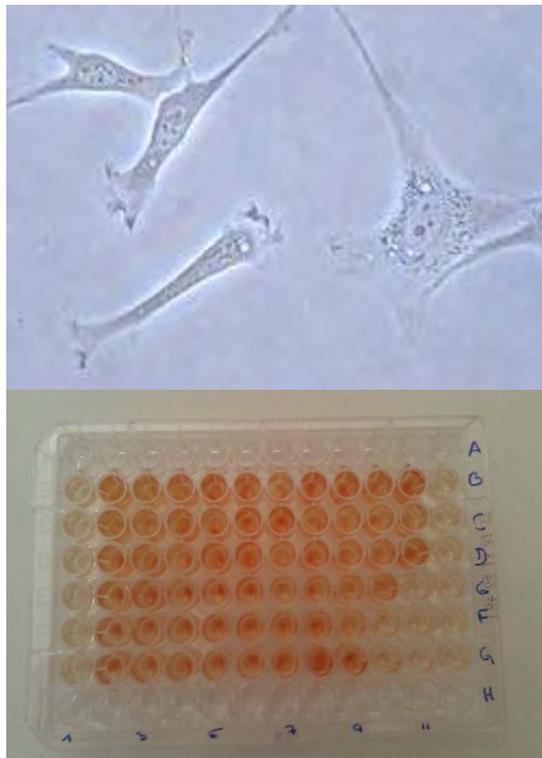
# Stratégies d'études

- Prélèvements des PM2.5 dans l'air extérieur pendant 2 campagnes été (juillet) et hiver (janvier) sur 5 sites différents
- Extraction chimique hydrophile et lipophile
- Caractérisation des 16 HAPs par CG-MS
- Caractérisation des minéraux et métaux principaux sur la phase hydrophile par ICP-MS
- Cyto – génotoxicité des phases hydrophiles et lipophiles (avec / sans activation métaboliques)

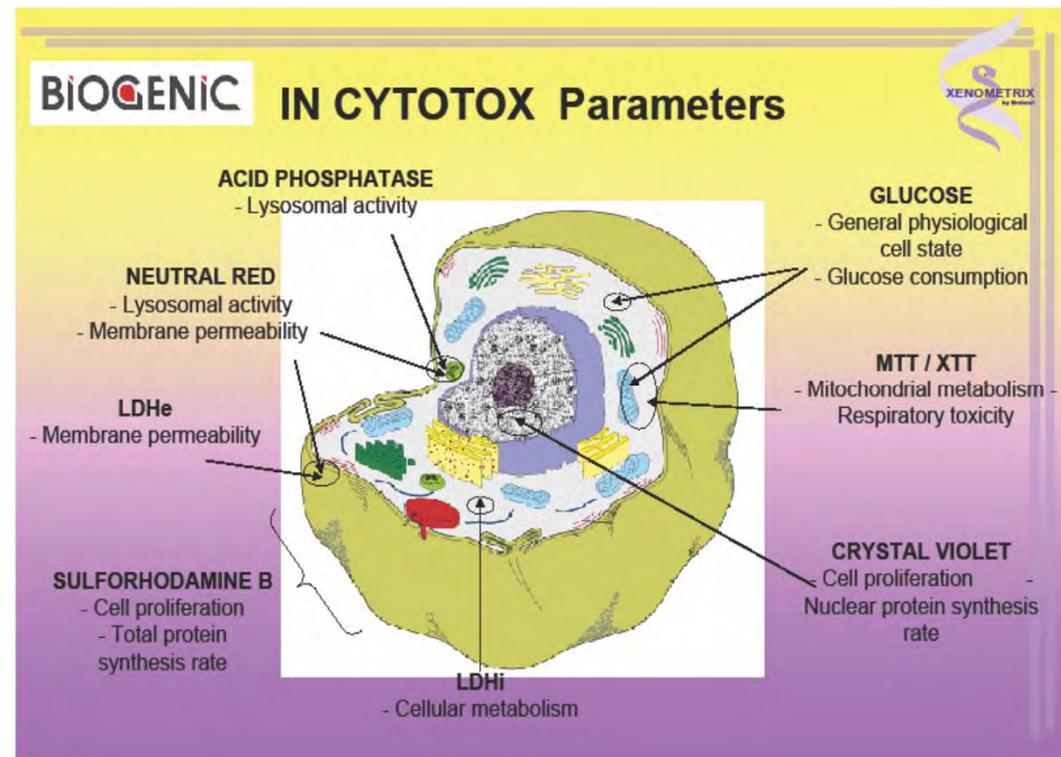


# Cyto- Toxicité des particules atmosphériques PM2.5 in vitro

Notre modèle d'étude :  
lignée de fibroblastes  
pulmonaires humains



Méthodes de détermination de la cytotoxicité



Détermination de concentration induisant une mortalité cellulaire (IC50)  
par le **LDH** et le **XTT**

