



HAL
open science

Analyse de la mobilité des macrophages pour le développement d'un biocapteur atmosphérique

Philippe Laval-Gilly

► **To cite this version:**

Philippe Laval-Gilly. Analyse de la mobilité des macrophages pour le développement d'un biocapteur atmosphérique. Sciences de l'environnement. Université Paul Verlaine - Metz, 2000. Français. NNT : 2000METZ052S . tel-01775405

HAL Id: tel-01775405

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01775405v1>

Submitted on 24 Apr 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE DE METZ

L.U.T. de METZ

N° attribué par la bibliothèque

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv.	20001735
Cote	S/MZ 00/52
Loc.	Magasin

THESE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE METZ

Discipline : Toxicologie de l'Environnement

Présentée et soutenue à huis clos

Par

Philippe LAVAL-GILLY

Le 18 Janvier 2000

**ANALYSE DE LA MOBILITE DES MACROPHAGES POUR
LE DEVELOPPEMENT D'UN BIOCAPTEUR
ATMOSPHERIQUE**

Directeur de Thèse : Professeur FERARD Jean-François

JURY

Professeur FERARD Jean-François

Professeur JAUZEIN Michel

Madame MARC Annie

Docteur FALLA Jairo

Docteur KLEIN Francis

Monsieur LEB

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE DE METZ



022 421756 5

UNIVERSITE DE METZ

I.U.T. de METZ

N° attribué par la bibliothèque

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE METZ

Discipline : Toxicologie de l'Environnement

Présentée et soutenue à huis clos

Par

Philippe LAVAL-GILLY

Le 18 Janvier 2000

**ANALYSE DE LA MOBILITE DES MACROPHAGES POUR
LE DEVELOPPEMENT D'UN BIOCAPTEUR
ATMOSPHERIQUE**

Directeur de Thèse : Professeur FERARD Jean-François

JURY

Professeur FERARD Jean-François

Professeur JAUZEIN Michel

Madame MARC Annie

Docteur FALLA Jairo

Docteur KLEIN Francis

Monsieur LEBOIS Daniel

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Avant-Propos

Ce travail a été réalisé grâce au contrat passé avec la société LECES Environnement (Maizières – Les – Metz, 57, France). Il a également obtenu le soutien financier des villes de THIONVILLE (57) et de YUTZ (57) dans sa phase initiale. La Région LORRAINE a aussi été partenaire de ce projet en cofinçant une partie de la thèse.

Cette étude a été effectuée sous la direction du Professeur Jean-François FERARD et du Docteur Jaïro FALLA au sein de l'équipe de Microbiologie Immunologie de l'IUT de Metz délocalisé à Thionville – Yutz (57) rattaché à l'EBSE de l'Université de Metz (57).

Remerciements

Je tiens en premier lieu à exprimer ma profonde reconnaissance au Docteur Jaïro FALLA pour la confiance qu'il m'a témoignée en me confiant la réalisation de cette étude. Je souhaite aussi le remercier vivement pour sa disponibilité et pour m'avoir fait partager l'aventure de l'ouverture du Laboratoire et du Département qu'il dirige.

Je souhaite également exprimer toute ma gratitude au Professeur Jean-François FERARD pour avoir suivi les différentes étapes de l'étude et pour ses conseils, en particulier lors de la rédaction des travaux associés à la thèse.

Je remercie également Madame Annie MARC, directeur de recherche CNRS, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe afin de m'initier à la culture cellulaire en bioréacteur et pour avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse.

Mes remerciements vont aussi au Professeur Michel JAUZEIN qui a accepté d'être l'autre rapporteur de ce travail.

Je souhaite exprimer mes remerciements au Docteur Francis KLEIN pour avoir cru, au nom de LECES Environnement, en l'idée développée dans ce travail et avoir accepté de participer au jury de thèse.

Je remercie M. Daniel LEBOIS d'avoir accepté d'être jury de cette thèse.

J'aimerais aussi souligner l'aide précieuse de M. Michel HENRYON pour la réalisation de la partie informatique et l'assemblage du prototype, M. Dominique MORLOT pour ses conseils de botaniste et Mlle Déborah KLESTADT pour ses conseils en biochimie.

Je souhaite aussi remercier le Docteur Frédéric MELCHIOR pour son soutien, sa franchise et son amitié.

Enfin, j'exprime ma profonde gratitude à ma famille pour son soutien et pour m'avoir « supporté » durant ce travail.

Table des matières

1	INTRODUCTION	9
2	ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE	12
2.1	LA POLLUTION ATMOSPHÉRIQUE : ORIGINES ET ÉVOLUTIONS	12
2.2	MÉTHODES DE MESURES	15
2.2.1	<i>Les analyseurs automatiques</i>	15
2.2.2	<i>La bioindication de la qualité de l'air</i>	17
2.3	EFFETS SUR LA SANTÉ.....	32
2.3.1	<i>Mécanismes généraux de défense de l'appareil respiratoire</i>	32
2.3.2	<i>Les polluants particulaires</i>	33
2.3.3	<i>Les polluants gazeux</i>	36
2.4	LES MACROPHAGES ALVÉOLAIRES.....	37
2.4.1	<i>Origine et rôle dans le système immunitaire pulmonaire</i>	37
2.4.2	<i>Les métabolites cellulaires produits</i>	45
2.4.3	<i>Influence de la pollution atmosphérique</i>	48
2.5	OBJECTIFS.....	53
3	MATÉRIELS ET MÉTHODES	56
3.1	LE MATÉRIEL BIOLOGIQUE	56
3.1.1	<i>Cellules employées</i>	56
3.1.2	<i>Milieu de culture</i>	57
3.1.3	<i>Culture d'entretien</i>	57
3.2	ELABORATION DU MONTAGE DE PAILLASSE ET ESSAIS ASSOCIÉS.....	58
3.2.1	<i>Systèmes d'exposition aux polluants atmosphériques</i>	58
3.2.2	<i>Système d'analyse</i>	59
1.1.3	<i>Production de l'ozone</i>	60
1.1.4	<i>Etude de la mobilité</i>	62
1.3	ELABORATION DU PROTOTYPE	68
1.3.1	<i>Mise au point d'un procédé de culture autonome</i>	68
1.3.2	<i>Elaboration du prototype de laboratoire : principe</i>	70
1.4	DOSAGES BIOCHIMIQUES	71
1.4.1	<i>Préparation des cellules</i>	71
1.4.2	<i>Calcium (Ca^{2+})</i>	71
1.4.3	<i>Monoxyde d'azote (NO)</i>	72
1.4.4	<i>Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)</i>	72
1.4.5	<i>Lactate déshydrogénase (LDH)</i>	73
1.5	TESTS STATISTIQUES	75

4	ETUDES EXPÉRIMENTALES.....	77
4.1	ETUDE DE FAISABILITÉ : BIOESSAI.....	78
4.1.1	<i>Mobilité naturelle des THP-1.....</i>	78
4.1.2	<i>Action de l'eau de préparation des substances chimioattractrices sur la mobilité.....</i>	80
4.1.3	<i>Action des LPS sur la mobilité.....</i>	82
4.1.4	<i>Action du fMLP.....</i>	84
4.1.5	<i>Exposition à l'ozone.....</i>	89
4.1.6	<i>Validation expérimentale.....</i>	92
4.1.7	<i>Impact de l'ozone sur la physiologie cellulaire.....</i>	93
4.2	ELABORATION DU PROTOTYPE DE LABORATOIRE.....	96
4.2.1	<i>Mise au point d'un procédé de culture autonome.....</i>	96
4.2.2	<i>Mise au point des régulations et traitement de l'information.....</i>	108
4.2.3	<i>Détermination de la V_{AS} des cellules activées par le fMLP.....</i>	122
4.3	MESURE DE LA QUALITÉ DE L'AIR AVEC LE PROTOTYPE DE LABORATOIRE : ESSAIS AVEC L'OZONE, LE MONOXYDE D'AZOTE ET UN MÉLANGE O_3 / NO_x	128
4.3.1	<i>Essais avec l'ozone.....</i>	129
4.3.2	<i>Essai avec le monoxyde d'azote (NO).....</i>	131
4.3.3	<i>Essai sur un mélange de polluants ($O_3 : NO_x$).....</i>	133
4.3.4	<i>Utilisation du prototype pour juger de la qualité de l'air à partir d'un échantillon unique.....</i>	134
5	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	137
6	Liste Bibliographique.....	142
7	ANNEXES.....	170
7.1	ASSOCIATIONS MEMBRES DU RÉSEAU DE SURVEILLANCE DE LA QUALITÉ DE L'AIR EN FRANCE.....	170
7.2	COMPOSITION DU RPMI 1640.....	171
7.3	TABLE DE CORRESPONDANCE ENTRE DÉNOMINATION SYSTÉMATIQUE ET NOM USUEL.....	172
7.4	STRUCTURE DE L'ATMOSPHÈRE.....	173
7.5	DÉFINITIONS PROPRES À L'ANALYSE D'IMAGES.....	174
7.5.1	<i>Élément structurant.....</i>	174
7.5.2	<i>Connexité.....</i>	174
7.5.3	<i>Erosion [E(I)].....</i>	175
7.5.4	<i>Dilatation [D(I)].....</i>	175
7.5.5	<i>Ouverture [O(I)].....</i>	176
7.5.6	<i>Fermeture [F(I)].....</i>	176
7.5.7	<i>Ouverture Propre [Op(I)].....</i>	176
7.5.8	<i>Fermeture Propre [Fp(I)].....</i>	176
7.5.9	<i>Transformation morphologique primaire auto-médiane [Auto-Median(I)].....</i>	176

Abréviations

A

AFNOR : Association française de normalisation

ATP : Adénosine triphosphate

B

BTEX : Benzène, toluène, éthyl-benzène, m, p et o-xylène

C

C5a : Facteur 5a du complément

C3b : Facteur 3b du complément

CD : Classe de différenciation

CIRC : Centre international de recherche sur le cancer

CSF : Colony stimulating factor

CFC : Chloro fluoro carbone

CFU-S : Cellule souche de la moelle osseuse hématopoïétique

COV : Composés organiques volatils

CRM 482 : Référence lichénique établie par le « Standards Measurements and Testing Program »

D

DL50 : Dose létale 50

DMBA : Diméthylbenzantracène

DOAS : Spectrophotométrie d'absorption ultraviolette différentielle

F

Fc : Fraction cristallisable des immunoglobulines

FID : Détecteur à ionisation de flamme

fMLP : n formyl Méthionine Leucine Phénylalanine

fNLLP : formyl Norleucyl Leucyl Phénylalanine

H

HAP : Hydrocarbures aromatiques polycycliques

HCT : Hydrocarbures totaux

HLA : Complexe majeur d'histocompatibilité humain

HRP : Peroxydase de raifort

I

IAP : Index of Atmospheric purity (Indice de pureté atmosphérique)

LDH : Lactate déshydrogénase

Ig : Immunoglobuline

IL-1 : Interleukine - 1

Inf- γ : Interféron - γ

IP : Indice de pollution

IR : Infrarouge

L

LGK : Luftgüteklassen (indice de classe de qualité)

LGW : Luftgütewerte (valeur de qualité de l'air)

LII : Indice de nécrose foliaire

LPS : Lipopolysaccharide

M

MAF : Macrophage activating factor

MAF-1 : Macrophage functional antigen – 1

MIF : Macrophage inhibiting factor

MTT : 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,2-diphényl-tétrazolium bromique

N

NOS : NO synthase

NOx : Oxydes d'azote

O

OMS : Organisation mondiale pour la santé

P

PAN : Nitrate de peroxyacétyle

PCB : Polychlorobiphényle

PMS : Phénazine méthosulfate

PS : Particules sédimentables (diamètre équivalent supérieur à 1 µm)

R

RPMI 1640 : Milieu pour la culture de leucocytes humains développé au Roswell Park Memorial Institute

RVB : Codage informatique d'un image couleur en Rouge Vert Bleu

T

THP-1 : cellules de la lignée myélocytaire monocytaire ATCC TIB-202

TNF-α : Tumour necrosis factor - α

U

UV : ultraviolet

V

V_{AS} : Vitesse d'accroissement de surface

INTRODUCTION

1 INTRODUCTION

La qualité de l'air est un des problèmes environnementaux contemporains des plus préoccupants du point de vue de la santé humaine. L'influence des polluants atmosphériques sur le monde vivant est évaluée par l'emploi de bioindicateurs végétaux ou par des études épidémiologiques (Cislaghi and Nimis, 1997). Or ces méthodes nécessitent des délais importants entre la phase d'exposition et l'obtention des résultats. La mesure de la qualité de l'air est donc actuellement réalisée au moyen d'appareils basés sur les propriétés physico-chimiques des molécules polluantes. L'utilisation d'un système de mesures en continu de la qualité de l'air, basé sur un indicateur vivant, pourrait permettre d'évaluer directement l'influence des polluants sur la santé des populations.

