

Réponse à l'appel d'offre interne ECCOREV 2013

TOXICITE DES PARTICULES ATMOSPHERIQUES FINES (PM_{2.5}) DANS LES TERRITOIRES DES OBSERVATOIRES HOMMES-MILIEUX DU BASSIN MINIER DE PROVENCE ET D'ESTARREJA

Inscription dans les axes ECCOREV

Axe 3 : Ecodynamique et toxicologie environnementale,
Wafa Achouak (UMR 6191, CNRS – Aix-Marseille Université)

Equipes partenaires de la Fédération de recherche ECCOREV à l'origine de la demande

Thierry Orsière,
Equipe de Biogénotoxicologie, Santé Humaine et Environnement (BSHE)
IMBE (UMR 7263, CNRS – Aix-Marseille Université)

Yves Noack,
CEREGE (UMR 7330, CNRS - Aix-Marseille Université)

Coordinateur

Thierry Orsière,
Email : thierry.orsiere@imbe.fr
Tel : 04.91.32.45.48

Siège administratif : IMBE - UMR CNRS 7263 / IRD 237 - Faculté des Sciences
et Techniques St-Jérôme - Case 421 - Av. Escadrille Normandie Niémen -
F-13 397 Marseille cedex 20 - France - Tél : +33 (0)4 91 28 85 27 -
Fax : +33. (0)4 91 28 86 68 - www.imbe.fr

1. Contexte de la recherche

La pollution de l'air par les particules fines (PM_{2.5}; Particulate Matter inférieures à 2,5µm) est une préoccupation majeure de santé publique ayant conduit à l'instauration d'une réglementation forte.

Les PM_{2.5} représentent des risques sanitaires pour les populations se traduisant par une incidence accrue d'altération des fonctions pulmonaires, de pathologies cardiovasculaires, de cancers pulmonaires et une diminution de l'espérance de vie (APHEKOM, 2011). Elles agissent selon deux modes d'exposition, principalement par voie respiratoire et aussi par ingestion. Cette dernière concerne principalement les enfants, en particulier dans les cours d'écoles ou les aires de jeux.

Les territoires des OHM bassin minier de Provence et Estarreja (district d'Aveiro, au nord du Portugal) sont tous deux soumis à une pollution atmosphérique particulière importante, entraînant de nombreux dépassements de la réglementation européenne. Au cours du 1^{er} trimestre 2012, le seuil réglementaire en PM_{2.5} fixé à 50µg/m³, a déjà été dépassé 33 jours à Gardanne et 40 jours à Estarreja alors que la tolérance est de 35 jours par an. C'est également le cas pour l'ensemble des grosses agglomérations de la région PACA (Avignon, Marseille- Aix en Provence, Toulon, Nice et la zone urbano-industrielle Fos-Berre).

Ces dépassements sont une des raisons principales de la procédure de contentieux engagée contre la France et le Portugal par la Commission Européenne. Ils ont conduit les pouvoirs publics à mettre en place plusieurs programmes de réduction des émissions de particules afin de réduire l'exposition des populations.

Le bassin minier de Provence, situé entre Aix en Provence et Marseille, constitue un territoire caractéristique des espaces périurbains où la question de la pollution de l'air se pose de manière prégnante. Du sud-ouest au nord-est, sur environ 10 km, de nombreuses usines (cimenterie, production d'alumine et usine thermique) se succèdent. La zone est par ailleurs soumise à une circulation automobile dense, dépassant les 20 000 véhicules par jour. Ce territoire est également soumis aux influences des agglomérations de Marseille et d'Aix en Provence (près d'1,5 million d'habitants) et de la zone industrielle de Fos-Berre (une des plus importantes de France).

Le territoire d'Estarreja possède le deuxième plus important complexe d'industries chimiques du Portugal. Depuis plus d'un demi-siècle ce territoire subit les effets simultanés de rejets solides, liquides et gazeux dans l'environnement, influant sur les écosystèmes et les populations environnantes.

Dans ce contexte, le Labex DRIIHM (Dispositif de Recherche Interdisciplinaire sur les Interactions Hommes-Milieus) a octroyé une bourse doctorale d'une durée de 3 ans débutant le 1^{er} janvier 2013, à l'attention de Mlle Sophie Plumejeaud, sous la codirection de T. Orsière et Y. Noack.

Sophie Plumejeaud a réalisé son Master 2 Recherche en 2012 sur cette même problématique, en intégrant le projet PACTES-BMP (Particules Atmosphériques : Caractérisation, Toxicité et Evaluation Sociétale dans le Bassin Minier de Provence) qui a obtenu un soutien d'ECCOREV en 2012 (1).