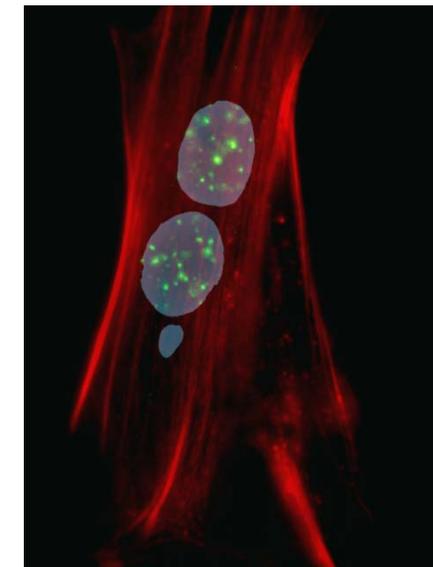
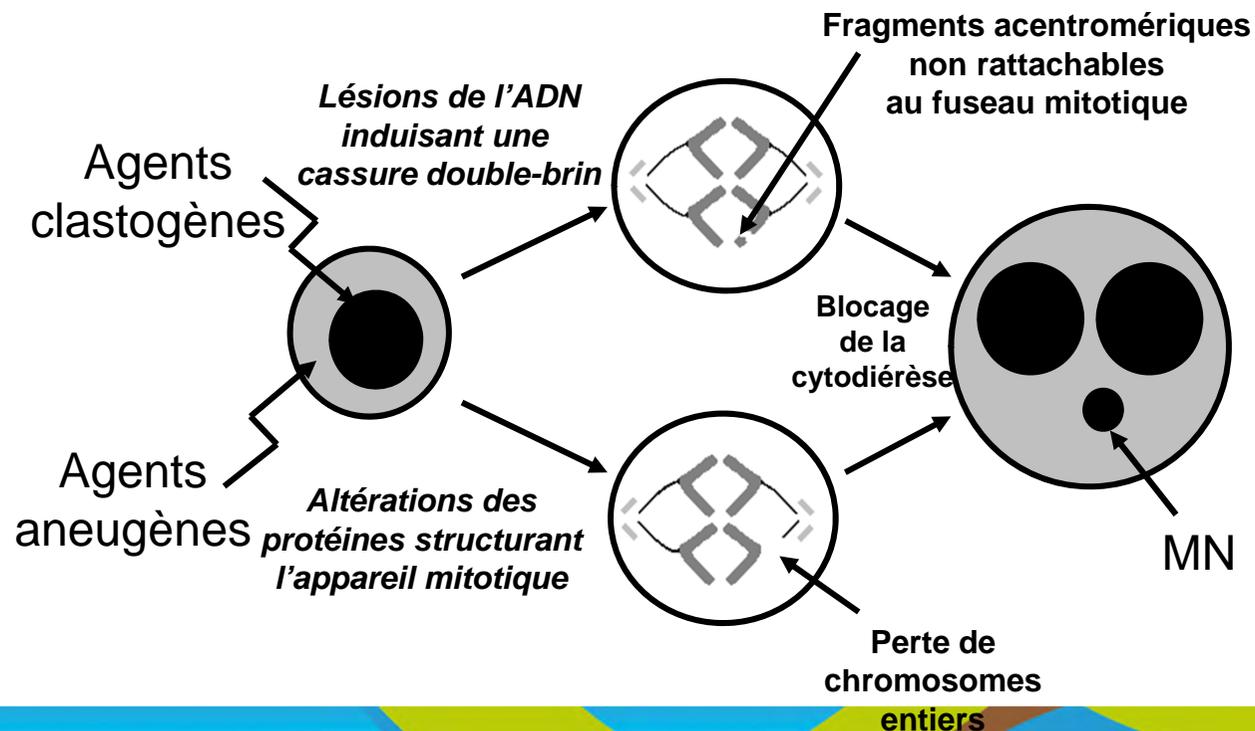
# Génotoxicité des particules atmosphériques PM2.5 in vitro

Détermination de la capacité des PM2.5 à induire des mutations au niveau de l'ADN (patrimoine génétique des cellules)



Génotoxicité : mécanismes d'action commun à la plupart des cancérogènes connus

Méthode : Test des micronoyaux

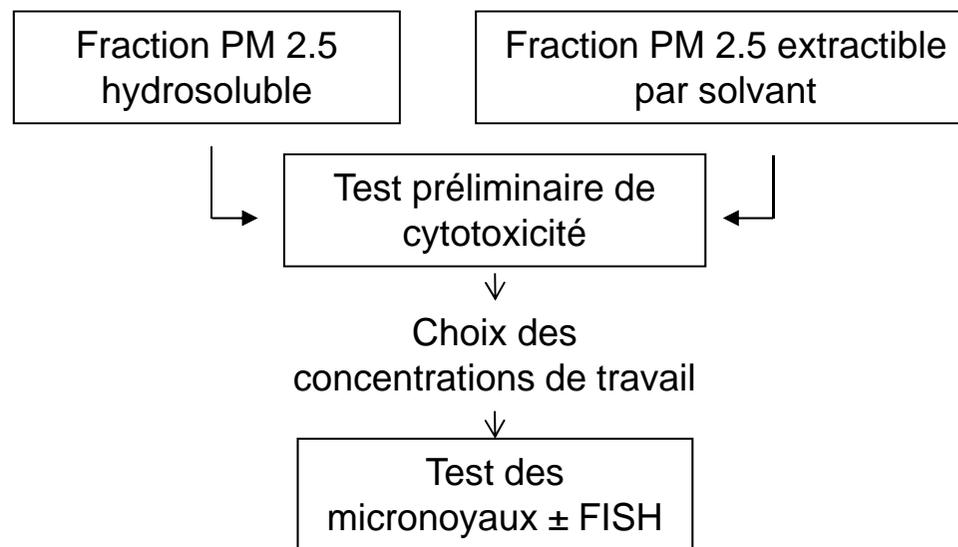
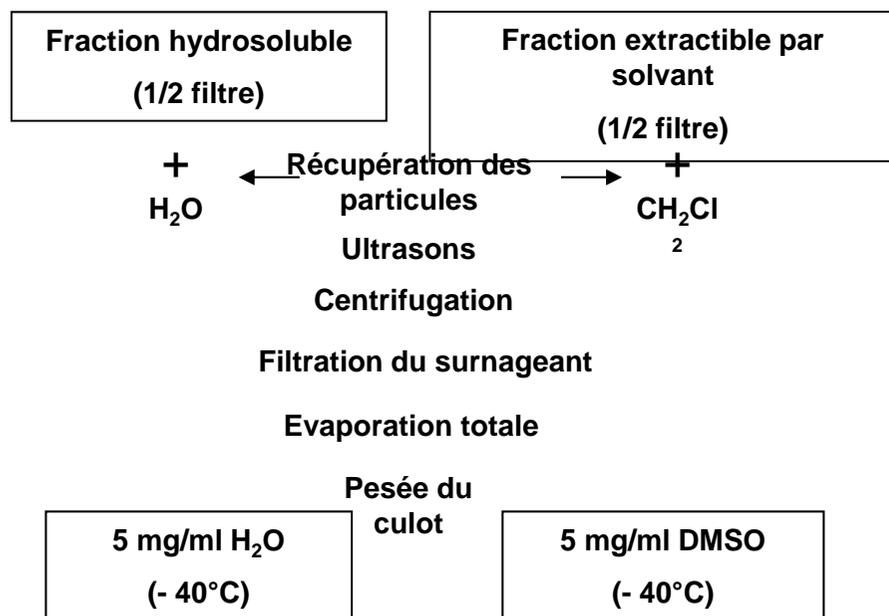