L'air entre dans l'organisme des mammifères par les voies aériennes supérieures et pénètre ensuite jusqu'aux alvéoles où les échanges gazeux ont lieu. Les polluants atmosphériques suivent le même parcours, causant des perturbations morphologiques, physiologiques et fonctionnelles en fonction de leur nature et de leur profondeur de pénétration. Les macrophages alvéolaires constituent le premier système de défense cellulaire du poumon profond. Leur fonction principale consiste à phagocytter les micro-organismes ou macromolécules qui se déposent sur les alvéoles. Ces cellules sont directement exposées à l'air inhalé et donc aux polluants gazeux et particulaires. Les phagocytes exposés présentent alors des modifications morphologiques et physiologiques conduisant à une diminution de la phagocytose et une augmentation de leur mortalité. Une des étapes clés de la défense macrophagique des alvéoles réside dans la capacité de déplacement du phagocyte vers sa cible. L'action des polluants sur la mobilité et les modifications physiologiques consécutives à une intoxication sont cependant mal connues à court terme.

Le premier objectif de ce travail est d'étudier l'influence de l'ozone, polluant atmosphérique majeur, sur la mobilité de macrophages en développant un système de traitement basé sur l'analyse d'images, capable de fournir en continu des données représentatives des répercussions physiologiques de ce polluant. Le deuxième objectif concerne la réalisation d'un biocapteur autonome qui permettrait de compléter la panoplie d'appareils physico-chimiques des réseaux de mesure par un outil apte à prendre en compte la qualité globale de l'air tout en étant plus proche de l'impact sur la santé humaine. La validation d'un prototype sera réalisée au moyen d'ozone et de monoxyde d'azote puis d'un mélange polluant caractéristique des pollutions estivales (ozone – NOx).

L'analyse bibliographique (*Chapitre 2*) présente les polluants atmosphériques ainsi que les différentes méthodes de mesures de la qualité de l'air aussi bien physico-chimiques que biologiques. Les relations entre la pollution atmosphérique et la santé sont ensuite abordées avec une attention particulière pour les macrophages alvéolaires et leur rôle dans le maintien de l'intégrité pulmonaire.

Au terme de la présentation du matériel et des méthodes mis en œuvre (*Chapitre 3*), la phase expérimentale proprement dite (*Chapitre 4*) développera l'étude de la mobilité des macrophages par analyse d'images ainsi que l'influence d'une exposition à l'ozone sur celle-ci. La mise au point d'un biocapteur, basé sur la mobilité cellulaire, sera ensuite abordée de même que les premiers essais de calibration du prototype. Enfin, la mesure de paramètres biochimiques permettra d'évaluer les perturbations physiologiques liées à l'ozone.

La conclusion (*Chapitre 5*) fera ressortir l'effet des polluants atmosphériques sur les macrophages et montrera l'intérêt des informations apportées par le biocapteur par rapport aux outils d'analyses physico-chimiques existants.

ANALYSE

BIBLIOGRAPHIQUE

ANALYSE

BIBLIOGRAPHIQUE

2 ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1 LA POLLUTION ATMOSPHERIQUE : ORIGINES ET EVOLUTIONS

L'atmosphère de la Terre n'a jamais été stable. Depuis la formation de notre planète, sa composition et sa température ont beaucoup évolué. Hormis les modifications brutales liées à des phénomènes accidentels (éruptions volcaniques, ...), ces variations étaient graduelles et progressives permettant l'adaptation des espèces. Cependant, depuis l'avènement de l'ère industrielle, les modifications physico-chimiques de l'atmosphère ont tendance à s'accélérer du fait de l'accroissement des activités humaines. Les manifestations les plus alarmantes de cette évolution sont, par exemple, le "smog" acide qui a frappé Londres en 1952, le "smog" oxydant des grandes métropoles comme Sao Paulo (Brésil) lors des journées calmes et ensoleillées, les dépôts acides communément appelés "pluies acides", le réchauffement de la Terre par effet de serre ou encore le "trou" de la couche protectrice d'ozone stratosphérique, pour ne citer que les phénomènes les plus médiatisés (Graedel and Crutzen, 1996 ; Arquès, 1998).

Ces dégradations de l'environnement ont pour origine historique (ADEME, 1997) :

- les procédés industriels (métallurgie, pétrochimie, chimie) qui sont générateurs de quantités importantes de gaz acides comme le dioxyde de soufre (SO₂), l'acide fluorhydrique (HF) ou l'acide chlorhydrique (HCl), des oxydes d'azote (NO_x), des particules et de dioxyde de carbone (CO₂)
- les combustions d'énergie fossile par des foyers fixes qui produisent du CO₂ et du SO₂ par oxydation du soufre contenu dans le carburant : le charbon contient, par exemple, de 1 à 10 % (w/w) de soufre et le fuel, de 0,5 à 3 % (w/w)

- l'utilisation de gaz potentiellement polluant rejetés dans l'atmosphère après emploi comme les chloro fluoro carbonés (CFC).

Depuis quelques années cependant, les réseaux de surveillance de la qualité de l'air font état de l'émergence d'une émission diffuse de contaminants tels que les NO_x, les particules fines (diamètre équivalent inférieur à 1 µm), les métaux et métaux lourds ainsi que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (Garrec, 1993 ; Poissant and Koprivnjak, 1996 ; Echaubard, 1996).

De même, les polluants photochimiques de la troposphère tels que l'ozone (O₃) et le nitrate de peroxyacétyle (PAN) sont en augmentation par transformation des polluants primaires précédents, dont les NO_x, lors de conditions anticycloniques particulières et par fort ensoleillement (Papais, *et al.*, 1998). Le trafic automobile a été identifié comme la source majeure de ces polluants, plus spécifiquement en zone urbaine. Les véhicules produisent ainsi 61 % des NO_x, 56 % du CO, 42 % des COV et 35 % du CO₂ (EEA, 1994 ; Chiron, *et al.*, 1997 ; Joumard, 1997). Cependant, cette répartition varie en partie en fonction de la proportion de véhicules à allumage commandé (moteur à essence) et spontané (moteurs diesel) (Tableau 1) (ADEME and INRET, 1995 ; Dron and Cohen de Lara, 1995 ; Leclerc, 1996).

Tableau 1 : Composition des gaz d'échappement de véhicules routiers en parcours urbain (Popescu, *et al.*, 1998)

TYPE DE POLLUANT	COMPOSITION DES FUMÉES (% en volume des fumées totales)					
	<i>Moteur à allumage commandé</i>			<i>Moteur à allumage spontané</i>		
	<i>Maximum</i>	<i>Minimum</i>	<i>Moyenne</i>	<i>Maximum</i>	<i>Minimum</i>	<i>Moyenne</i>
<i>CO₂</i>	15,0	2,7	9,0	13,8	0,7	9,0
<i>CO</i>	13,5	0,2	4,0	7,6	/	0,1
<i>O₂</i>	17,4	0,0	4,0	20,0	0,5	9,0
<i>H₂</i>	5,80	0,00	2,00	2,50	0,00	0,03
<i>Hydrocarbures</i>	4,00	0,00	0,50	0,50	0,00	0,02
<i>NOx</i>	0,20	0,00	0,06	0,15	0,00	0,04
<i>SO₂</i>	0,008	0,000	0,006	0,030	0,010	0,020
<i>Aldéhydes</i>	0,0300	0,0000	0,0040	0,0037	0,0000	0,0020
<i>Particules fines</i>	0,0000	0,0000	0,0000	Jusqu'à 1% du poids de combustible		

Ainsi, alors que les premiers réseaux de surveillance de la qualité de l'air ne mesuraient que la pollution de sources fixes bien ciblées (localement, en Moselle, AERFOM pour la vallée sidérurgique de la Fensch ou ESPOL pour la plate-forme ELF ATOCHEM), leur attention se focalise actuellement plus sur la pollution autoroutière et l'évaluation de la dose d'exposition réelle de la population (Hodin and Hertz, 1996 ; Jarry, 1995 ; Lambré, 1995 ; Quesnel, *et al.*, 1997 ; Voisin, 1998). Conformément à l'article 3 de la loi du 30 décembre 1996 sur l'air et l'utilisation rationnelle de l'énergie (Loi n°96-1236, 1997) : « l'Etat assure, avec le concours des collectivités territoriales, la surveillance de la qualité de l'air et de ses effets sur la santé et l'environnement ». Ce texte prévoit aussi que l'ensemble du territoire national doit être couvert, au plus tard, le 1^{er} janvier 2000.

Depuis le 1^{er} janvier 1998, 58 agglomérations de plus de 100 000 habitants sont sous surveillance et, à l'heure actuelle, le réseau de surveillance national de la qualité de l'air agréé ATMO (Voir 2.2.1) se compose de 37 associations (Lombard, 1998) (Voir Chapitre 7.1).

2.2 METHODES DE MESURES

2.2.1 Les analyseurs automatiques

L'évolution permanente de la nature des polluants, de leurs sources et de leur répartition induit la mise au point d'outils et de méthodes adaptés pour l'analyse et la prévision des épisodes de pollution. Les réseaux de mesure de la qualité de l'air se servent d'appareils basés sur l'utilisation des propriétés physico-chimiques des gaz (Tableau 2). De plus, l'analyse de certains composés présents à très faibles concentrations, comme les COV, nécessite la mise en place de concentrateurs d'échantillons (Bruns and Li, 1994).

Tableau 2 : Analyseurs automatiques commercialisés et technologie utilisée

GAZ ANALYSE	TECHNOLOGIE (Norme AFNOR)	APPAREIL COMMERCIALISE
<i>SO₂</i>	Fluorescence ultraviolette (UV) (X43-019)	SF 2000 (<i>Seres</i>) AF 21M (<i>Environnement SA</i>)
<i>NO_x</i>	Chimiluminescence (X43-301)	NOX 2000 (<i>Seres</i>) AC 31M (<i>Environnement SA</i>)
<i>O₃</i>	Absorption UV (X40-024)	OZ 2000 (<i>Seres</i>) O3 41M (<i>Environnement SA</i>)
<i>CO</i>	Corrélation IR (X43-044)	CO 2000 (<i>Seres</i>) CO 11M (<i>Environnement SA</i>)
<i>Hydrocarbures totaux (HCT)</i>	Ionisation de flamme (FID) (X43-301)	HCT 2000 (<i>Seres</i>) HC 51M (<i>Environnement SA</i>)
<i>Poussières</i>	Jauge bêta	MP 101MS (<i>Environnement SA</i>)
<i>Benzène, Toluène, Ethylbenzène, m, p et o-Xylène (BTEX)</i>	Chromatographie en phase gazeuse associée à un détecteur FID	BTX 61M (<i>Environnement SA</i>)
<i>O₃, NO_x, SO₂, BETX, disulphure de carbone, ammoniac, formaldéhyde, naphtalène, styrène, phénol, acide nitreux</i>	Spectrophotométrie d'absorption ultraviolette différentielle (DOAS)	SANOA (<i>Environnement SA</i>)

Ces analyseurs ne peuvent toutefois pas prendre en compte les notions de synergie de polluants de biodisponibilité ainsi que leurs effets cumulatifs. En effet, ils ne détectent que les produits pour lesquels ils ont été conçus. Un indice global de qualité de l'air a cependant été élaboré afin de traduire, pour le public, l'exposition aux polluants en risque. Les concentrations de SO₂, de NO_x, d'O₃ et de poussières sont comparées individuellement à une échelle de correspondance fournissant un indice de qualité. Le plus mauvais indice devient l'indice global de qualité de l'air appelé ATMO (De Kermikri, 1995 ; Vessoren, 1997) (Figure 1). ATMO ne représente donc que très partiellement la dose réelle absorbée puisqu'il n'est basé que sur l'influence d'un composé unique sans prendre en considération les interactions physico-chimiques ou physiologiques des polluants.