Un article portant sur la génotoxicité des particules atmosphériques du bassin minier de Provence est en cours de rédaction. Il présente les résultats obtenus du test des micronoyaux centromériques, sur phase lipophile avec ou sans activation métabolique, et sur phase hydrophile. Cette étude a permis de mettre en évidence les mécanismes d'anomalies chromosomiques (aneugènes ou clastogènes) induits par les PM_{2.5} en fonction des sites de prélèvements du BMP et des saisons. Ces caractérisations fines des atteintes à l'ADN nous permettent d'établir des hypothèses quant aux risques pour la santé et quant aux espèces chimiques les plus préoccupantes, ce qui participera à la définition des stratégies de prévention les plus pertinentes à mettre en place.

Le projet de recherche objet de notre demande consiste à associer les approches de quantification des niveaux d'exposition physicochimiques, biogénotoxicologiques, afin d'appréhender sous différents aspects les problèmes de conversion de ces deux territoires fortement industrialisés.

Ce programme associe deux équipes d'Aix-Marseille Université : l'IMBE (UMR 7263, CNRS – Aix-Marseille Université) et le CEREGE (UMR 7330, CNRS – Aix-Marseille Université), l'Association Agréée de Surveillance de la Qualité de l'Air (AASQA), AirPACA, ainsi qu'au Portugal, des chercheurs du laboratoire Geociencias de l'Université d'Aveiro.

2. Objectif de recherche

Le présent projet a pour objectif d'associer caractérisation physico-chimique des particules fines et évaluation de la génotoxicité des phases hydrophiles et hydrophobes de ces particules au moyen de deux tests complémentaires de mutagenèse sur des cellules d'origine humaine. Très rares sont les travaux tentant d'apporter des informations relatives non seulement à la qualité et à la quantité des particules atmosphériques, mais également à leur nocivité compte tenu de leur diversité intrinsèque (particules nues ou enrobées de polluants chimiques) et extrinsèque (plusieurs sources d'émission de particules en un même lieu (ex : urbaine et industrielle).

Le travail sera consacré aux PM_{2.5} préoccupantes non seulement du fait de leur niveau d'exposition mais également du fait de leur potentiel à induire des dommages à l'ADN initiateurs de cancers. Différentes fractions seront étudiées isolément ou ensemble : phase particulaire *sensu stricto*, phase hydrosoluble, phase liposoluble.

L'étude de génotoxicité sera précédée d'une caractérisation fine des particules prélevées : distribution granulométrique, minéralogie, composition et spéciation de la phase minérale (en particulier des métaux lourds) et de la phase organique (en particulier des hydrocarbures aromatiques polycycliques). La caractérisation des effets génotoxiques fera appel à deux tests de mutagenèse *in vitro* : les tests de comètes et le test du micronoyau centromérique. Ces tests seront réalisés en présence et en absence d'un système d'activation métabolique afin de détecter les mutagènes directs et les pro-mutagènes, agents non mutagènes qui le deviennent sous l'effet des enzymes du métabolisme de phase I. Afin de permettre l'étude de l'impact particulaire en fonction des modes d'exposition par inhalation et digestif (lors du contact main-bouche préoccupant chez les enfants), il serait intéressant de comparer les tests de génotoxicité sur des cellules épithéliales pulmonaires et sur des cellules intestinales. Les résultats de génotoxicité ainsi obtenus pourront être croisés avec les travaux menés sur certaines pathologies (dans le cadre de l'OHM Estarreja ou de la zone de Fos-Berre) ainsi que sur les perceptions des pollutions sur la santé par les populations des territoires concernés.

Au total, notre projet s'inscrit dans la problématique de la caractérisation des dangers liés aux pollutions particulières, caractérisation indispensable à la définition des stratégies de prévention nécessaires pour diminuer le risque de survenue de pathologies induites à long terme par ces particules. Il appartient pleinement à la thématique environnement-santé et est à la fois pluridisciplinaire et pluri-OHM.

3. Réalisation et plan financier

Réalisation

Des campagnes de prélèvements de PM_{2.5} seront réalisées sur les territoires au cours de deux saisons (été/hiver) pour permettre de voir d'éventuelles variations inter saisonnières au niveau de la composition physico-chimique et des effets génotoxiques.

Le test des comètes et le test du micronoyau centromérique nous permettront d'étudier la partie génotoxicité et mutagenèse.

Le test du micronoyau centromérique permet de mesurer les anomalies chromosomiques de nombre, consécutives à un dysfonctionnement des structures protéiques impliquées dans la disjonction, la ségrégation et la migration des chromosomes au cours de la division cellulaire, et les anomalies chromosomiques de structure qui font suite à des cassures double-brins de l'ADN directes ou secondaires à des réparations par recombinaison de lésions sévères impliquant les deux brins de la molécule d'ADN.