# Stratégie d'étude



→ Dosage des métaux par ICP-MS

→ Dosage des HAPs par GC-MS





# RESULTATS

# Concentration atmosphérique en PM2,5 ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )

	ETE	HIVER
S1 - Cimenterie	14	13
S2 – Usine d’Alumine	13	14
S3 – Centrale Thermique	15	12
S4 – Trafic Routier	13	28
S5 – Centre Ville	13	28

OMS : valeurs à ne pas dépasser en PM2,5 :

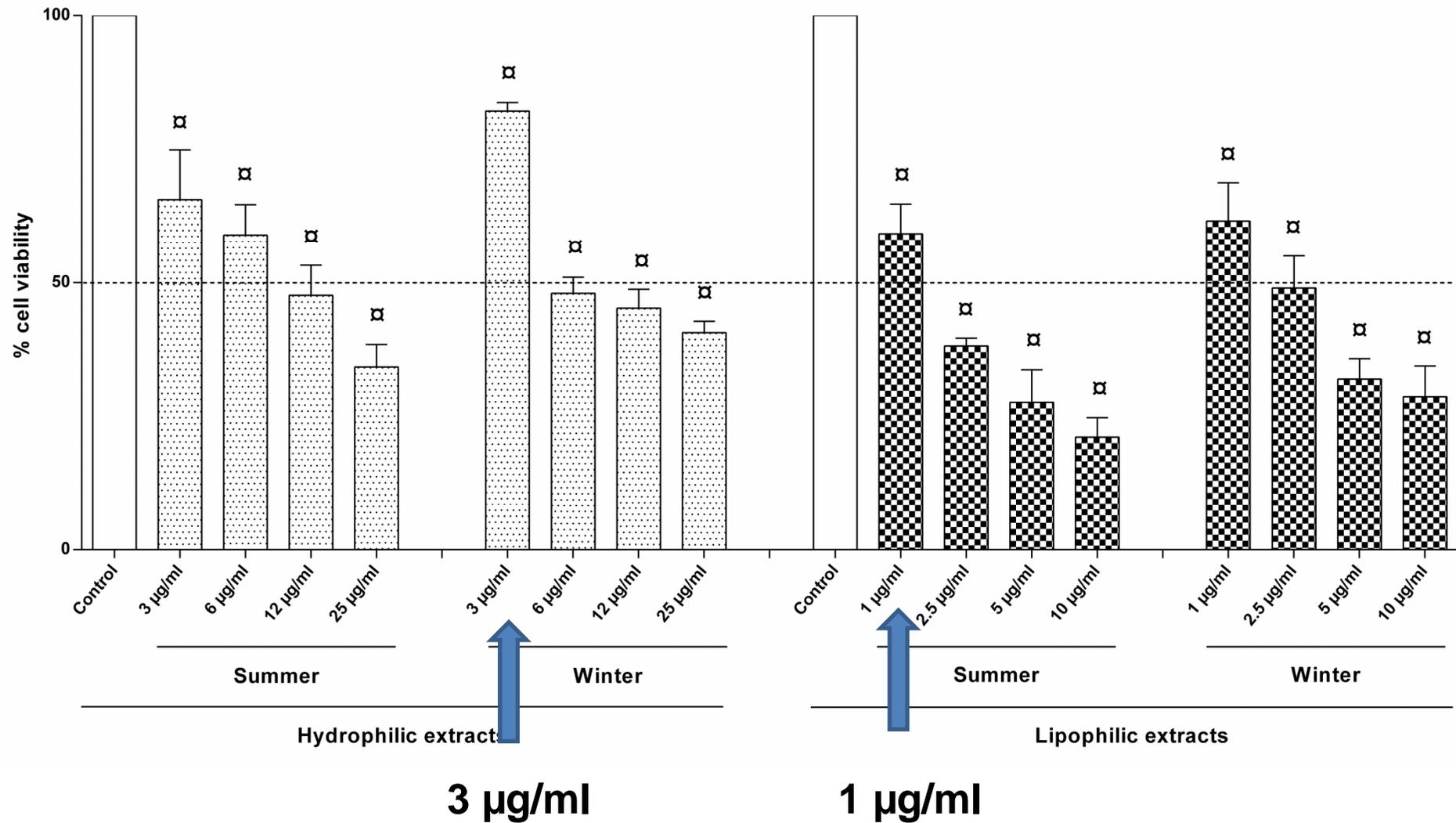
- 10  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  en moyenne annuelle ;
- 25  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  pour une période de 3 jours / an