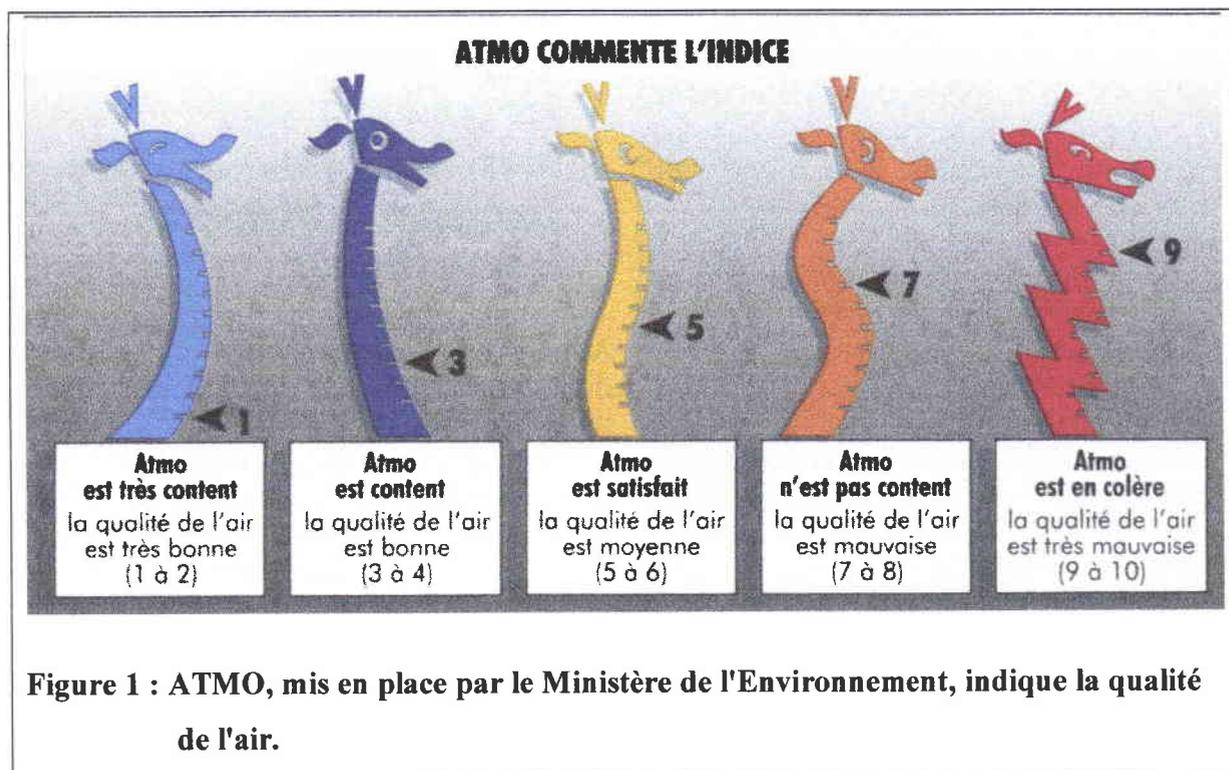


Figure 1 : ATMO, mis en place par le Ministère de l'Environnement, indique la qualité de l'air.

2.2.2 La bioindication de la qualité de l'air¹

2.2.2.1 Les bioindicateurs

L'utilisation d'organismes indicateurs présente l'avantage d'apporter un complément d'information aux systèmes chimiques de surveillance, à savoir :

- la connaissance des niveaux moyens de contamination en micropolluants devient accessible grâce aux phénomènes de bioaccumulation alors que leur mesure directe est difficile du fait leur très faible concentration dans le milieu naturel (Steubing and Jager, 1982)
- la connaissance de l'incidence réelle des polluants par l'utilisation de systèmes biologiques qui vont permettre une approche plus réaliste de l'impact sur la santé humaine et environnementale, car elle prend en compte les concepts de biodisponibilité et d'interaction (Cislaghi and Nimis, 1997).

Les organismes les plus utilisés sont les végétaux. Ce choix peut s'expliquer en fonction de plusieurs critères : large répartition géographique, sédentarité et facilité de récolte mais aussi lisibilité de l'impact des polluants. Les plants de tabac (*Nicotina tabacum*) sont, par exemple, utilisés pour mettre en évidence les pollutions ozonées alors que les lichens permettent d'effectuer des dosages d'exposition aux métaux, aux métaux lourds ou au SO₂, par exemple (Hawksworth and Rose, 1976 ; Bytnerowicz, *et al.*, 1993 ; Waber, *et al.*, 1994 ; Grasso, *et al.*, 1999).

¹ Falla J, Laval-Gilly P, Henryon M, Morlot D and Ferard J.-F, « Biological air quality monitoring : a review », *Environmental Monitoring and Assessment (In print)*

Ces catégories de polluants font apparaître une différence de comportement du végétal vis à vis du composé indésirable :

- La bioindication basée sur des éléments biologiques sensibles au stress polluant utilise les altérations physiologiques (l'altération de la photosynthèse par exemple) puis morphologiques (comme la destruction de la cuticule végétale) ou parfois la disparition d'espèce dans l'écosystème. Ces altérations peuvent donc conduire à des manifestations visibles à l'œil nu (nécroses de la feuille de tabac par exemple).
- Par contre, la bioindication par bioaccumulation utilise des éléments biologiques vivants résistants aux polluants accumulables par les organismes biologiques. La quantité totale présente dans la plante au bout d'une période d'exposition donnée est alors estimée. Ce type d'étude requiert des analyses chimiques *a posteriori* ainsi que la mise en œuvre d'une stratégie de collecte et d'identification des échantillons (Steubing and Jager, 1982).

Pour l'étude de la qualité de l'air, les espèces seront retenues en fonction de la zone, de la période et de la durée d'observation. Le nombre, l'étendue et la couverture végétale des sites permettront ensuite de déterminer s'il est possible de se baser sur des végétaux autochtones ou non. Le choix final des espèces est généralement conditionné par le type de polluant, le meilleur indicateur étant celui qui présente les marqueurs les plus spécifiques, sensibles et faciles à mettre en évidence.

Parmi les végétaux les plus étudiées, deux groupes, qui font l'objet des deux chapitres suivants, se distinguent en fonction de leur mode d'utilisation.

2.2.2.2 Les bioindicateurs passifs

Les bioindicateurs passifs sont des plantes déjà présentes sur le lieu d'étude. Leur emploi est souvent lié à la nécessité de couvrir une zone de recherche étendue. De plus, les

espèces étant autochtones, elles n'ont besoin d'aucun entretien spécifique. En contrepartie, l'interprétation des résultats obtenus doit prendre en compte un nombre de critères importants tels que l'hétérogénéité des conditions de vie : qualité du sol, conditions climatiques, variabilité génétique, hétérogénéité de la distribution spatiale des espèces retenues, ... (Garrec and Radnai, 1996)

Les arbres

L'emploi des arbres est souvent lié à la nécessité de suivre l'évolution de la qualité de l'air et son impact sur de grandes étendues. Les espèces utilisées sont alors autochtones ce qui permet de s'affranchir des problèmes d'acclimatation et d'entretien des végétaux. Les résineux (sapin, épicéa, pin sylvestre) sont utilisés depuis 1980 pour mettre en évidence l'impact de pollutions diffuses, en SO₂ ou ozone, dans les régions montagneuses (Feder, 1978 ; Bouvarel, 1984 ; Landmann, 1995 ; Manninen and Huttunen, 1995). Les feuillus, dont les chênes, permettent le suivi des expositions à ces composés dans la plupart des domaines forestiers (Becker and Levy, 1982 ; Becker and Levy, 1988). Il faut cependant noter que la superficie de la zone d'étude et l'utilisation des essences en place génèrent quelques contraintes. Il convient de trouver des plants sensibles et des plants résistants aux polluants sur le même site. Ceci implique, bien entendu, la connaissance préalable de la réactivité des espèces présentes (Garrec, 1997). De plus, les arbres doivent être correctement exposés aux flux d'air. Les lisières de clairières où la diffusion de la charge polluante au sein du feuillage est facilitée, seront donc préférentiellement retenues. Dans les autres cas, seule la canopée sera assez aérée pour prétendre à une exposition suffisante.

En 1994, les Etats-Unis ont initié un programme d'étude afin de suivre l'évolution des forêts américaines. Pour répondre au mieux aux critères énoncés ci-dessus, le « National Forest Health Monitoring Program » prévoit que les sites d'étude doivent être composés d'au

moins trente spécimens d'au moins trois espèces différentes situées en lisière de clairières. Dix huit sites ont ainsi été retenus pour représenter les 32 forêts de la région Centre - Atlantique alors que 71 l'ont été pour les 219 de Nouvelle-Angleterre (Hoffard, *et al.*, 1995). La comparaison entre les sites peut toutefois s'avérer délicate du fait de la biodiversité des milieux et des différences de réponse entre espèces face à une charge polluante identique.

Les atteintes végétales recherchées sont, dans le cas des arbres, essentiellement morphologiques (Barthod, *et al.*, 1987). Ainsi, la présence de nécroses foliaires traduit une exposition aux polluants. Comme les constituants naturels de l'atmosphère libre, les polluants gazeux parviennent à proximité de la feuille par diffusion turbulente et traversent ensuite une couche plus stable, appelée couche limite, par diffusion moléculaire. L'appareil stomatique représente l'élément essentiel de pénétration de la plupart des gaz dans la plante. L'ostiole franchi, les polluants accèdent à la chambre sous-stomatique où ils vont pouvoir se solubiliser. D'autre part, les altérations dues à une exposition aux gaz oxydants forts, sont rarement trans-foliaires et, souvent, seule la face supérieure sera lésée alors que la face inférieure restera intacte (Figure 2). De même, les parties périphériques du feuillage, mieux exposées, présentent souvent plus de nécroses que les feuilles proches du tronc ou recouvertes par d'autres feuilles. Ce sont aussi ces parties du feuillages qui reçoivent les polluants particuliers qui sédimentent. C'est en fonction de leur pouvoir de dissolution, de leur réactivité et du degré d'activité physiologique de la plante que les contaminants vont se répartir au sein du végétal causant des nécroses plus ou moins caractéristiques. La coloration des tâches varie pour un même polluant en fonction des espèces. L'ozone provoquera l'apparition de spots rouges chez *Prunus serotina*, *Fraxinus americana*, de teintes brunes pour *Liriodendron tulipifera*, en passant par le violet pour *Asclepia syriaca* (Skelly, *et al.*, 1987). De même, au sein d'une espèce, la morphologie des lésions peut varier en fonction du polluant. Des spots colorés apparaîtront entre les nervures foliaires en cas d'exposition à

l'ozone alors que dans le cas du fluor les nécroses foliaires seront préférentiellement en bordure de feuille ou internervaires pour le SO₂ (Bonneau and Landmann, 1988 ; Garrec, 1993 ; Bonte, 1995).

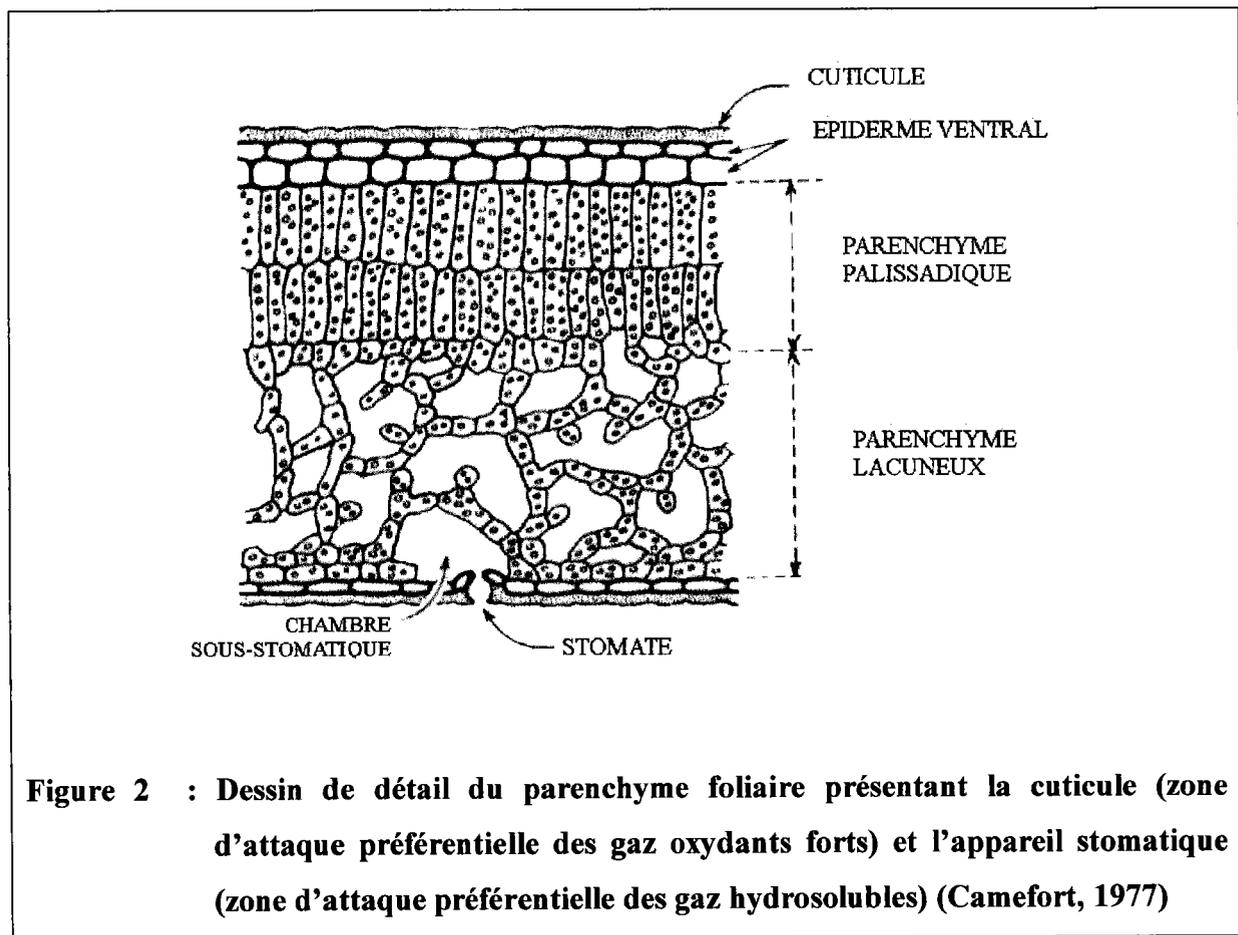


Figure 2 : Dessin de détail du parenchyme foliaire présentant la cuticule (zone d'attaque préférentielle des gaz oxydants forts) et l'appareil stomatique (zone d'attaque préférentielle des gaz hydrosolubles) (Camefort, 1977)

L'utilisation des espèces arborescentes permet donc de connaître l'évolution de la qualité de l'air avec, dans certains cas, des possibilités d'identification du cocktail polluant. Ce type d'étude présente, en outre, l'avantage d'autoriser le suivi de la charge polluante sur de vastes étendues à moindre coût. Cependant, la complexité de mise en place et d'interprétation des résultats, qui doit prendre en compte l'hétérogénéité des écosystèmes, fait des arbres des bioindicateurs difficiles à mettre en œuvre nécessitant des spécialistes mais qui restent les outils très bien adaptés à l'étude des changements globaux ou à long terme.

