

**Mécanismes d'action des anomalies chromosomiques induites par les
particules PM2.5 dans le cadre du programme PACTES-BMP
(Particules Atmosphériques: Caractérisation, Toxicité et Évaluation
Sociétale dans le Bassin Minier de Provence)**

Inscription dans les axes ECCOREV

Axe 3 : Ecodynamique et toxicologie environnementale

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

Alain Botta,
Equipe Biogénotoxicologie, Santé Humaine et Environnement
IMBE (UMR 7263– CNRS– Aix-Marseille Université)
Yves Noack, CEREGE (UMR 7330, CNRS – Aix-Marseille Université)

Coordinateur

Thierry Orsière
thierry.orsiere@univ-amu.fr
04.91.32.45.48

1. Contexte de la recherche

L'impact sanitaire des particules dans l'air ambiant est une problématique actuelle du fait de l'absence de seuil, de la prépondérance de l'exposition chronique sur l'exposition de pointe, des inégalités d'exposition aux polluants en fonction des lieux d'habitats, des sensibilités particulières, et du manque de données sur les caractéristiques physico-chimiques des différents types de particules, en particulier celles issues de sources de non combustion.

Le bassin minier de Provence constitue un territoire caractéristique des espaces périurbains où la question de la pollution de l'air se pose de manière forte. Ce bassin, traversé par plusieurs axes routiers majeurs (plus de 20 000 véhicules/jour), eux-mêmes générateurs de nuisances, concentre une population grandissante de plus de 45 000 habitants, des zones d'emploi dynamiques et diverses industries, situées tout à proximité voire au cœur des zones d'habitations, parmi lesquelles une cimenterie, une usine de production d'alumine et une centrale électrique thermique au charbon.

La station d'AIRPACA, située dans le centre de Gardanne et à proximité immédiate de l'usine d'alumine enregistre actuellement un niveau moyen de PM10 voisin de la valeur limite annuelle ($39 \mu\text{g}/\text{m}^3$ au lieu de 40 en 2011) et d'autre part un nombre de dépassements de la valeur limite journalière très au dessus de la réglementation ($79 \mu\text{g}/\text{m}^3$ au lieu de 35 en 2011). Différentes études antérieures ont montré que l'impact de certaines sources est beaucoup plus étendu que communément admis.

Dans ce contexte, un programme intitulé PACTES-BMP (Particules Atmosphériques : Caractérisation, Toxicité et Évaluation Sociétale - Bassin Minier de Provence) a été lancé en 2010 pour une durée de 3 années. Ce programme est financièrement soutenu par l'ADEME (80%), les Ciments Lafarge, l'usine de production d'Alumine Rio Tinto Alcan, la centrale électrique thermique au charbon SNET et la Communauté du Pays d'Aix.

Ce programme, qui associe **deux équipes de Sciences dures**, le CEREGE (UMR 7330, CNRS – Aix-Marseille Université) et l'IMBE (Equipe Biogénotoxicologie, Santé Humaine et Environnement ; UMR 7263–CNRS ; FR CNRS 3098 - Aix-Marseille Université), **une équipe de Sciences Humaines et Sociales**, ESPACE (UMR 6012, CNRS – Aix-Marseille Université) et **un partenaire privé**, AIRPACA, a d'ores et déjà accumulé des données entrant dans (i) la caractérisation physico-chimique fine des particules inhalables (PM10 et PM2.5) émises par les principales sources industrielles et routières, (ii) la définition de leur cytotoxicité et génotoxicité, et (iii) la perception et représentation du risque sanitaire (pathologie, agent, milieu).

Les résultats d'ores et déjà acquis à la suite de deux campagnes de prélèvement sur 5 sites (3 sites industriels : la Cimenterie de Bouc Bel Air, l'usine d'alumine de Gardanne, la centrale thermique de Meyreuil ; 1 site de trafic routier à Fuveau ; 1 site urbain à Trets) renseignent d'une part, de la nature minérale et/ou organique des particules et des molécules qui s'y adsorbent. Parallèlement, la positivité des tests de cytogénotoxicité effectués sur les phases hydrophiles et hydrophobes de certains prélèvements nous informe de la dangerosité potentielle de ces particules en fonction des sites et des saisons. Sur la base des premières observations, il apparaît plus que pertinent d'avoir associé approches physico-chimiques et toxicologiques, du fait de l'absence d'association évidente entre telle composition et telle réponse génotoxique

2. Projet de recherche

De très nombreuses données en termes de caractérisation physico-chimiques et de génotoxicité ont été générées.