Teneur en HAPs des PM2.5 (ng/m<sup>3</sup>)

	S1		S2		S3		S4		S5	
	Cimenterie		Usine d'Alumine		Centrale thermique		Trafic routier		Centre-ville	
	Summer	Winter	Summer	Winter	Summer	Winter	Summer	Winter	Summer	Winter
Naphthalene (2B)	ND	ND	ND	ND	0.002	0.001	ND	ND	0.008	ND
Acenaphthylene (3)	ND	ND	ND	ND	0.003	ND	ND	ND	ND	ND
Acenaphthene (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
<b>∑ PAHs</b>	<b>0.234</b>	<b>0.301</b>	<b>0.099</b>	<b>0.277</b>	<b>0.114</b>	<b>0.120</b>	<b>0.180</b>	<b>0.492</b>	<b>0.332</b>	<b>0.487</b>

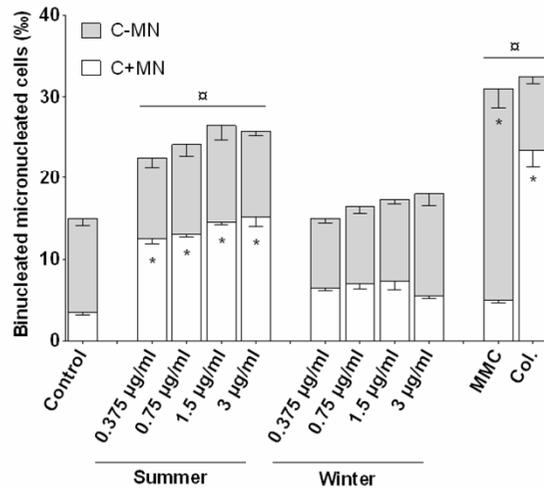
## Teneur en minéraux et métaux des phases hydrophiles

		S1		S2		S3		S4		S5	
		Cimenterie		Usine Alumine		Centrale Thermique		Traffc Routier		Centre-ville	
		Summer	Winter	Summer	Winter	Summer	Winter	Summer	Winter	Summer	Winter
Metals ng/m <sup>3</sup>	<b>Sodium</b>	427.8	391.	448.0	238.7	562.1	526.6	609.1	622.6	446.2	419.2
	<b>Aluminium</b>	ND	ND	110.1	ND	1.6	2.862	6.7	26.9	ND	4.5
	<b>Calcium</b>	625.3	396.7	960.9	358.1	1243.2	572.4	1708.6	2125.8	1738.6	1025.4
	<b>Titanium</b>	ND	ND	1.0	1.5	2.7	2.2	2.0	2.8	ND	ND
	<b>Vanadium</b>	0.4	0.1	0.3	0.3	0.3	2.8	0.4	0.1	0.1	0.1
	<b>Chromium</b>	0.2	0.4	1.1	0.3	0.8	0.4	2.2	0.9	0.8	0.7
	<b>Manganese</b>	0.7	3.6	0.8	0.4	1.5	0.8	1.6	2.4	1.3	2.0
	<b>Iron</b>	13.1	33.4	85.8	ND	67.0	14.8	79.4	138.5	56.4	22.6
	<b>Nickel</b>	0.1	0.9	1.2	0.3	0.8	2.5	0.8	0.3	1.1	0.9
	<b>Copper</b>	2.0	0.8	1.6	7.1	2.7	0.7	26.5	46.3	7.0	1.6
	<b>Zinc</b>	4.0	ND	10.4	ND	14.5	5.2	28.2	36.8	36.3	17.1
	<b>Molybdenum</b>	ND	ND	ND	0.1	ND	ND	0.1	0.2	ND	0.1
	<b>Lead</b>	2.1	2.0	0.9	1.7	1.4	6.5	2.1	2.8	4.5	1.5
<b>Σ Metals</b>		1076,2	829,5	1622,7	608,9	1899,0	1138,3	2468,2	3007,0	2292,7	1496,1