Les lichens

Au contraire des arbres, les lichens ont été très tôt désignés comme des bioindicateurs. Dès 1856, Grindon a pu attribuer le déclin de la flore lichénique du sud du Lancashire à une augmentation de la pollution atmosphérique mais c'est Nylander qui a reconnu, en 1866, que cette catégorie de végétaux représentait un bioindicateur pratique de la qualité de l'air de l'agglomération parisienne (Nylander, 1866). Les lichens représentent, en effet, un groupe végétal à part. Issus de la co-évolution de champignons et d'algues, ils possèdent des capacités de résistance et de reviviscence exceptionnelles. De plus, l'absence de cuticule facilite l'absorption des éléments aériens et la présence d'espaces intracellulaires dans la médulla piège les polluants particuliers dont les métaux et métaux lourds font partie. Les lichens sont donc des organismes bioaccumulateurs. Enfin, la partie algale peut présenter, chez certaines espèces, une tolérance importante aux contaminants conférant aux lichens une résistance à court terme élevée ou, au contraire, une sensibilité exacerbée (Dobson, 1992). Une exposition au SO₂ entraîne, par exemple, une diminution sensible de l'assimilation du CO₂ par la partie algale de *Evernia mesomorpha* Nyl. (Huebert, *et al.*, 1985).

L'ensemble de ces caractéristiques permet de les utiliser dans un cadre d'étude relativement semblable à celui des arbres : ils sont un outil de diagnostic de la qualité de l'air sur de vastes étendues même s'ils sont plus souvent utilisés pour le diagnostic de l'atmosphère en milieu urbain (Morin and Delmas, 1997 ; Schmidt, 1997). Cependant, les lichens, du fait de l'ancienneté de leur étude, permettent une approche plus fine que les arbres, autorisant la génération d'indices de la qualité de l'air. Une des clés de la progression de la bioindication par les lichens réside dans l'intégration des connaissances acquises dans deux domaines : la floristique, qui prend en compte soit l'intégralité du lichen le considérant ainsi en tant qu'individu soit la population lichénique dans son ensemble considérant alors une

communauté d'individus, et la biologie qui s'attache à la réponse d'une fonction vitale ou d'un composant cellulaire (Van Halluwyn and Lerond, 1993).

Parmi les approches floristiques, deux catégories de méthodes sont discernables :

- Les méthodes qualitatives définissant une échelle de correspondance entre les lichens et le degré de pollution,
- Les méthodes quantitatives permettant de calculer un indice de pollution.

La plus répandue des *méthodes qualitatives* est celle développée par Hawksworth et Rose en Grande-Bretagne au cours des années 1970 (Hawksworth and Rose, 1970). Basée sur des études relatives aux taux de SO₂, elle prend en compte 80 espèces réparties en onze classes corrélées à différents taux de polluants permettant d'établir une échelle qualitative de qualité de l'air (Hawksworth and Rose, 1976). Les classes sont essentiellement caractérisées par des critères morphologiques tels que la tendance à la fructification et l'étalement, mais aussi statistiques comme l'apparition ou l'abondance d'espèces et enfin, l'acidité de l'écorce support qui peut jouer le rôle de tampon lors d'épisodes de pollution acide (De Bakker, 1989 ; Vandobben and Terbraak, 1998). Il faut toutefois noter que l'utilisation répétée de cette technique a permis de mettre en évidence sa spécificité régionale. En effet, si les corrélations entre les espèces lichéniques définies par l'échelle et les taux de SO₂ restent valables en Grande-Bretagne, les études réalisées dans les pays voisins montrent qu'elles nécessitent un étalonnage préalable afin de prendre en compte la répartition naturelle de la flore en fonction de la climatologie locale. *Teloshistes flavicans* (classe 10– Air “pur”) est, par exemple, totalement absente au nord de la France sans qu'il y ait pour autant de lien avec les concentrations de SO₂ ou d'autres polluants. Cependant, ce type d'approche permet, après un étalonnage adapté, de mettre en évidence des variations spatiales de 10 µg/m³ voire de 5 µg/m³ de SO₂ (Van Halluwyn and Lerond, 1993).

Une technique dérivée, développée par les mêmes auteurs, a vu le jour en 1987 (Van Halluwyn and Lerond, 1987). Elle applique les notions de phytosociologie développées par Guinochet en 1973. Elle cherche à montrer les liens entre les associations lichéniques et les niveaux de pollution soufrée. La détermination préalable des associations d'espèces permet alors d'adapter les relations établies lors des travaux réalisés en Angleterre à d'autres régions. D'autre part, l'étude des altérations de la communauté végétale apporte plus de renseignements que la prise en compte d'un individu isolé (Gaveriaux, 1996). Ce constat a permis de mettre au point les méthodes quantitatives fondamentalement basées sur l'évolution des associations de lichens dans un même écosystème.

Les *méthodes quantitatives* ont été développées afin d'éviter l'emploi des méthodes phytosociologiques, et donc de simplifier l'utilisation des lichens. La méthode de Leblanc et de De Sloover, élaborée en 1970, est basée sur la fréquence d'apparition des espèces, elle débouche sur le calcul d'un index de pureté atmosphérique appelé I.A.P. (Index of Atmospheric Purity) (Leblanc and De Sloover, 1970 ; Loppi, 1996). Facile d'apparence à mettre en œuvre, il faut tout de même souligner que cette méthode de calcul est sensible aux variations de conditions écologiques. Il est donc nécessaire d'effectuer des relevés dans des conditions aussi semblables que possibles et sur des arbres isolés. Il est aussi recommandé de déterminer la fréquence relative globale des espèces afin de s'assurer que l'homogénéité entre les différentes stations sera respectée.

Une autre technique d'étude, proche de l'I.A.P., est l'estimation d'un Indice de Pollution (I.P.) développé par Trass en 1973 (Trass, 1973). Elle est basée sur la connaissance de la tolérance des espèces aux polluants. De même que pour l'I.A.P., l'I.P. conduit à une échelle de valeurs qui peut être reliée à des taux de polluants définis. Elle est cependant soumise à des restrictions identiques. Il faut aussi noter que la détermination du coefficient de polluotolérance implique une certaine subjectivité dans sa pondération. De plus la

détermination de ce coefficient implique une phase d'étude préalable afin de déterminer, pour les espèces locales, une échelle de tolérance. Ces restrictions peuvent, en partie, expliquer le fait que cette méthode soit peu usitée par rapport aux autres.

Enfin, une procédure de calcul d'indice de classes, appelée LGK (Luftgüteklassen), a été développée en Allemagne en 1995 afin de pallier ces inconvénients (Anonyme, 1995). Celle-ci est basée sur la fréquence des espèces sur le site d'échantillonnage et des critères de sélection proches de ceux utilisés en sociologie végétale. Un traitement statistique des résultats permet ensuite d'éliminer, ou pour le moins de diminuer, la part arbitraire des calculs d'indices présentés ci-dessus. La méthode proposée n'est toutefois valable qu'en Europe Centrale du fait des espèces retenues. La valeur de la qualité de l'air (LGW, Luftgütewerte) pour la parcelle étudiée est alors déterminée ainsi que sa précision au moyen de l'écart type correspondant. LGW permet ensuite de calculer les bornes de chaque classe de qualité de l'air qui permettent d'assurer une représentation cohérente en indices de qualité.

Devant la multitude des méthodes développées pour estimer la qualité de l'air en utilisant les lichens comme bioindicateurs, il convient tout d'abord de définir avec précision le but recherché, lui seul permettra de choisir la variante la plus appropriée à partir des avantages et inconvénients de chacune. Ainsi, la détermination d'indices (I.A.P., I.P., L.G.K.) permet de s'affranchir des paramètres régionaux inhérents ce qui n'est pas le cas de la méthode qualitative. En effet, celle-ci se réfère à la biodiversité des espèces et non seulement à l'aptitude à résister à une contrainte. Toutefois, les indices de qualité ne peuvent être facilement reliés à des taux de pollution établis puisqu'ils intègrent l'ensemble des espèces sans privilégier les espèces traceuses d'un polluant particulier ni considérer les variations des facteurs du milieu naturel (Qinghong and Brakenhielm, 1995). De plus, la corrélation entre les indices de pollution et la nature de celle-ci n'est pas constante, les meilleurs résultats étant obtenus pour les oxydes de soufre (Vandobben and Terbraak, 1999). Il faut aussi noter que les

différentes méthodes abordées ici ne présentent pas le même pouvoir résolutif : pour un site d'étude identique, la méthode de Hawksworth et Rose permet de distinguer plus de zones qu'avec le calcul des I.A.P., eux-mêmes plus résolutifs que les I.P. (Deruelle, 1978). Quant à la méthode de calcul du LGK, elle semble moins sensible que l'I.A.P. mais mieux corrélée à la diversité et la richesse spécifiques de la zone d'étude (Signoret, 1999).

Outre l'utilisation des caractéristiques de peuplement lichénique, les lichens sont aussi utilisés pour leurs capacités accumulatrices (Jovanic, *et al.*, 1995 ; Grasso, *et al.*, 1999 ; Lippo, *et al.*, 1995). En effet, grâce à la structure poreuse et hydrophile, les particules submicroniques vont pénétrer au sein du thalle et rester piégées dans le feutrage des filaments du champignon qui compose ces végétaux. Les métaux comme le plomb, le fer, le zinc ou le cadmium (Deruelle, 1984 ; Brown and Beckett, 1983 ; Deruelle, 1992 ; Cuny, 1997 ; Garty, *et al.*, 1997), les radioéléments comme le radium, le polonium ou l'uranium (Deruelle and Lallemand, 1983 ; Beckett, *et al.*, 1982 ; Abou, 1998) mais aussi les éléments chimiques divers tel le fluor, le chlore (Belandria, *et al.*, 1986 ; De Bruin and Hackenitz, 1986 ; Belandria and Asta, 1987 ; Asta, 1996), en font partie. Afin de permettre la comparaison des profils de pollution obtenus au cours des différentes études, la Commission européenne a créé un programme de certification (« Standards, Measurements and Testing Program »). Celle-ci a établi une référence lichénique appelée CRM 482 (Quevauviller, *et al.*, 1996). De plus, des banques de données regroupant méthodes d'analyses et résultats sont constitués (Steinnes, *et al.*, 1997).

L'utilisation des lichens en tant que bioindicateurs de la qualité de l'air permet donc l'étude d'un large éventail de polluants regroupant à la fois des formes gazeuses et particulaires. De plus, l'existence d'espèces sensibles à certaines formes chimiques ainsi que la présence d'espèces résistantes à longue durée de vie, autorisent un suivi à long terme de l'état de l'atmosphère en discriminant les acteurs de ces modifications. Toutefois, la

bioindication par les lichens nécessite une formation spécifique puisque toutes les méthodes sont basées sur la reconnaissance parfaite de chaque espèce. Certes, des recueils de systématique existent (Ozenda and Clauzade, 1970), mais aucun ne pourra remplacer l'œil du botaniste.