Deux campagnes de mesures (PM10 et PM2.5) ont été réalisées en Juillet 2010 et Janvier 2011. Les concentrations en PM2.5, relativement basse en été (moyenne de $14 \mu\text{g}/\text{m}^3$) augmentent considérablement en hiver (de 25 à 100%), en particulier sur les sites urbains, conséquence de l'utilisation du chauffage au bois. Pour les sites urbains et trafic, les concentrations en HAP des fractions PM2.5 sont plus élevées en hiver qu'en été (en particulier pour le Benzo[a]pyrène et le Benzo[a]anthracène). Les fractions hydrophiles sont nettement plus

riches en Na, Al, Ca, Fe, Ti et Pb que les fractions hydrophobes, indépendamment du site ou de la saison. Pour Cr, V, Ni, Zn et As, cette différence, forte en été, l'est beaucoup moins en hiver. Le Cuivre est beaucoup plus présent dans les fractions hydrophobes qu'hydrophiles.

S'agissant du potentiel génotoxique des fractions hydrophiles et hydrophobes des particules PM2.5 recueillies sur les 5 sites en périodes hivernale et estivale, ce potentiel a été jusqu'ici évalué au moyen des tests du micronoyau in vitro sur fibroblastes humains en primoculture en l'absence d'activation métabolique. Ce test permet de quantifier les anomalies chromosomiques de nombre et de structure^{1,2}. Il permet ainsi d'évaluer le potentiel clastogène et/ou aneugène des espèces chimiques recueillies sur les filtres, que ces potentiels soient consécutifs à l'un des agents ou à leur association. En l'absence d'activation métabolique, les sites les plus préoccupants en termes de risque génotoxique sont la centrale thermique, quel que soit la saison et la fraction hydrophile/hydrophobe testée, le site urbain pour sa fraction hydrophobe l'été et sa fraction hydrophile l'été et l'hiver. Enfin, une génotoxicité est observée sur la fraction hydrophile de l'ensemble des sites en été.

Ces résultats doivent être complétés par deux types d'approches complémentaires :

1) La première, objet de ce présent appel d'offre, consiste à discriminer sur les analyses génotoxiques déjà conduites, les micronoyaux induits par des clastogènes de ceux induits par des aneugènes. Cette discrimination peut se faire au moyen d'une technique d'immunocytochimie faisant appel à des anticorps CREST³. Leur détection, au moyen d'un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome aura deux objectifs :

- Favoriser l'identification des espèces chimiques en lien avec de tels effets génotoxiques. Cette détermination plus précise du mécanisme d'action génotoxique permettra de mieux identifier les espèces chimiques à la base de ces observations, facilitant la détermination de leur origine et optimisant, en conséquence, la définition des éventuelles stratégies de prévention à mettre en place.
- Mieux considérer le risque pour la santé des populations. En effet, pour un aneugène, c'est-à-dire un agent susceptible de générer des anomalies chromosomiques de nombre, un seuil d'innocuité peut être défini, tandis que pour un clastogène, c'est-à-dire un agent susceptible d'induire des lésions de l'ADN à la base de cassures chromosomiques, aucun seuil d'exposition ne peut être établi à ce jour⁴.

2) La seconde consiste à re-déployer ces analyses génotoxiques en présence d'un système d'activation métabolique. En effet, les analyses jusqu'ici effectuées quantifient les mutagènes directs (ex : les métaux lourds). Les capacités métaboliques des fibroblastes humains étant très limitées, il convient d'effectuer ces tests en présence d'une fraction métaboliquement active (S9mix). Ce travail fait actuellement l'objet d'un stage de Master II Recherche *Santé - Environnement*. **Deux demandes de subvention sont en cours d'établissement : une demande de bourse doctorale auprès de la région PACA, et une réponse à l'appel à projet recherche (APR) de l'ANSES intitulé « Programme National de Recherche en Environnement-Santé-Travail ».**

3. Réalisations et Plan Financier

Le projet global, n'intégrant jusqu'ici ni l'évaluation de la fraction métaboliquement active ni la discrimination entre aneugène et clastogène, a été évalué à 237 k€ et l'ADEME a financé 185 k€ en 2009. Ces crédits (personnel : 43.8% ; fonctionnement : 52.4% ; équipement : 0% ; frais généraux : 3.8%) ont été répartis sur les 4 équipes associés à ce programme en fonction de leur investissement et besoin respectifs.

¹ Fenech M. (2008). The micronucleus assay determination of chromosomal level DNA damage. *Methods. Mol. Biol.* 410:185-216

² Fenech M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat. Protoc.* 2:1084-1104

³ 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

⁴ Iarmarcovai G., Botta A. and Orsière T. Number of centromeric signals in micronuclei and mechanisms of aneuploidy. *Toxicology letters*, 2006, 166, 1-10