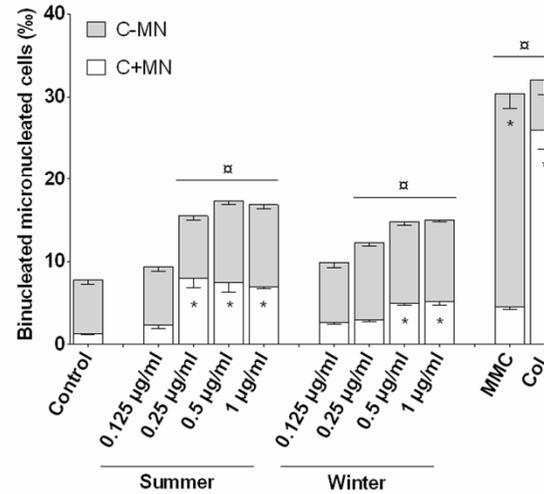


# Génotoxicité des phases hydrophiles et lipophiles : Site 1 (Cimenterie)

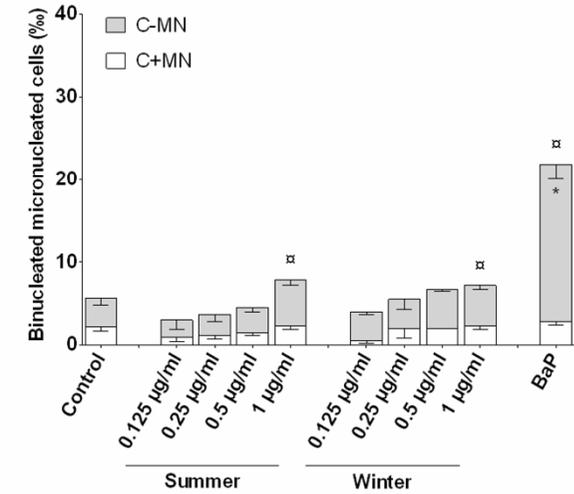
Hydrophilic extracts



Lipophilic extracts

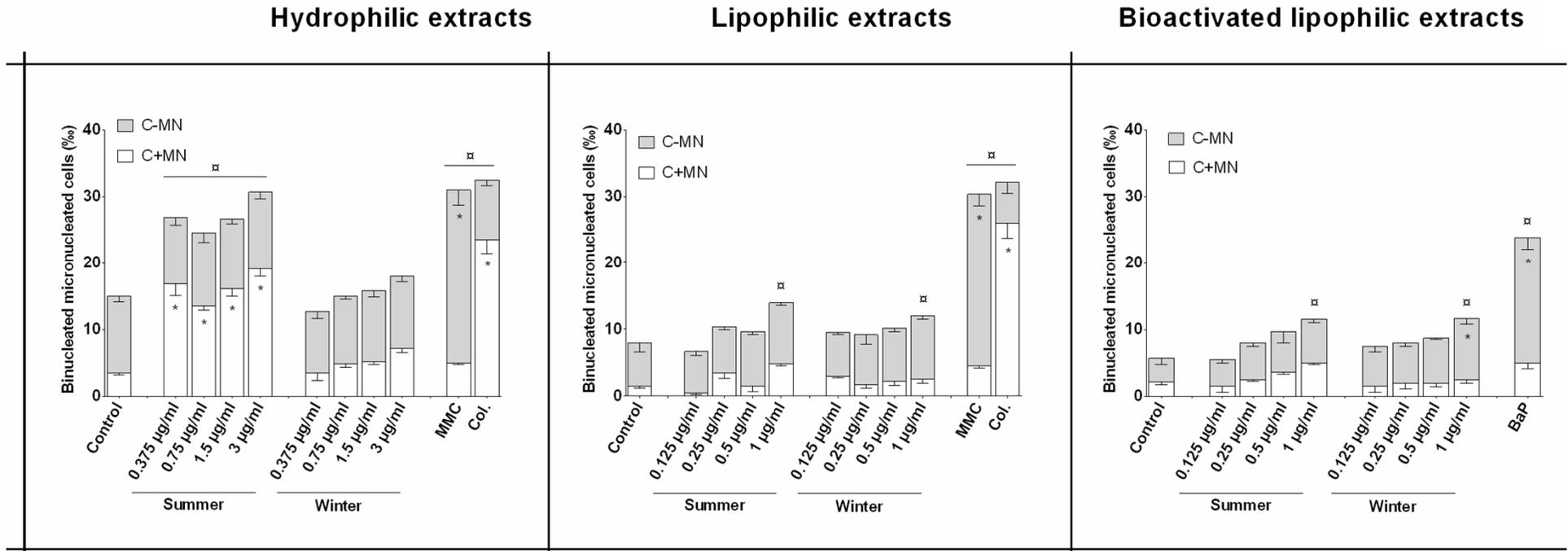


Bioactivated lipophilic extracts



Augmentation de micronoyaux notamment en été avec fraction hydrophile et lipophile  
Pas d'augmentation de C-MN

# Génotoxicité des phases hydrophiles et lipophiles : Site 2 (Usine d'Alumine)



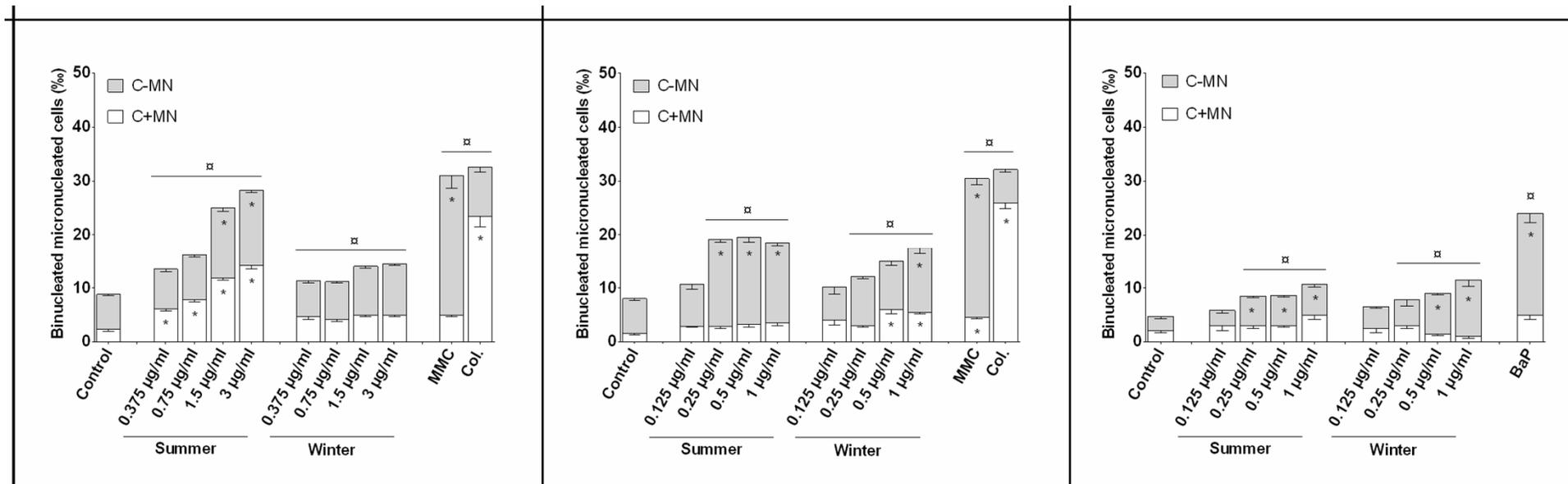
Augmentation de micronoyaux notamment en été avec fraction hydrophile  
Pas d'augmentation de C-MN à part à la plus forte concentration, en hiver,  
sur la fraction hydrophobe en présence d'activation métabolique