Les bryophytes

Parmi les bryophytes, les mousses sont fréquemment employées pour mesurer les dépôts atmosphériques de métaux². Il existe, en effet, une bonne corrélation entre les concentrations observées dans le tissu végétal et les teneurs de l'eau de pluie pour le cadmium, le cuivre, le fer, le plomb, le zinc et le vanadium (Ross, 1987 ; Berg, *et al.*, 1994 ; Torunn, *et al.*, 1994 ; Lippo, *et al.*, 1995). Les bryophytes sont aussi capables de fixer les radioéléments ce qui a permis de suivre la déposition du césium radioactif en Italie après l'accident de Tchernobyl (Giovani, *et al.*, 1994). Leur capacité à servir de bioindicateur dépend essentiellement de l'aptitude de l'espèce à absorber puis à fixer ces polluants ainsi que de leur indépendance vis à vis des apports minéraux du sol (Denayer, 1995 ; Brown and Brumelis, 1996). La quantité de métaux peut alors être attribuée aux dépôts atmosphériques secs et humides. *Hylocomium splendens* est ainsi utilisée en routine en Suisse depuis 1968 ainsi que dans les contrées nordiques (Danemark, Finlande, ...) depuis 1985 (Rühlin, *et al.*, 1987). De plus, Thomas (Thomas, 1986) montre que les mousses fixent aussi les hydrocarbures chlorés, comme les polychlorobiphényles (PCB), et les hydrocarbures polyaromatiques. Cependant, la mise en évidence de contamination des bryophytes par les métaux et les hydrocarbures nécessite l'utilisation de méthodes d'extraction délicates et un matériel d'analyse spécifique.

² La mesure des dépôts atmosphériques de métaux en France a été initiée par l'ADEME en 1996 dans le programme de recherche « Estimation des dépôts atmosphériques de métaux par mesure de leur accumulation dans les mousses »

Les bioindicateurs passifs sont donc utilisés par de nombreux scientifiques en tant qu'outils de diagnostic de la qualité de l'air. Ils répondent parfaitement aux besoins d'études sur de grandes étendues et intègrent des durées d'exposition importantes. Il est cependant clair qu'en contrepartie, ces points forts sont aussi limitant, rendant impossible leur utilisation sur le court terme (de l'ordre de 2 à 4 semaines) ou quelquefois en milieu urbain par défaut de colonisation ou d'existence du biotope.

2.2.2.3 Les bioindicateurs actifs

Pour pallier ces quelques inconvénients, les botanistes se sont penchés sur un nouveau mode d'utilisation des espèces végétales. Par opposition aux méthodes passives, ces bioindicateurs sont nommés actifs. Ces bioindicateurs sont des plantes importées sur le lieu d'étude. L'exposition de végétaux dans des serres spécifiques permet généralement de s'affranchir des restrictions précédentes et de faciliter la mise en évidence de relations causes - effets (Garrec and Radnai, 1996).

Le tabac

Ce végétal supérieur, très utilisé, est surtout sensible à l'ozone (Bytnerowicz, *et al.*, 1993). Polluant secondaire aujourd'hui essentiellement lié à l'activité de transport, il est particulièrement important en milieu urbain où il est difficile de trouver un maillage végétal homogène. Un système artificiel d'observation et d'exposition a donc été développé. Il utilise des bacs équipés d'un réservoir d'eau et contenant un sol composé de tourbe et de sable dans lequel sont repiquées des plantules de tabac de quatre semaines environ (stade 5 feuilles). L'alimentation en eau et en nutriments du végétal est donc assurée. De plus, l'ouverture stomatique est favorisée par la mise en place d'une ombrière facilitant encore l'exposition aux

polluants éventuels (Lorenzini, 1994 ; Lorenzini, 1995 ; Lorenzini, *et al.*, 1995). La taille réduite des bacs permet une implantation du système au sein du tissu urbain avec un maillage adapté à l'étude. De plus, l'emploi de plantules au lieu de plants adultes augmente la sensibilité de la méthode (Toncelli and Lorenzini, 1999).

L'évaluation de la pollution ozonée est estimée par la présence de nécroses foliaires caractéristiques qui apparaissent après une exposition chronique de une à deux semaines. Ces dommages peuvent être corrélés à la dose d'ozone à laquelle ils ont été exposés (Waber, *et al.*, 1994). De plus, afin de limiter l'influence des dommages liés à d'autres facteurs que la pollution atmosphérique sur les résultats, deux types de cultivars sont mis en place dans la même enceinte : le premier (*Nicotiana tabacum* L. cv Bel W3) représente l'élément sensible du système et le second (*Nicotiana tabacum* L. cv Bel B), résistant aux pollutions ozonées, constitue le contrôle (Garrec and Livertoux, 1997). Les nécroses observées sont représentées par des taches noires de petite taille. Toutefois, en milieu urbain, des taches larges, argentées, brunissant lentement et à apparition plus tardive que les précédentes ont pu être mises en évidence. Il semblerait que ce type de nécrose puisse être corrélé à la présence de PAN. Toutefois, cette relation reste, à l'heure actuelle, à démontrer (Van Halluwyn and Saison, 1997). La météorologie locale et divers facteurs de l'environnement comme la température, le vent ou l'altitude, doivent être pris en compte du fait de leurs effets sur les dommages liés à l'ozone (Ribas, *et al.*, 1998 ; Penuelas, *et al.*, 1999).

De même que pour les lichens, le calcul d'un indice de dommage foliaire permet l'établissement de cartes d'isopollution pour le composé incriminé (Kuppra, *et al.*, 1992). Déterminé chaque semaine, l'indice dénommé "LII" est essentiellement basé sur le rapport surface saine et surface nécrosée.

La bioindication de la qualité de l'air au moyen des plants de tabac est donc une méthode relativement simple à mettre en œuvre. Les contraintes liées à l'écosystème sont

négligeables dans la mesure où les plantules se développent en environnement contrôlé (qualité du sol et quantité d'eau prédéterminées). La qualité et la fiabilité des résultats obtenus augmentent par rapport aux bioindicateurs passifs. De plus, les critères de choix et de calcul sont suffisamment simplifiés pour permettre une utilisation de ces systèmes par des personnels ayant suivi une formation de courte durée. L'essentiel du travail réside donc dans un échantillonnage de sites adaptés au type d'étude réalisée. Enfin, l'apparition des symptômes est suffisamment rapide pour autoriser un relevé hebdomadaire. Il faut toutefois pondérer les choses en soulignant que, contrairement aux études relatives aux végétaux autochtones, les plants de tabac peuvent ne pas être adaptés à tous les climats. En outre, les champs de prospection sont actuellement restreints puisque seules des données relatives à l'ozone sont disponibles.

Les bryophytes

Les mousses peuvent aussi être employées comme système actif. Déposées dans des sacs de nylon à maillage lâche, pour éviter toute asphyxie, elles sont alors suspendues à quelques mètres du sol. Il est toutefois nécessaire de standardiser la taille ainsi que la densité des sacs pour assurer reproductibilité et comparaison des résultats d'analyse. Les bryophytes fixent alors les dépôts atmosphériques secs ou humides pollués par des métaux, des HAP ou des PCB (Hynninen, 1986 ; Steinnes, 1995 ; Wegener, *et al.*, 1990). Cette méthode présente comme avantage essentiel de pouvoir disposer de mousses en des lieux où elles sont naturellement absentes et de témoins plus aisés à réaliser (Tyler, 1990 ; Lodenius and Tulisato, 1984).

D'autres bioindicateurs actifs ont aussi été employés de manière plus épisodique. Parmi eux, les choux à feuilles frisées sont utilisés pour le suivi des dioxines et furannes (Mersch and Claveri, 1997) et le trèfle, pour l'ozone (Anonyme, 1996).

Les bioindicateurs actifs sont donc utilisés en tant qu'outils de diagnostic de la qualité de l'air. Ils répondent aux besoins d'étude contemporains. En effet, leur emploi est simple, rapide et ils permettent d'obtenir des données sur des sites dépourvus de végétation dont la sensibilité au stress polluant est connue. Leur utilisation tend donc naturellement à augmenter de même que les études de la qualité en l'air en milieu urbain ou périurbain.

2.2.2.4 Nouveaux développements

Les biomarqueurs

Les travaux relatifs aux végétaux évoqués précédemment, montrent que les polluants atmosphériques exercent une toxicité dont les manifestations conduisent, pour la plupart, à la sénescence. Cependant, ces effets ne sont que les symptômes de perturbations irréversibles du métabolisme cellulaire. Ainsi, l'induction d'isoenzymes et / ou les changements d'activité peuvent se révéler être des critères pertinents pour étudier la pollution atmosphérique. Dès 1974, Keller propose d'établir des cartes de pollution basées sur l'étude de la peroxydase qui est induite par les gaz oxydants tels que l'ozone ou le dioxyde de soufre (Keller, 1974 ; Castillo and Greppin, 1986 ; Navarri-Izzo and Izzo, 1994). De plus, ces mêmes composés provoquent l'augmentation d'activité la catalase (Osswald, *et al.*, 1992), de la superoxyde dismutase (Tanaka, *et al.*, 1982 ; Lee and Bennett, 1985 ; Willenkens, 1974) et de la glutathion réductase (Chiment, *et al.*, 1986 ; Melhorn, *et al.*, 1986).

La mise en évidence de ces altérations biochimiques sublétales devrait donc permettre d'augmenter la sensibilité de la bioindication et la rapidité du diagnostic de qualité de l'air (Vangrounsveld, *et al.*, 1997). Cependant, de nombreux facteurs peuvent induire les mécanismes de défense enzymatiques de la cellule. La synthèse de peroxydase est, par exemple, stimulée dès qu'il y a formation de dérivés de l'oxygène (Elstner, *et al.*, 1988), blessure des tissus ou infection par des pathogènes (Van Loon, *et al.*, 1983). Une meilleure compréhension des mécanismes du stress et le contrôle des conditions du milieu devraient

donc permettre de faciliter l'interprétation des modifications observées et fournir un outil de diagnostic précoce des effets de la pollution de l'air.

2.3 EFFETS SUR LA SANTE

2.3.1 Mécanismes généraux de défense de l'appareil respiratoire

L'appareil respiratoire possède un système de défense étagé (Reynolds, 1989) :

- *Premier niveau* : il est constitué par les fosses nasales et le rhino-pharynx. Ces éléments sont regroupés sous la dénomination anatomique de voies aériennes supérieures. Elles permettent à l'air inspiré d'arriver aux alvéoles dans des conditions physiologiquement acceptables (37°C ; air saturé en humidité). Ce système est muni de surfaces pileuses recouvertes de mucus, qui agissent comme un filtre retenant les particules de taille importante ou les composés gazeux très solubles.
- *Second niveau* : il est composé de l'appareil muco-ciliaire. Situé au niveau de l'arbre bronchique, il comprend les bronches et les bronchioles de génération 0 à 15 ainsi que la région des voies aériennes partiellement alvéolées, soit les bronchioles de génération 16 à 20. Ce système regroupe un ensemble de cellules ciliées chargées d'évacuer le mucus qui les recouvre, cette sécrétion piégeant une partie des particules, polluants et micro-organismes.
- *Troisième niveau* : situé au niveau alvéolaire, ce niveau de défense est, pour l'essentiel assuré par les **macrophages alvéolaires**. Ces cellules mobiles vont phagocyter, et si possible, lyser les contaminants qui n'auront pas été arrêtés par les étages supérieurs. Les phagocytes ayant rempli leur fonction seront évacués par l'appareil muco-ciliaire. Ces cellules ont aussi une activité sécrétoire conduisant à la libération d'une grande variété de médiateurs (médiateurs de l'inflammation, agents modulant la motricité bronchique et le comportement des cellules du système immunitaire, macrophages inclus).

2.3.2 Les polluants particuliers

Les polluants particuliers peuvent être répartis en trois classes en fonction de leur taille. Celle-ci détermine leur profondeur de pénétration dans le poumon (Grinet and Kedziora, 1998 ; Tourmann and Kaufmann, 1992) :

- *Diamètre équivalent supérieur à 10 μm* : elles sont rapidement arrêtées par les pilosités et le mucus qui revêt les fosses nasales, le rhino-pharynx et la bouche,
- *Diamètre équivalent compris entre 3 et 10 μm* : ces poussières sont présentes jusqu'au niveau des bronches où elles sont piégées par le mucus de l'appareil muco-ciliaire puis évacuées par déglutition ou expectoration,
- *Diamètre équivalent inférieur à 3 μm* : ces particules pénètrent dans l'appareil respiratoire jusqu'aux alvéoles où elles se déposent. Leur évacuation ne pourra alors être effectuée que par des cellules de l'immunité non spécifique, les macrophages alvéolaires.