Le test des comètes (ou *Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE)*) permet de mesurer les cassures de brins de l'ADN induites directement et indirectement, lors des processus enzymatiques de réparation des dommages ou lors de processus secondaires de fragmentation de l'ADN tel que l'apoptose. Son principal avantage consiste en la détection d'un large spectre de lésions primaires de l'ADN, y compris les lésions oxydatives, à la base de la survenue de substitution, d'addition ou de délétion d'une paire de base, lesquels événements constituent une mutation génique.

L'une des fortes originalités de notre étude sera de quantifier indépendamment ces trois types de phénomènes génotoxiques car la notion de seuil sans effet et donc de gestion du risque est clairement différente selon la nature des dommages à l'ADN.

Le financement ECCOREV nous permettrait de financer les prélèvements ainsi que les réactifs nécessaires à la réalisation des tests physicochimiques et de biogénotoxicologie.

Plan financier

Le financement de 6000 € demandé en réponse au présent appel d'offre ECCOREV sera réparti comme suit :

Descriptif des dépenses	Montant prévisionnel
Frais de personnel : thésarde pour 1 an	38 000 €
Réactifs et consommable de laboratoire	5500 €
Valorisation de la recherche (colloque, séminaires, réunions)	500 €
Total :	44 000 €
- ECCOREV	- 6000 €
- Labex DRIIHM	- 38 000 €

Ce travail fait actuellement l'objet d'une thèse d'Université financée par le Labex DRIIHM pour les trois prochaines années.

Plusieurs demandes de subvention sont envisagées ou en cours d'établissement : l'appel à projet de recherche de l'ANSES intitulé « Programme National de Recherche en Environnement-Santé-Travail » (PNR-EST), ainsi que l'appel à projet de recherche PACA 2013.

Une demande auprès du PHC Pessoa a été faite pour les échanges avec le Portugal

4. Interactions entre les équipes de l'IMBE, du CEREGE, de GEOCIENCIAS et d'AirPACA

L'interaction entre les équipes se fera grâce à diverses réunions permettant de :

- ❖ Construire une expertise scientifique pluraliste associant les différentes parties prenantes ;
- ❖ Identifier les espèces chimiques auxquelles sont imputables les effets génotoxiques clastogènes et aneugènes ;
- ❖ Définir de manière consensuelle ce qui constitue le risque environnemental lié aux PM_{2.5} dans le périmètre des zones étudiées.

5. Valorisation scientifique

Ce programme sera à l'origine d'une à plusieurs publications scientifiques internationales originales. Diverses communications seront également effectuées sur ce thème. Les chercheurs associés à ce programme s'engagent à faire apparaître ECCOREV dans l'ensemble de leur publications et communications.

6. Description du consortium

Liste des participants	Statut	% d'implication
Thierry Orsière	Ingénieur de recherche, Toxicologie Génétique, IMBE	40 %
Alain Botta	PU-PH, Directeur de l'équipe BSHE, IMBE	15 %
Yves Noack	Directeur de Recherche CNRS, Géochimie, CEREGE	30 %
Dominique Robin Gregory Gille Patricia Lozano	Directeur général, AirPACA Responsable pole mesure, AirPACA Ingénieur Environnement, AirPACA	10 %
Paula Marinho Carla Patinha	Enseignant-chercheur, Geociencias, Aveiro Chercheur, Geociencias, Aveiro	10 %
Sophie Plumejeaud	Doctorante 1 ^{ère} année, IMBE	100 %

Thierry Orsière est Ingénieur de Recherche et Habilité à Diriger les Recherches. Il travaille au sein de l'équipe Biogénotoxicologie, Santé Humaine & Environnement (dirigée par Alain Botta) de l'IMBE (UMR 7263, CNRS – Aix-Marseille Université). Ses thématiques de recherches s'inscrivent dans la caractérisation de la génotoxicité des environnements en lien avec le risque de cancers.

Publications en relation avec la thématique :

Auffan M., Rose J., **Orsière T.**, De Méo M., Thill A., Zeyons O., Chaurand P., Proux O., Wiesner M.R., Botta A., Bottero J-Y., (2009) – « Genotoxicity of CeO₂ nanoparticles towards human cells generated by surface redox processes » - *Nanotoxicology*, 3, 161-171 ;

Iarmarcovai G., Bonassi S., Botta A., Baan R.A., **Orsière T.**, (2008) – « Genetic polymorphisms and micronucleus formation: a review of the literature » - *Mutat. Res.* 658, 215–233 ;

Iarmarcovai G., Botta A. and **Orsière T.**, (2006) - « Number of centromeric signals in micronuclei and mechanisms of aneuploidy » - *Toxicol. Lett.*, 166, 1-10.