# Génotoxicité des phases hydrophiles et lipophiles : Site 3 (Centrale thermique)

Hydrophilic extracts

Lipophilic extracts

Bioactivated lipophilic extracts



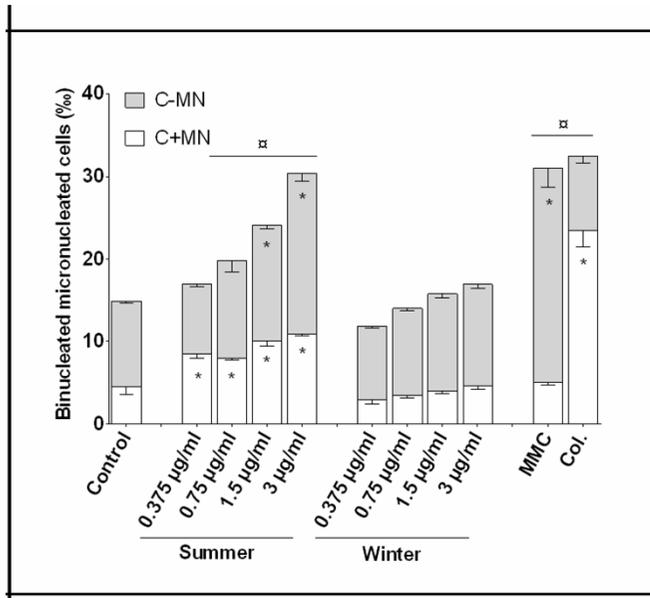
Augmentation de micronoyaux en hiver et en été avec toutes les fractions

Augmentation de C-MN

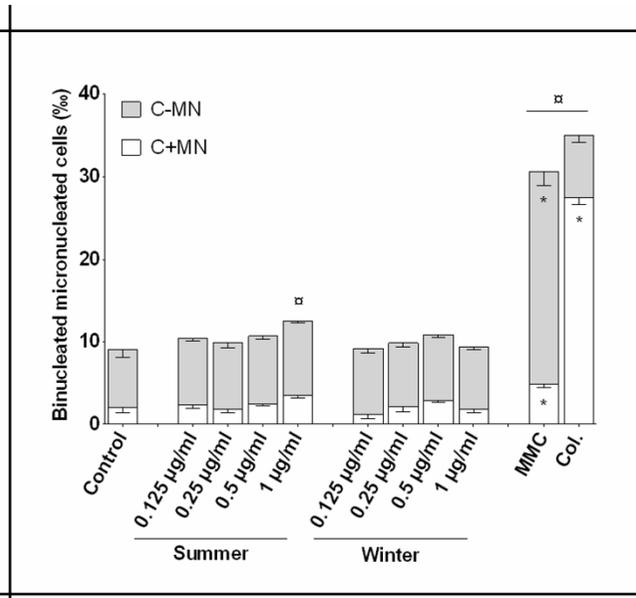
- avec les fractions hydrophiles en été,
- avec les fractions lipophiles principalement en été
- avec les fractions lipophiles en présence d'act. Métabolique en été et hiver

# Génotoxicité des phases hydrophiles et lipophiles : Site 4 (Trafic routier)

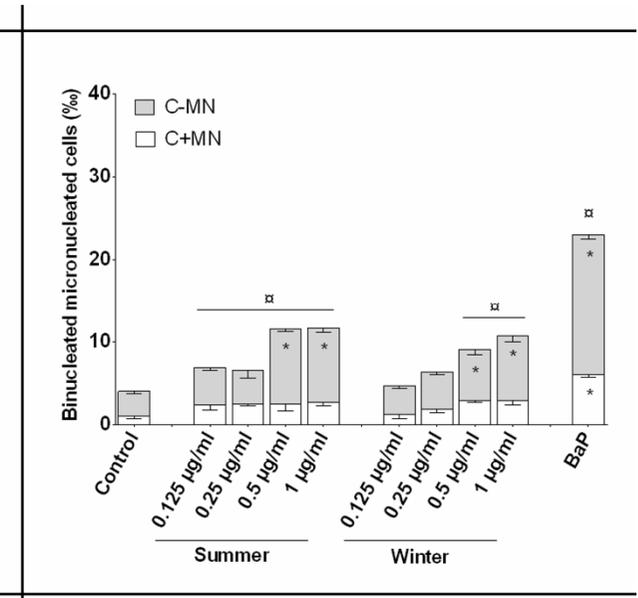
## Hydrophilic extracts



## Lipophilic extracts



## Bioactivated lipophilic extracts

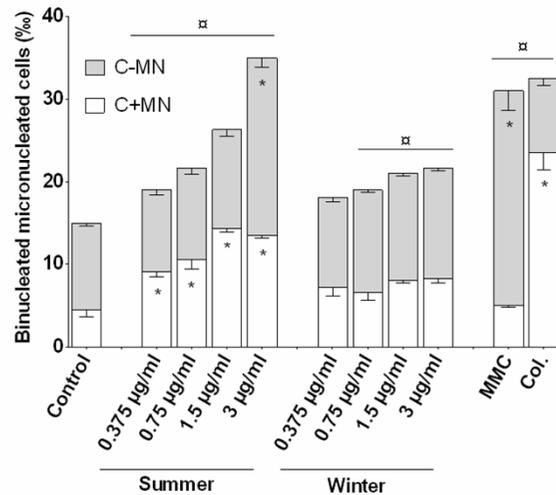


Augmentation de micronoyaux en été avec la fractions hydrophile, en été et hiver avec la fraction hydrophile et act. métabolique  
Augmentation de C-MN