Un adulte respire des dizaines de milliards de poussières par jour et environ la moitié se fixe dans les alvéoles. Le quartz, la silice (Allisson, *et al.*, 1966 ; Gross, *et al.*, 1969 ; Polzer, *et al.*, 1994), les poussières de charbon (Terzidis-Trabelsli, *et al.*, 1992 ; Jakab, *et al.*, 1995), l'amiante et les métaux (Loose, *et al.*, 1978 ; Blakley and Archer, 1981 ; Tourmann, *et al.*, 1995) ont tous, une action dépressive sur le nombre de macrophages alvéolaires soit sur la phagocytose (Demers and Kuhn, 1994). Celle-ci est d'autant plus importante que les composés sont solubles dans les liquides physiologiques (Adamson, *et al.*, 1999). Certains composés peuvent cependant induire une production accrue de médiateurs, comme l'IL-1 β dans le cas de l'amiante. Ces médiateurs peuvent conduire à des réactions allergiques voire des fibroses pulmonaires dans le cas de l'amiante (Holian, *et al.*, 1994). La présence de gaz oxydants associés aux poussières génère des effets additifs, notamment dans le cas du quartz (Polzer, *et al.*, 1994). Le département de la santé publique britannique a ainsi déterminé

qu'un homme vivant dans une atmosphère moyennement polluée, soit avec une teneur moyenne de $27 \mu\text{g} / \text{m}^3$ de particules de taille inférieure à $10 \mu\text{m}$, fixerait $95 \mu\text{g}$ d'aérosol par jour. Ces valeurs correspondent aux valeurs moyennes enregistrées par AIRPARIF en Ile de France, et ces chiffres triplent les jours de forte pollution : ceci aboutit à environ à 80 milliards de particules fixées par jour pour un adulte, soit 270 à 750 particules par alvéole. De plus, les poussières sont souvent de bons adsorbants capables de fixer des toxiques variés comme les composés organiques volatils (COV) dont font partie les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Les composés adsorbés peuvent, entre autres, créer des phénomènes de sensibilisation des voies respiratoires favorisant l'apparition de crises d'asthme (Dearman, *et al.*, 1992). Il en est de même lorsque l'exposition à des particules est accompagnée de gaz oxydants comme le NO_2 ou, plus généralement irritants (Boren, 1967 ; Zamitt-Tabona, *et al.*, 1983 ; Zeiss, *et al.*, 1980). Elles peuvent aussi contenir des métaux aux propriétés toxiques importantes.

Le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique, placé sous la tutelle du Ministère de la Santé, a établi en 1993 une liste des pathologies liées à la présence des particules fines dans l'atmosphère avec notamment (Anonyme, 1993) :

- une hypersensibilité et des réactions allergiques
- les phénomènes aigus ou chroniques d'irritation de la muqueuse respiratoire (bronchites) qui peuvent parfois engendrer une augmentation de la viscosité du sang liée à une libération d'agents vasodilatateurs transformant l'irritation en crise respiratoire aigue et parfois en accident cardio-vasculaire (Seaton, *et al.*, 1995 ; Becker, *et al.*, 1996 ; Burnett, *et al.*, 1999 ; Anonyme, 1997).
- les altérations de la fonction respiratoire (asthme). Le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique a pu déterminer que le risque de crise d'asthme chez l'enfant augmente de 10 % pour $100 \mu\text{g}$ de particules / m^3 (Anonyme, 1993)

- une susceptibilité accrue aux infections respiratoires
- des modifications morphologiques des voies aériennes
- la mort de certaines cellules cibles (foie, rein, cerveau, ...) liée à la toxicité de particules et produits absorbés.

De plus, l'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS) considère que l'augmentation des moteurs diesels qui produisent des particules fines (0,1 – 0,3 μm) est à l'origine d'un surcroît de cancers (Mage and Zali, 1992 ; Willet, *et al.*, 1996). D'autre part, le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC), l'Organisation Internationale de la Santé ainsi que leurs équivalents nationaux en Allemagne, aux Etats-Unis et en Suisse ont classé en 1988 ces poussières dans la catégorie des substances 2 A qui regroupe les produits à effet cancérigène établi chez l'animal avec effet limité chez l'Homme. Il est vrai que les études épidémiologiques visant à démontrer la responsabilité des poussières dans les phénomènes de cancérisation sont délicates à mener : un cancer se déclare en effet général 20 à 30 ans après l'exposition et le patient peut être mis en contact avec une multitude de composés eux aussi cancérigènes. Cependant, ces études, même si elles ne permettent pas encore de trancher définitivement la question, tendent à conforter la responsabilité des particules et des composés chimiques adsorbés à leur surface. Ainsi, les sujets vivant en milieu urbain voient leur chance de développer un cancer pulmonaire augmenter de 50 %, ceci étant renforcé chez les fumeurs (Holt, 1996 ; Seaton, *et al.*, 1995). Ceci se traduit par la volonté des pouvoirs publics de prendre en considération non seulement les particules dont le diamètre aérodynamique³ est inférieur à 10 μm (PM 10) mais aussi celles le diamètre aérodynamique est inférieur à 2,5 μm (PM 2,5).

³ Diamètre aérodynamique : diamètre d'une sphère parfaite ayant la même vitesse de sédimentation qu'une particule de forme quelconque

2.3.3 Les polluants gazeux

De même que les polluants particulaires, les gaz peuvent être regroupés en catégories en tenant compte, cette fois, de leur nature chimique.

- *Les composés organiques volatils (COV)* résultent le plus souvent de la mauvaise combustion des énergies fossiles ou de l'évaporation de réservoirs de stockage. Ces composés peuvent pénétrer jusqu'au niveau alvéolaire où ils ont des effets carcinogènes, mutagènes et immunodépresseurs, altérant les capacités de la réponse immunitaire cellulaire spécifique et non spécifique (Bernstein, *et al.*, 1982 ; Howe, *et al.*, 1983 ; Keskinen, *et al.*, 1988 ; Maccia, *et al.*, 1976 ; Moller, *et al.*, 1985 ; Tanser, *et al.*, 1973). Le benzène, les éthers de glycol (Irons and Neptun, 1980 ; House, *et al.*, 1985 ; Rosenthal and Snyder, 1987 ; Klan, *et al.*, 1990) et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dont le 7, 12 diméthylbenzanthracène (DMBA) (Jullien, 1995) diminuent par exemple la phagocytose macrophagique.
- *Les gaz acides* (HF, HCl, SO₂), très solubles, seront majoritairement bloqués au niveau du rhino-pharynx, voire au niveau des bronches, par dissolution dans le mucus qui les recouvre (Masse, 1997). Ceci conduit, notamment dans le cas du SO₂, à une augmentation du nombre de rhinites chez les sujets soumis à des expositions chroniques et à des broncho-contractions sources de crises d'asthme. Ce phénomène peut apparaître dès 0,5 ppm de SO₂ pour des sujets sains alors qu'il se manifeste dès 0,1 ppm chez les asthmatiques (Barnes, 1995 ; Folinsbee, 1992). Les formes acides de ces composés peuvent aussi engendrer une déplétion de l'activité phagocytaire source d'infections pulmonaires (Schlesinger, 1987 ; Schlesinger, 1989 ; Kreyling, *et al.*, 1999).
- *Les gaz oxydants* (O₃, NOx) provoquent, quant à eux, une réduction de l'activité muco-ciliaire et une altération de la production de mucus qui conduisent à l'accumulation de micro-organismes et particules fines (Last and Kaisu, 1980 ; Lippmann, 1989 ; Von

Mühlendahl, 1997). De plus, la réactivité de l'appareil respiratoire est exacerbée par les expositions chroniques qui semblent plus dommageables que les expositions aiguës (Last, *et al.*, 1994 ; Wright, *et al.*, 1990). Des inflammations des tissus environnants suivies d'œdèmes et d'infections broncho-pulmonaires peuvent alors apparaître (Eisenberg, *et al.*, 1983 ; Friedman, *et al.*, 1992 ; De Vries, *et al.*, 1994). Toutefois, ce sont les macrophages alvéolaires, première ligne de défense du poumon profond qui sont les plus touchés par ces gaz (Voir 2.4.3). La diminution de la phagocytose, de la mobilité cellulaire et la stimulation de production de médiateurs de l'inflammation (cytokines) font partie des fonctions les plus affectées (Coffin and Gardner, 1972 ; Folinsbee, 1992 ; Pendino, *et al.*, 1994 ; Oberson-Geneste, 1995 ; Zelikoff, *et al.*, 1991, Delaunois, *et al.*, 1995 ; Devlin, *et al.*, 1994 ; Devlin, *et al.*, 1999). Il faut aussi noter que l'ozone a une action systémique puisqu'il affecte aussi les macrophages du système réticulo-endothélial comme ceux du foie ou de la rate (Laskin, *et al.*, 1994 ; Mustafa, 1990).

2.4 LES MACROPHAGES ALVEOLAIRES

2.4.1 Origine et rôle dans le système immunitaire pulmonaire

2.4.1.1 Origine

Les macrophages alvéolaires sont des cellules de l'immunité non spécifique appartenant au système des phagocytes mononucléés, encore dénommé système réticulo-endothélial (Male, 1994 ; Roitt, *et al.*, 1997). Ils dérivent de cellules souches de la moelle osseuse hématopoïétique (CFU-S) : ce sont donc des cellules de la lignée myélocytaire de type monocytaire. Les CFU-S donnent naissance à des pro-monocytes en présence de médiateurs puis aux monocytes circulant sous l'action du « colony stimulating factor » (CSF). Ce n'est que lors de l'arrivée des monocytes dans les organes cibles, que ceux-ci se

différencient en macrophages ou histiocytes, cette maturation pouvant être suivie par l'apparition du récepteur PAM1 dans le cas des macrophages alvéolaires (Kobzik, *et al.*, 1985 ; Stites, *et al.*, 1987 ; Abbas, *et al.*, 1994). Cette traversée des tissus fait suite à l'interaction des protéines de surface MAF-1 (macrophage fonctionnel antigène – 1) et de l'endothélium des capillaires. De plus, la présence de cytokines, comme IL-1 (interleukine-1), TNF- α (tumeur necrosis factor- α) et Inf γ (interféron γ), provoque l'augmentation des molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales et pourrait constituer un stimulus permettant l'émigration des monocytes (Gordon, *et al.*, 1992 ; Seljelid and Budmund, 1993). Ces phénomènes permettent d'assurer le renouvellement de l'intégralité de la population alvéolaire en un peu moins de 100 jours (Hocking and Golde, 1979). Il existe, par exemple, un flux de 10^6 à 3.10^6 macrophages par heure chez le rat (Schwartz and Christman, 1979). De plus, les macrophages alvéolaires semblent pouvoir, dans une certaine mesure, se répliquer *in situ*. Le nombre de phagocytes alvéolaire est donc maintenu constant par l'apport de cellules en provenance de la voie sanguine, pour la majorité, et de divisions intra-pulmonaires mais aussi par un flux sortant de cellules via l'appareil muco-ciliaire et les canaux lymphatiques (Bertalanffy, 1964 ; Shellito, *et al.*, 1987 ; Perez-Arellano, *et al.*, 1990 ; Briend-Sutren, *et al.*, 1990).

Les macrophages alvéolaires sont des cellules dont le diamètre varie entre 15 et 50 μm . Leur rapport noyau / cytoplasme est de l'ordre de 1 : 3 avec un nucléole fréquemment visible (Bach and Lesavre, 1993). Le cytoplasme révèle de nombreux lysosomes riches en enzymes hydrolytiques (Weissmann, 1967). Les organites incluent aussi bien un appareil de Golgi que des mitochondries. Quant au réticulum endoplasmique, il est essentiellement rugueux.

Les macrophages alvéolaires se développent sur une interface « air – tissus », dont ils assurent l'intégrité, et sont donc directement exposés aux particules, micro-organismes et

molécules gazeuses inhalés. Ces cellules ont donc développé un métabolisme spécifique afin de s'adapter aux conditions de l'environnement aérien des alvéoles, notamment en augmentant l'activité des cytochromes oxydases impliquées dans la phosphorylation oxydative au détriment des pyruvates kinases (Simon, *et al.*, 1977). Toutefois, les macrophages alvéolaires restent proches des autres types de macrophages (Anderson, *et al.*, 1990). Ils partagent ainsi partiellement le phénotype des macrophages de la rate et du péritoine (Falkenberg, *et al.*, 1992) avec des degrés d'expression des déterminants membranaires différents en fonction de leur degré de maturation (Johansson, *et al.*, 1997).

2.4.1.2 La phagocytose

Les macrophages alvéolaires sont la première ligne de défense du poumon profond contre les particules, qu'elles soient d'origine chimique ou biologique (Brain, 1992 ; Hocking and Golde, 1979).