Yves Noack est Directeur de Recherche au CNRS, laboratoire CEREGE, UMR 7330. Ses thématiques de recherche sont la pollution atmosphérique particulaire et métaux lourds, la détermination et traçage des sources, les impacts sanitaires et environnementaux.

Publications en relation avec la thématique :

LE FLOCH M., **NOACK Y.**, ROBIN D., (2003) – « Emission sources identification in a vicinity of the municipal solid waste incinerator of Toulon in the South of France » - *J. Phys.*, 107, 727-730 ;

NOACK Y., LE FLOCH M., ROBIN D., (2003) – « Environmental impact of a cadmium atmospheric pollution at Marseille (South France) - *J. Phys.*, 107, 961-964.

SAMMUT M., ROSE J., MASION A., FIANI E., DEPOUX M., ZIEBEL A., HAZEMANN J-L., PROUX O., BORSCHNECK D., **NOACK Y.**, (2010) - « Speciation of Cd and Pb in dust emitted from sinter plant » - *Chemosphere*, 78, 445-450.

Patricia Lozano est Ingénieur d'études AirPACA, référant pour les études sur l'Est des Bouches du Rhône. Ses thématiques de recherche sont les nuisances olfactives et l'exposition des populations.

Publications en relation avec la thématique :

Atmo PACA, CPA, Région PACA (2009) - « Qualité de l'air en Pays d'Aix – 1ere phase Evaluation de la qualité de l'air et des émissions des principaux polluants sur toutes les communes du Pays d'Aix » ;

Atmo PACA (2009), « Inventaire d'émissions 2004 » - Pollution atmosphérique et GES ;

AIRMARAIX (2004), « Evaluation de la qualité de l'air ambiant dans le secteur de Gardanne/Simiane, en liaison avec l'activité d'Aluminium Pechiney ».

- (1) Le soutien apporté par ECCOREV en 2012 dans le cadre du projet PACTES-BMP a permis de quantifier la présence de centromère dans les micronoyaux et donc de définir les mécanismes d'action clastogéniques et aneugéniques des matières absorbés à la surface des particules dans le projet PACTES-BMP. Ces données sont actuellement en cours d'exploitation et feront l'objet d'une publication scientifique internationale de premier rang dont la soumission est programmé pour Mars 2013. Notre appartenance à ECCOREV sera bien évidemment mentionnée.

Liste des principales publications scientifiques émanant de l'équipe BSHE de l'IMBE (anciennement EA 1784) ayant fait mention d'ECCOREV au cours des 3 dernières années.

Roustan A, Perrin J, Berthelot-Ricou A, Lopez E, Botta A, Courbiere B. Evaluating methods of mouse euthanasia on the oocyte quality: cervical dislocation versus isoflurane inhalation. *Lab Anim.* **2012**, 46(2):167-9.

Berthelot-Ricou A, Perrin J, di Giorgio C, de Meo M, Botta A, Courbiere B. Assessment of 1,2-propanediol (PrOH) genotoxicity on mouse oocytes by comet assay. *Fertil Steril.* **2011**, 96(4):1002-7.

Benameur L, Orsière T, Rose J, Botta A. Detection of environmental clastogens and aneugens in human fibroblasts by cytokinesis-blocked micronucleus assay associated with immunofluorescent staining of CENP-A in micronuclei. *Chemosphere.* **2011**, 84(5):676-80.

Berthelot-Ricou A, Perrin J, Di Giorgio C, De Meo M, Botta A, Courbiere B. Comet assay on mouse oocytes: an improved technique to evaluate genotoxic risk on female germ cells. *Fertil Steril.* **2011**, 95(4):1452-7.

Bonnefoy A, Chiron S, Botta A. Environmental nitration processes enhance the mutagenic potency of aromatic compounds. *Environ Toxicol.* **2012**, 27(6):321-31.

Aye M, Di Giorgio C, De Mo M, Botta A, Perrin J, Courbiere B. Assessment of the genotoxicity of three cryoprotectants used for human oocyte vitrification: dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propylene glycol. *Food Chem Toxicol.* **2010**, 7:1905-12.

Liu W, Chaspoul F, Botta C, De Méo M, Gallice P. Bioenergetics and DNA alteration of normal human fibroblasts by hexavalent chromium. *Environ Toxicol Pharmacol.* **2010**, 29(1):58-63.

De Fleurian G, Perrin J, Ecochard R, Dantony E, Lanteaume A, Achard V, Grillo JM, Guichaoua MR, Botta A, Sari-Minodier I. Occupational exposures obtained by questionnaire in clinical practice and their association with semen quality. *J Androl.* **2009**, 30(5):566-79.

Botta C, Di Giorgio C, Sabatier AS, De Méo M. Effects of UVA and visible light on the photogenotoxicity of benzo[a]pyrene and pyrene. *Environ Toxicol.* **2009**, 24(5):492-505.