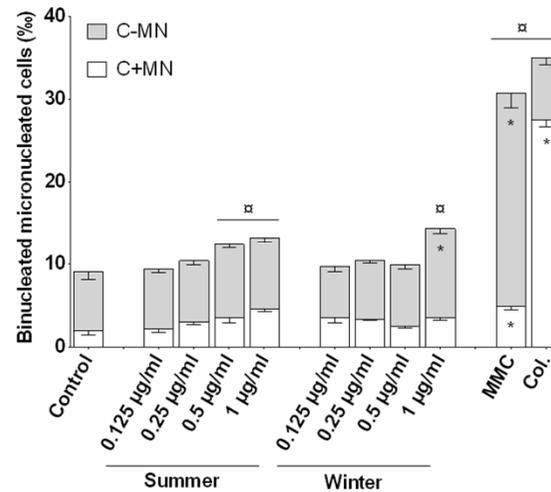
- avec les fractions hydrophiles en été,
- avec les fractions lipophiles en présence d'act. Métabolique en été et hiver

# Génotoxicité des phases hydrophiles et lipophiles : Site 2 (Usine d'Alumine)

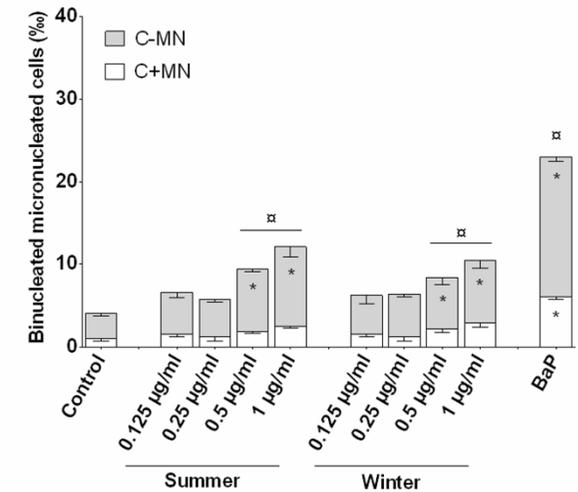
## Hydrophilic extracts



## Lipophilic extracts



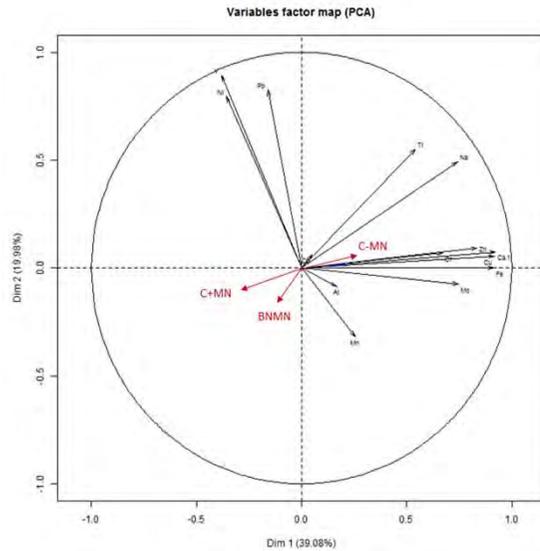
## Bioactivated lipophilic extracts



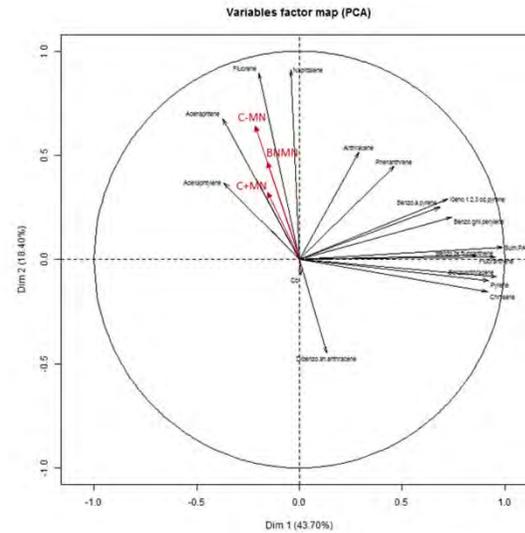
Augmentation de micronoyaux en hiver et en été avec toutes les fractions sauf en hiver avec la fraction hydrophile

Augmentation de C-MN

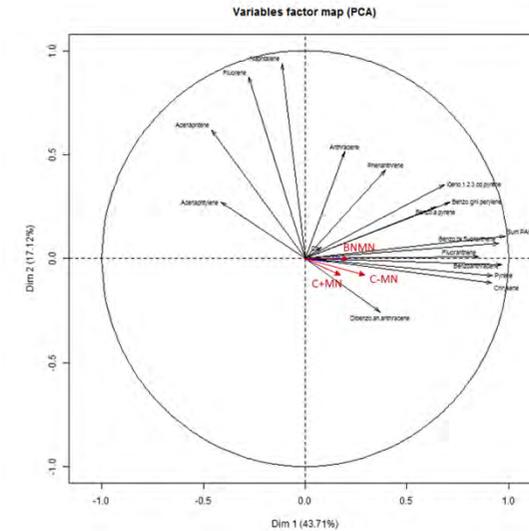
- avec les fractions hydrophiles en été,
- avec les fractions lipophiles en hiver
- avec les fractions lipophiles en présence d'act. Métabolique en été et hiver