Leur mode d'action est essentiellement basé sur la phagocytose qui décrit une fonction endocyttaire réservée à l'ingestion de particules de taille supérieure à 10 nm. Celle-ci se déroule en plusieurs étapes (Giannis, *et al.*, 1994 ; Millon, *et al.*, 1985 ; Van Oss, 1986) :

1. Déplacement du phagocyte : le chimiotactisme

Le chimiotactisme est la mise en mouvement orientée de la cellule en réponse à un gradient de médiateur, appelé chimioattracteur, émis par une cible qui peut être d'origine endogène ou exogène. Les macrophages se regroupent alors autour du foyer infectieux (Warheit and Hartsky, 1993).

Les macrophages sont très sensibles aux gradients de molécules chimiotactiques telles que le C5a, le fMLP (n formyl Méthionine Leucine Phénylalanine) ou les LPS (lipopolysaccharides). Ces agents sont émis par les cellules dégradées ou lésées et les

bactéries potentiellement pathogènes. Les phagocytes, mis au contact de telles substances, migrent en suivant un gradient de concentration positif, c'est à dire en direction des plus fortes concentrations de chimioattracteur. Ces composés potentialisent aussi les phagocytes en augmentant la quantité de récepteurs de surfaces impliqués dans la phagocytose comme le récepteur du fragment Fc des immunoglobulines (Brown, *et al.*, 1987).

2. Adhésion à la particule

Elle implique la mise en jeu de récepteurs membranaires, le macrophage étant arrivé à proximité de sa cible. Ces récepteurs peuvent agir seuls ou par action combinée comme le récepteur du mannose et du bêta-glucane dans le cas de la phagocytose de *Saccharomyces cerevisiae* (Giaimis, *et al.*, 1993). Les macrophages sont pourvus de (Walker, *et al.*, 1991) :

- récepteurs pour les lectines
- récepteurs pour le fragment Fc de certaines immunoglobulines (Ig E, Ig G1, Ig G2 et Ig M). C'est ainsi que la présence d'une couverture d'Ig E sur une cellule ou un micro-organisme provoque sa destruction par les macrophages
- récepteurs pour les facteurs d'inhibition de la migration (MIF) et d'activation de la migration des macrophages (MAF)
- récepteurs pour les substances chimiotactiques comme le CD 14 et le CD 18 (CD 11a et CD 11b) dans le cas des LPS. La qualité de ces récepteurs dépend de l'espèce. A titre d'exemple, le rat ne possède pas de récepteurs pour le fMLP
- récepteurs non spécifiques tels que les groupements « -SH » libres qui permettent notamment la fixation des protéines.

L'adhésion du macrophage à sa cible provoque le déclenchement de la troisième étape.

3. Phagocytose et vacuolisation

Cette étape conduit à la formation d'une vésicule, appelée endosome ou phagosome, au sein du cytoplasme macrophagique. Elle est accompagnée d'une poussée respiratoire, ou activation du métabolisme oxydatif, qui correspond à une augmentation brutale de la consommation d'oxygène.

La phagocytose est toutefois influencée par les variations du milieu comme le pH, la température ou l'osmolarité mais aussi par la présence de certains anions ou cations. Ainsi, la présence d'ions calcium (Ca^{2+}) et magnésium (Mg^{2+}) est nécessaire à son déroulement. L'internalisation est maximale pour 1 à 2 mM de ces deux ions alors que des concentrations plus élevées semblent l'inhiber (Absolom, 1986).

4. Digestion

L'endosome précédemment formé, s'associe aux lysosomes dits primaires, de type I ou phagolysosomes. Ces vésicules, produites par l'appareil de Golgi, sont riches en enzymes (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase, etc.) et agents bactéricides (H_2O_2 , NO, etc.). Cette fusion entraîne la formation d'un lysosome de type II, dont le milieu acide facilite la dégradation des particules exogènes. Une fois le contenu de cette vésicule neutralisé ou digéré, le lysosome de type III, sera détruit. Les antigènes dégradés dans le lysosome seront alors transférés sur les molécules du CMH des phagocytes, incorporés à leur membrane cytoplasmique puis présentés aux lymphocytes afin de déclencher une réponse immunitaire spécifique.

2.4.1.3 La mobilité

La fonction principale des macrophages est donc la phagocytose. Cependant, cette étape implique le déplacement de la cellule jusqu'à sa cible. Or le rat possède un macrophage pour trois alvéoles, et l'homme soixante treize par alvéole (Schwartz and Christman, 1979 ; Brunnequell, *et al.*, 1996). La zone d'action de ces cellules est donc importante, ce qui fait du déplacement une étape indispensable à l'élimination ou à la neutralisation de la cible et permet le maintien de l'intégrité des parois alvéolaires (Fisher and Lauffenburger, 1990 ; Yu, *et al.*, 1989).

Plusieurs types de déplacement cellulaire peuvent être mis évidence : le chimiocinétisme qui est le déplacement aléatoire de cellules activées et le chimiotactisme qui est orienté. C'est la dualité de ces deux modes de transport qui assure la rencontre des macrophages avec les éléments indésirables, actifs ou passifs, qui se déposent dans les poumons (Charnick and Lauffenburger, 1990 ; Gradon and Podgorski, 1995).

1. Chimiotactisme et chimiocinétisme

Les cellules mises au contact d'un activateur de la mobilité réparti uniformément dans une matrice d'agarose se répartissent alors uniformément sur le support. Le chimiocinétisme peut donc être assimilé à de la diffusion moléculaire. Cette diffusion est caractérisée par le coefficient μ fonction de la vitesse de la cellule, du temps de persistance de la direction et de la concentration de l'agent activateur uniformément réparti (Newton-Nash, *et al.*, 1990). Il varie de 10^{-9} cm²/s à 10^{-8} cm²/s pour des concentrations de 10^{-9} M en formyl norleucyl leucyl phénylalanine (FNLLP). Pour des concentrations supérieures à 10^{-9} M, il diminue et se stabilise à 3.10^{-9} cm²/s (Stikle, *et al.*, 1985 ; Glasgow, *et al.*, 1989).

Le chimiotactisme concerne le déplacement orienté de la cellule activée par un gradient d'activateur de la mobilité. Il est caractérisé par le coefficient χ qui dépend de la vitesse de la cellule mais aussi de la qualité du gradient de concentration de la molécule signal. Il n'est toutefois pas fonction de sa concentration (Lauffenburger, 1983). Les modifications de trajectoire résultent de la différence de saturation des récepteurs membranaires, la cellule s'oriente vers les gradients de concentration positifs (Ganz, 1993). La cellule est alors capable de changer de direction toutes les 30 s avec un effet mémoire de 75 s (Gruler and Bültmann, 1983 ; Hartman, *et al.*, 1994).

La combinaison de ces deux modes de déplacement conduit à une vitesse variant alors de 3 à 16 $\mu\text{m}/\text{min}$ (Allan and Wilkinson, 1978).

2. Mécanisme

La mobilité résulte de la déformation de la périphérie cellulaire sous l'action d'un stimulus chimiotactique, chimiocinétique voire physico-chimique. Lors de son déplacement, la cellule revêt une forme quasi triangulaire dont le sommet est constitué d'un lamellipode et la base du noyau. Ce mouvement s'accompagne de flux cytoplasmiques au sein de la cellule. Ceux-ci peuvent être observés par magnétopneumographie : cette technique consiste à observer les perturbations de champs magnétiques engendrées par le déplacement de cellules ayant phagocyté des particules ferromagnétiques (Fukushima, *et al.*, 1993 ; Moller, *et al.*, 1996). Les flux cytoplasmiques impliqués dans le déplacement cellulaire et l'activation cellulaire, sont dirigés de l'avant vers l'arrière sur la périphérie cellulaire alors qu'ils sont orientés de la base vers le front pour la partie centrale du lamellipode. Le déplacement est principalement assuré par deux familles de molécules (Stossel, 1994 ; Albert, *et al.*, 1994 ; Friedrich and Golsteyn, 1998) :

- *Les filaments d'actine.* Dans une cellule au repos, l'actine est présente pour moitié sous forme globulaire, appelée actine G, le restant l'étant sous forme polymérisée, nommée filament d'actine, actine fibreuse, ou actine F. L'actine G s'associe spontanément en noyaux générateurs de filaments. La quantité non polymérisée est maintenue en équilibre dynamique par des protéines comme les molécules de la famille des gelsolines, les molécules cap Z, etc. Celles-ci, en présence de Ca^{2+} , fragmentent les filaments et en recouvrent la zone d'accroissement, ou extrémité barbée, empêchant ainsi la polymérisation. Le cytoplasme est alors sous une forme « Sol ». Certaines molécules, comme les polyphospho-inositides, se fixent sur les gelsolines et les décrochent de l'actine. Les formes G peuvent alors polymériser en filament. Le cytoplasme prend une forme « Gel »
- *Les filaments de myosine.* Ce sont des filaments regroupant une centaine de molécules. Ils se composent d'une extrémité légère, d'une partie lourde et d'une tête mobile présentant deux lobes.

L'avance du lamellipode est provoquée par une stimulation externe qui entraîne la libération du Ca^{2+} stocké dans des vésicules présentes sur la face interne de la membrane cellulaire. La structure « Gel » de la périphérie de la cellule au repos se transforme alors en « Sol » et devient facilement déformable. De même, les filaments centraux se désorganisent et forment de l'actine G. Par contre, entre ces deux zones, le gradient de concentration de calcium crée un « Gel » affaibli suffisamment lâche pour être déformé mais assez solide pour permettre la transmission de forces de tractions générées par les filaments de myosine. La tête lobulaire de cette dernière se fixe sur les filaments du réseau d'actine et pivote sous l'action de Ca^{2+} et d'ATP (Adénosine triphosphate) assurant un déplacement de l'ordre de 20 nm. La stimulation externe de la cellule engendre aussi une pression interne qui pousse les sous unités

G au travers du « Gel » affaibli vers le front du lamellipode où les filaments peuvent être reconstitués permettant la réalisation d'un nouveau cycle (Figure 3) (Howard, 1997 ; Stossel, 1998).

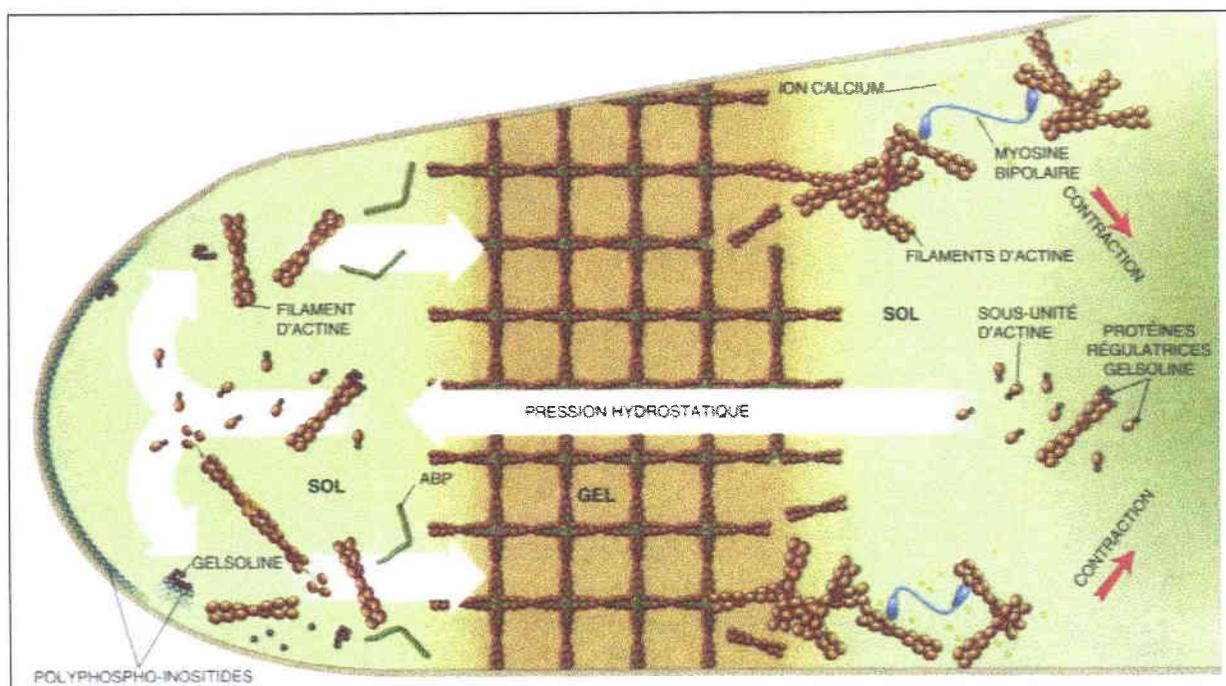


Figure 3 : Modifications de l'architecture cellulaire lors du déplacement (Stossel, 1994)

2.4.2 Les métabolites cellulaires produits

Outre leur fonction phagocytaire, les macrophages sont aussi des cellules sécrétrices. Elles produisent une série de molécules qui servent soit à protéger le phagocyte soit de médiateur (cytokines) pouvant recruter des cellules de l'immunité spécifique (d'autres macrophages) ou non-spécifique (monocytes) (Holian and Scheule, 1990 ; Miller, *et al.*, 1992). (Nathan, 1987). Parmi les molécules protectrices, le monoxyde d'azote (NO) et le

peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) sont destinés à détruire directement le corps étranger et à induire la synthèse de composés plus cytotoxiques (Koike, *et al.*, 1998).

