DIPLÔME NATIONAL DE DOCTORAT

(Arrêté du 25 mai 2016)

Date de la soutenance : **07 décembre 2021**

Nom de famille et prénom de l'auteur : **Monsieur LIMA DE ALBUQUERQUE Yuri Mateus**

Titre de la thèse : « *Quelles nanoparticules atmosphériques déclenchent des maladies de santé ?* »

Résumé

En 2017, environ 5 millions de personnes sont décédées prématurément à cause de la pollution de l'air selon l'étude Global Burden of Diseases, Injuries and Risk Factors Study 2017 (GBD). L'objectif de cette thèse était d'identifier quelles nanoparticules atmosphériques ont des effets négatifs sur la santé humaine, ainsi que leurs mécanismes d'action, mais aussi comment prévenir ses effets négatifs. Pour cela, deux types de particules ont été testés, le naphtalène (d'origine anthropique) et les particules de pollution issues de la combustion de biomasse (d'origine anthropique et biogénique). Trois méthodologies différentes sans marquage et en temps réel ont été utilisées pour évaluer la toxicité des particules atmosphériques. La première est l'analyse cellulaire en temps réel (RTCA), une méthodologie qui donne le *cell index* , reflétant principalement le nombre de cellules. La seconde est la microscopie à contraste de phase quantitatif (Holomonitor, PHI), un microscope qui utilise un laser de faible puissance pour surveiller et construire des images 3D servant de référence à tous les paramètres donnés par le système, tels que l'aire, le périmètre, la motilité et la migration. La dernière est la microscopie en temps réel à fond clair (Cytation, Biotek), utilisée pour l'imagerie cellulaire en temps réel. Des nanoparticules de naphtalène fraîches et d'autres ayant subi un vieillissement artificiel ont été testées à des concentrations de 25 et 50 µg/mL. Les deux types de nanoparticules étaient toxiques pour les cellules aux deux concentrations, diminuant leur *cell index*. Néanmoins, les nanoparticules fraîches de naphtalène se sont avérées plus toxiques que les mêmes particules oxydées, ce qui se traduit par une diminution du *cell index*. Le glutathion antioxydant à 1 mM protégeait partiellement ces cellules. Quatre sous-produits du naphtalène ont été testés sur le modèle de cellules pulmonaires A549. Les sous-produits étaient: la 1,4-naphtoquinone (1.4-NQ), testée à 10, 20, 30, 40, 50 et 100 µM, la 2-hydroxy-1,4-naphtoquinone (2-OH-NQ), l'acide phtalique (PA) et le phtaldialdéhyde (OPA) testés à 1, 2,5, 5, 7,5 et 10 mM. Les résultats montrent une CE50 de 31,8 µM pour 1,4-NQ, 5,3 mM pour 2-OH-NQ, 5,2 mM pour PA et 4,2 mM pour OPA. Le 1.4-NQ est le sous-produit le plus toxique, 100 fois plus que le naphtalène. Après que le milieu de culture dans lequel les produits chimiques ont été dissous ait été remplacé par un milieu de culture propre, les cellules traitées avec 25 µM de 1,4-NQ, 5 et 7,5 mM de PA et 2,5 d'OPA

ont pu récupérer leur *cell index*. Les cellules ont été évaluées avec Holomonitor pendant 10h. La 1.4-NQ et l'OPA ont diminué le volume optique, la migration, la motilité et la vitesse de motilité des cellules. 2-OH-NQ et PA n'ont induit aucun changement dans les paramètres cellulaires structurels et comportementaux. Puisque la 1,4-NQ est le produit chimique le plus toxique, d'autres études ont été menées pour comprendre son mécanisme d'action. Les résultats montrent que 1,4-NQ de 10 à 40 µM a augmenté le stress oxydatif (mesurée par coloration DHR) par rapport au témoin. Pour prévenir ses effets, l'antioxydant glutathion a été ajouté de deux manières différentes : mélangé avec de la 1.4-NQ à 20 µM pour une heure avant l'application sur les cellules ou pré-incubé pendant 15h et retiré avant l'ajout de la 1.4-NQ à 20 µM, tous deux à des concentrations de 2,5, 5, 7,5 et 10 mM. Dans les deux conditions, les cellules ont été protégées par du glutathion à des concentrations supérieures à 2,5 mM. La protection du glutathion a été prouvée par le nombre de cellules qui n'a pas diminué et la coloration au *zombie red* sur la cytometry en flux (fluorescence-activated single cell sorting, FACS), marquant la viabilité des cellules. Concernant le deuxième type de particules testées, trois types de particules de combustion de biomasse ont été testées aux concentrations de 31, 62, 125, 250 et 500 µg/mL : enflammées (FWS), combustion lente (SWS) et pyrolysées (PWS). Si l'on se réfère au cell index, les trois types de particules de combustion de biomasse étaient toxiques pour les cellules A549 aux concentrations de 125, 250 et 500 µg/mL. Après rinçage, parmi les trois concentrations qui étaient toxiques (125, 250 et 500 µg/mL) seules les cellules traitées au PWS à 125 µg/mL ont pu récupérer. Les cellules ont été évaluées avec Holomonitor pendant 10h. La vitesse de migration et la motilité des cellules étaient diminuées par SWS, FWS et PWS à 250 et 500 µg/mL, tandis que la motilité des cellules était diminuée par SWS et FWS à 250 et 500 µg/mL et PWS seulement à 500 µg/mL. SWS et PWS ont diminué l'épaisseur optique à 500 µg/mL, alors qu'ils ont augmenté le périmètre des cellules à la même concentration. La pyrolyse était légèrement moins toxique pour les cellules A549 que les deux autres types de particules hydrosolubles. La lignée cellulaire 3T3-L1 a été initialement utilisée pour tester la toxicité des nanoparticules de naphtalène, remplacée par la suite par le modèle de cellules pulmonaires A549. Les cellules 3T3-L1 étaient plus sensibles à 1,4 NQ que A549. Les méthodologies appliquées dans nos études ont également fait l'objet de comparaison. Le *cell index* donné par RTCA est directement lié à la surface occupée par les cellules résultant du nombre de cellules, de la taille des cellules et de l'adhésion cellulaire. Cependant, le système ne précise pas quel paramètre a été modifié. Pour répondre à cette question, Holomonitor a été utilisé pour compléter et mesurer la taille de la cellule afin de déterminer si cela était la raison des changements du *cell index* et Cytation a été utilisé pour obtenir des images des cellules pendant le traitement. De plus, Holomonitor et Cytation ont aussi leurs limites puisque les mesures sont effectuées sur un nombre limité de cellules. Pour résoudre cette limitation, FACS a été utilisé pour mesurer le nombre de cellules et la quantité de cellules. Ainsi, la présente étude a également ouvert la voie à davantage d'études toxicologiques, prouvant que les trois méthodes en temps réel et sans label (RTCA, Cytation et Holomonitor) sont parfaitement complémentaires pour évaluer la toxicité des nanoparticules et/ou des produits chimiques. La principale conclusion est que la toxicité des nanoparticules de naphtalène dépend de la 1,4-naphtoquinone et est conditionnée par le stress oxydatif. Les pics de pollution se produisant majoritairement en lien avec l'activité humaine, nos résultats recommandent d'augmenter la capacité anti-oxydante des cellules pour limiter l'effet délétère de la pollution, au moins celui dépendant du naphtalène.

Mots-clés : naphtalène, combustion de biomasse, 1,4-naphtoquinone, glutathion, RTCA, Holomonitor.