Zn et Ca sont  
corrélés avec les C-  
MN



Sans activation  
métabolique,  
Acenaphtylène est  
corrélé avec toutes  
mutations  
chromosomiques ;  
Naphtalène avec  
BNMN



En présence  
d'activation  
métabolique,  
corrélacion entre  
BaP et C-MN

# Synthèse génotoxicité / phase

Sites	Phases	Eté			Hiver		
		Génotoxicité	Clastogénèse	Aneugénèse	Génotoxicité	Clastogénèse	Aneugénèse
Bouc-Bel-Air	hydrophile	oui	non	oui	non	non	non
	lipophile +S9	non	non	non	non	non	non
	lipophile -S9	oui		oui	oui	non	oui
Gardanne	hydrophile	oui	non	Oui	Non	non	non
	lipophile +S9	non	non	non	Non	oui	non
	lipophile -S9	non	non	non	Non	non	non
Meyreuil	hydrophile	oui	oui	oui	oui	non	non
	lipophile +S9	oui	oui	non	Oui	oui	non
	lipophile -S9	oui	oui	non	oui	oui	oui
Fuveau	hydrophile	oui	oui	oui	non	non	non
	lipophile +S9	oui	oui	non	oui	oui	non
	lipophile -S9	non	non	non	non	non	non
Trets	hydrophile	oui	oui	oui	oui	non	oui
	lipophile +S9	oui	oui	non	oui	oui	non
	lipophile -S9	oui	non	oui	Non	oui	non

# Synthèse génotoxicité

Sites	Eté			Hiver		
	Génotoxicité	Clastogénèse	Aneugénèse	Génotoxicité	Clastogénèse	Aneugénèse
Bouc-Bel-Air	oui	non	oui	oui	non	oui
Gardanne	oui	non	oui	oui	+	non
Meyreuil	oui	++	oui	oui	++	oui
Fuveau	oui	+++	oui	oui	+	non
Trets	oui	+++	oui	oui	++	oui

# Conclusion-1

- Sur un modèle de fibroblastes pulmonaires humains, nos tests in vitro révèlent, aux concentrations testées :
  - aucune propriété clastogène des fractions testées n'a été observé **sur le site de Bouc-Bel-Air ni en été, ni en hiver.**
  - **Le site de Gardanne** ne présente pas d'activité clastogène en été et qu'une **faible activité clastogène en hiver.**
  - **Une clastogénicité** des fractions testées en hiver et en été **sur les sites de Meyreuil, Fuveau et Trets**
- L'analyse de l'impact saisonnier site par site nous permet de formuler les remarques suivantes :
  - aucune incidence de la saison sur la génotoxicité n'est notée sur les sites 1, 3 et 5 ;
  - sur le site 2, un faible effet clastogène est observé l'hiver tandis que seul un effet aneugène est observé l'été ;
  - sur le site 4, le caractère clastogène des particules semble plus net en été, le caractère aneugène n'étant observé qu'en été.

# Conclusion-2

- **L'analyse cyto-génotoxique ne tient aucunement compte des niveaux d'exposition.**
  - En effet, quelle que soit la concentration en particules obtenue le jour du prélèvement sur l'un des cinq sites, nous avons testé le potentiel des fractions hydrophile et lipophile à générer des dommages chromosomiques *in vitro* pour des concentrations identiques en quantité de matière récupérée après extraction en milieu hydrophile ou lipophile.
- **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.**
- Il est donc tout à fait **possible qu'une source de particules fines spécifiquement émises sur un site bien défini et exempt de propriétés génotoxiques masque**, par effet de dilution, la génotoxicité des particules dont les sources sont communes à tous les sites.

## Conclusion - 3

- Aucune corrélation formelle n'a pu être établie sources d'émission, teneur en HAP et en métaux, et génotoxicité n'a été déterminé sur les prélèvements de particules.
- L'intérêt des bio-marqueurs est justement de révéler les effets potentiels des substances en mélange

# Conclusion-Perspectives

- la nature génotoxique des particules fines confirment **l'intérêt pour la santé des populations des stratégies de réduction des émissions particulaires** mises en place ces dernières années en région PACA.
- Analyser de **la génotoxicité des particules elles-mêmes** (sans séparer les fractions hydrophile et lipophile). En effet, des phénomènes d'additivité, d'antagonisme ou de synergie peuvent avoir lieu lorsque les cibles biologiques sont soumises à l'ensemble des espèces chimiques et au caractère particulaire de ces polluants environnementaux.
- **Analyser conjointement leur potentiel inflammatoire**, leur effet sur les mécanismes de **réparation de l'ADN**, et sur les **effets épigénétiques associés** : autant d'éléments de réponses récents et précieux pour affiner les conclusions de cette étude.
- Associer des études sur les poussières de sols sur ces mêmes OHM

# Remerciements

- Yves Noack
- Sophie Plumejeaud
  - Aurélie Bonnefoy
  - Virginie Tassistro
  - Dominique Robin
  - Pascale Lozano
    - Grégory Gille
    - Daniel Bley
    - Alain Botta
- ADEME / AFFSET (ANSES)
  - ECCOREV
- ARS-PACA / DREAL / REGION-PACA

*Merci de votre attention !*

*[thierry.orsiere@imbe.fr](mailto:thierry.orsiere@imbe.fr)*

# Conclusion



p. 30

Diapositive sans titre, pour images, diagrammes et visuels, avec fond en arrière plan