La génotoxicité est évaluée au moyen du test des micronoyaux. Les micronoyaux sont formés dans des cellules en division, lors de la transition métaphase/anaphase. Ils sont générés par la perte de matériel génétique au cours de la division cellulaire et contiennent des fragments chromosomiques acentromériques ou des chromosomes entiers non intégrés dans les noyaux fils au cours de la mitose. Les fragments chromosomiques acentromériques (micronoyaux acentromériques) sont consécutifs à des cassures double-brin de l'ADN qui ne peuvent pas se rattacher au fuseau mitotique, faute de centromères : ils résultent d'un événement clastogène. La perte de chromosomes entiers (micronoyaux centromériques) résulte, quant à elle, d'altérations au niveau des structures impliquées dans la ségrégation et la migration des chromosomes (événement aneugène). Les événements clastogènes s'inscrivent parfaitement dans la phase d'initiation du processus cancérogène. L'incidence des événements aneugènes dans les phases d'initiation est à l'heure actuelle discutée. De surcroît, contrairement aux clastogènes, la cible moléculaire des aneugènes n'est pas l'ADN, mais les protéines impliquées dans la ségrégation et la migration des chromosomes. Ces protéines ayant un turn-over élevé, des doses seuils sans effet peuvent être envisagées et établies. De ce fait, la prévention des effets des aneugènes et des clastogènes, ainsi que la gestion du risque pour la santé, diffèrent considérablement.

La discrimination entre micronoyaux centromériques et acentromériques permettra donc :

- d'améliorer la cartographie des zones les plus préoccupantes dans le bassin minier, la préoccupation vis-à-vis des agents clastogènes étant plus importante que pour les agents aneugènes en termes de risques pour la santé,
- de mieux caractériser les sources d'émission des particules à l'origine des risques génotoxiques les plus préoccupants,
- de mieux définir la nature du risque pour la santé et les seuils d'exposition acceptables.

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

<i>Descriptif des dépenses</i>	<i>Montant prévisionnel</i>
Frais de personnel – Stagiaire pendant 2 mois (temps de préparation des lames de microscopie, d'analyse au microscope, de retranscription et d'analyse des résultats)	6000 €
Réactifs et consommables de laboratoire	3000 €
Valorisation de la recherche (colloques, séminaires, réunions)	500 €
TOTAL	9500 €
- ECCOREV	- 6000 €
- ADEME	- 3500 €

4. Interactions entre les équipes de l'IMBE, du CEREGE, d'ESPACE et d'AIRPACA

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 PM2.5 dans le périmètre du bassin minier de Provence.

5. Valorisation Scientifique

Ce programme sera à l'origine d'une à plusieurs publications scientifiques internationales originales dans la mesure où cette approche consistant à discerner les anomalies chromosomiques de nombre et de structure relève d'une technique innovante encore rarement appliquée bien que très utile pour définir l'origine et la nature des nuisances, l'intensité du danger et, en conséquence, les politiques de prévention adaptées. 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

<i>Participants principaux</i>	<i>Statut</i>	<i>Pourcentage d'implication</i>
Thierry Orsière	Ingénieur de Recherche, Toxicologie Génétique, IMBE	40 %
Yves Noack	Directeur de Recherche CNRS, Géochimie – CEREGE	50 %
Alain Botta	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, IMBE	15 %
Daniel Bley	Directeur de Recherche CNRS, ESPACE	20 %
Patricia Lozano	Ingénieur Environnement, AirPACA	15 %

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'UMR CNRS 7263 (Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie Marine et Continentale – IMBE). 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., **ORSIERE T.**, DE MEO 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., **ORSIERE T.** (2008) - Genetic polymorphisms and micronucleus formation: a review of the literature. *Mutat. Res.* 658, 215–233

IARMARCOVAI G., BOTTA A. AND **ORSIERE 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.

Alain Botta est Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, directeur de l'équipe Biogénotoxicologie, Santé Humaine & Environnement de l'IMBE, UMR CNRS 7263. Ses thématiques de recherches s'inscrivent dans l'étude des inter-relations entre génotoxicité des environnements et impacts en termes de fertilité et de cancers.

Publications en relation avec la thématique :

BENAMEUR L., ORSIERE 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.

BONNEFOY A, CHIRON S., **BOTTA A.** (2010) - Environmental nitration processes enhance the mutagenic potency of aromatic compounds. *Environ. Toxicol.*, [Epub ahead of print]

IARMARCOVAI G., CEPPI M., **BOTTA A.**, ORSIERE T., BONASSI S. (2008) - Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of cancer patients: a meta-analysis. *Mutat. Res.*, 659, 274-283.

Daniel Bley est Directeur de Recherche au CNRS, laboratoire ESPACE, UMR 6012. Il est spécialiste en écologie humaine.

Publications en relation avec la thématique :

BLEY D., GRUENAIIS M.E., VERNAZA-LICHT N., Les relations environnement-santé, un champ de réflexion interdisciplinaire, en Santé et milieu de vie. Pratiques interdisciplinaires et regards croisés nord/Sud, Bley, Gruénais, Vernazza édts, 2009, édition IRD (sous presse)

BLEY D., VERNAZZA-LICHT N. (coord) Qualité de vie. Santé, écologie, environnement, Prévenir, 1997, 33, 224 p.

BLEY D., « Santé et environnement : abolir le fossé », entretien avec André Aschieri, NSS, 2001, vol 9, n°2, 51-55.

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 – février 2009.

Atmo PACA (2009), Inventaire d'émissions 2004 - Pollution atmosphérique et GES – avril 2009

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