2.4.2.1 Le peroxyde d'hydrogène

Ce métabolite réactif de l'oxygène est sécrété par les macrophages activés. En présence d'ions métalliques comme Fe^{3+} , H_2O_2 peut générer des radicaux hydroxyles, possédant des propriétés bactéricides (Mohanty, *et al.*, 1997). Il peut aussi traverser les membranes cellulaires et servir ainsi de messenger transcellulaire (Baeuerle, *et al.*, 1996). Le peroxyde d'hydrogène est une molécule centrale de la cytolyse essentiellement produite lors de la poussée respiratoire associée à la phagocytose (Murr, *et al.*, 1996). Sa formation implique soit la réduction de l'oxygène moléculaire, soit la dismutation de O_2^{\bullet} en présence d'un complexe NADPH-oxydase au niveau de la membrane des phagocytes (Rosen, *et al.*, 1995). Toutefois, les macrophages au repos ne synthétisent pas de O_2^{\bullet} . La présence de cette molécule est conditionnée par l'augmentation de la concentration du calcium intracellulaire et donc par l'activation de la cellule.

2.4.2.2 Le calcium intracellulaire

L'activation des macrophages est liée à une augmentation de l'activité du métabolisme oxydatif. Celle-ci s'accompagne d'une dépolarisation de la membrane plasmique et d'une élévation transitoire de la concentration en calcium qui, si elle est continue, entraîne une inhibition de la poussée respiratoire et l'assemblage de la NADPH-oxydase (Murphy, *et al.*, 1995). De plus, elle contribue en partie à l'induction de la NO synthase macrophagique. Le calcium sert donc de messenger lors de l'assemblage de la NADPH-oxydase et de la NO synthase.

2.4.2.3 Le monoxyde d'azote

NO est une molécule présente sous forme de radical libre (NO^\bullet) et à demi-vie relativement longue (5 à 30 s) (Holtzhütter, *et al.*, 1997). Chez les macrophages, c'est une molécule signal, et un composé cytotoxique qui agit directement par l'intermédiaire de son électron célibataire ou indirectement par interaction avec O_2^\bullet formant du peroxydinitrite (ONOO^\bullet) (Knowles, 1997). Ce dernier se décompose alors en radicaux HO^\bullet et NO_2^\bullet oxydant en particulier les groupements thiols, les lipides et l'ADN (MacMicking, *et al.*, 1997). D'autre part, NO est un inhibiteur de la prolifération lymphocytaire.

La synthèse du monoxyde d'azote peut être induite par activation des phagocytes via le récepteur membranaire CD23 après exposition à la n formyl Méthionine Leucine Phénylalanine (fMLP) (Dugas, *et al.*, 1995). De plus, une exposition chronique à l'ozone ou à des particules inhibe sa production et donc l'activité immunorégulatrice qu'exercent les macrophages alvéolaires sur la prolifération lymphocytaire (Bouthillier, *et al.*, 1998 ; Koike, *et al.*, 1998 ; Lacroix and Lambre, 1998). Toutefois, une exposition à l'ozone engendre des réponses antinomiques fonction de la dose employée. Ainsi, une exposition à 0,5 ppm diminue sa production alors qu'une exposition à 1 ppm l'augmente (Pendino, *et al.*, 1993).

Le NO est formé à partir de la L-arginine par les cellules de mammifère (Rubbo, *et al.*, 1994). Il est synthétisé par une classe spécifique de monooxygénases, les NO synthases. La NO synthase présente chez les macrophages, appelée NOS II, est une isoforme inductible calcium dépendant (Nadaud and Soubrier, 1996 ; Lacase-Masmonteil, 1992). NOS II est induite par diverses cytokines ($\text{INF-}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$, IL-1, IL-6, etc.) et les LPS (Niwa, *et al.*,

1997). En présence de NADPH, la NOS II insère deux atomes d'oxygène au sein de la L-arginine donnant naissance à la citrulline et à une molécule de NO (Figure 4).

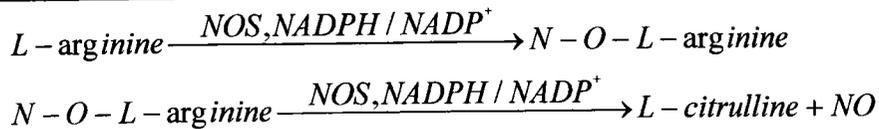


Figure 4 : Synthèse du NO à partir de la L-arginine

2.4.3 Influence de la pollution atmosphérique

Les macrophages alvéolaires, se développent à l'interface « air – tissu » : ils sont donc particulièrement exposés aux polluants atmosphériques.

De nombreux articles font état des relations entre les macrophages alvéolaires et la pollution atmosphérique avec des études *in vivo* et *in vitro* (Gardner, 1984). Dans le premier cas, les phagocytes sont récupérés par lavage broncho-alvéolaire après exposition d'animaux, ou d'humains volontaires, au(x) polluant(s) (Aranyi, *et al.*, 1981 ; Davies, *et al.*, 1987 ; Becker, *et al.*, 1991). Dans le second cas, les cellules sont soit récupérées par lavage broncho-alvéolaire soit issues de cultures puis exposées au(x) polluant(s). Dans cette optique, plusieurs techniques ont été proposées : emploi de « roller tubes », culture sur boîtes de Pétri exposées et baignées alternativement dans du milieu de culture ou culture en phase gazeuse (Bolton, *et al.*, 1982 ; Tarkington, *et al.*, 1994 ; Valentine, 1985 ; Voisin, *et al.*, 1977). Ces méthodes permettent toutes de mesurer de nombreux paramètres relatant l'état ou l'efficacité des cellules : nombre, viabilité morphologie, fonctions, etc.

2.4.3.1 Flux cellulaires

En conditions normales, le nombre de macrophages est relativement constant dans les alvéoles. En moyenne, leur population représente 3 à 5 % des cellules alvéolaires chez l'homme (Lehnert, 1992). Cependant, une exposition à l'ozone ou au dioxyde d'azote modifie la population cellulaire. Une exposition aiguë (1 ppm – 3 heures) ou chronique (0,5 ppm – 8 h/j – 8 j) diminue ainsi le nombre global de phagocytes. Cette variation peut être expliquée par une mortalité accrue mais aussi par une inhibition de la réplication de l'ADN (Coffin, *et al.*, 1968 ; Driscoll and Vollmuth, 1987 ; Rithidech, *et al.*, 1990 ; Steinberg, *et al.*, 1990 ; Prokhorova, *et al.*, 1998). De plus, la proportion de macrophages de grande taille augmente en parallèle avec la concentration de polluant. Toutefois, après une période d'exposition variant de 1 à 3 jours en fonction de la dose absorbée, la population macrophagique se renouvelle avec des cellules immatures plus résistantes au stress polluant (Chang, *et al.*, 1995 ; Mochitate, *et al.*, 1992). Ces phagocytes sont de petite taille et présentent des fonctions phagocytaires accrues (Dormans, *et al.*, 1990). Après 20 jours d'exposition, le nombre de macrophages diminue à nouveau, de même que leur activité (Christman and Schwartz, 1980).

2.4.3.2 La mortalité

En plus de la numération, la détermination de la proportion de cellules viables est un critère déterminant de l'efficacité du système de défense de l'appareil pulmonaire. Celle-ci est le plus souvent évaluée :

- *par coloration au bleu Trypan*. Décrit par Philips, ce test est basé sur l'appréciation de la lyse cellulaire grâce à un colorant vital s'incorporant aux cellules dont l'intégrité membranaire n'est pas maintenue (Philips, 1973).
- *par coloration aux sels de tétrazolium* dont le MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,2-diphényl-tétrazolium bromique). Ces sels, couplés à un transporteur d'électrons comme la

phénazine méthosulfate (PMS), sont réduits en sels de formazan qui sont mesurés. La coloration obtenue est proportionnelle au nombre de cellules viables (Mizutani and Bonavida, 1993 ; Loing, 1994 ; Gery, 1997).

- *par détermination d'un index de cytotoxicité basé sur la quantité d'ATP.* Ce vecteur de l'énergie cellulaire, est stocké dans les mitochondries des cellules eucaryotes, est consommé dans la plupart des réactions nécessitant de l'énergie et est reconstitué lors de la respiration. A la mort de la cellule, l'ATP disparaît rapidement sous l'action des adénosines triphosphatases qui ne sont plus régulées. La quantité d'ATP est donc proportionnelle au nombre de cellules viables (McElroy, 1963 ; Voisin, *et al.*, 1977)
- *par détermination d'un index de cytotoxicité basé sur la quantité de LDH (lactate déshydrogénase).* Cette enzyme cytosolique, NAD-dépendante, catalyse le pyruvate en lactate. La LDH des cellules mortes étant libérée dans le milieu, la détermination de la proportion d'enzymes intracellulaires et extracellulaires est un indicateur de la viabilité cellulaire (Korzeniewski and Callewaert, 1983 ; Petersen, *et al.*, 1990 ; Racher, *et al.*, 1990). Il faut cependant noter que la mise en œuvre de cette technique nécessite quelques précautions car le taux de LDH intracellulaire varie en fonction de la lignée cellulaire et des conditions de culture (Marc, *et al.*, 1990).

L'exposition à des polluants gazeux, comme O₃ ou NO₂, altère la viabilité des macrophages alvéolaires. De plus, ceux-ci peuvent être sensibilisés par la présence d'autres molécules présentes à l'état de traces (Aerts and Voisin, 1981 ; Gery, *et al.*, 1995 ; Gery, *et al.*, 1995). De même, une exposition à un mélange complexe de polluants, comme la fumée de tabac ou les rejets atmosphériques industriels, diminue le nombre de cellules viables (Aerts, *et al.*, 1979 ; Gery, 1997).

Les causes de mortalité cellulaire sont variables. Dans le cas de l'ozone, il semble que le site d'action préférentiel soit la pompe « sodium / potassium ». L'équilibre osmotique de la cellule n'est alors plus assuré. Ces effets, surviennent dès 2 ppm en exposition chronique sans peroxydation lipidique notable (Dowell, *et al.*, 1970).

De plus, les facteurs protecteurs du surfactant qui recouvre les alvéoles, sont eux aussi détruits par les gaz oxydants favorisant ainsi la lyse cellulaire (Gardner, *et al.*, 1971).

2.4.3.3 Phagocytose

Pour assurer le maintien de la stérilité dynamique des poumons, les macrophages alvéolaires doivent non seulement être en nombre suffisant et viables mais aussi, et surtout, pouvoir distinguer les éléments étrangers et les éliminer des alvéoles où ils se sont déposés. Or, les capacités phagocytaires de ces cellules sont altérées par la présence de polluants atmosphériques. L'ozone provoque une diminution notable dès 0,5 ppm (Gilmour, *et al.*, 1991 ; Wendzel and Morgan, 1983). Il en est de même pour les NOx, le SO₂, et les mélanges complexes comme le montre la fumée de cigarette (Schlesinger, 1987 ; Schlesinger, 1987 ; Skornik and Brain, 1990 ; Moller, *et al.*, 1996 ; Zelikoff, *et al.*, 1997). La diminution de la phagocytose implique que les bactéries qui se déposent dans les alvéoles ne sont plus éliminées. Libres de se développer, elles génèrent des infections pulmonaires pouvant conduire au décès du sujet atteint (Gilmour, *et al.*, 1993 ; Gilmour and Selgrade, 1993 ; Lacroix and Lambre, 1998). Il semble cependant, *in vitro*, qu'un prétraitement avec un inhibiteur de la cyclooxygénase abolisse l'altération de la phagocytose dans le cas d'expositions à l'ozone. De même, les expositions chroniques diminueraient l'impact des expositions aiguës (Canning, *et al.*, 1991 ; Van der Wal, *et al.*, 1994).

La complexité des étapes de la phagocytose fournit un nombre important de sites potentiels qui peuvent être perturbés par les polluants de l'environnement :

- altération des récepteurs impliqués dans la phagocytose (Gilmour, *et al.*, 1991 ; Prasad, *et al.*, 1988 ; Devlin, *et al.*, 1991)
- inhibition de la présentation de l'antigène (Becker, *et al.*, 1991)
- diminution du nombre de lysozymes (Kimura and Goldstein, 1981)
- augmentation de l'adhérence aux cellules épithéliales médiée par l'interleukine-1 et le TNF- α qui tend à fixer les cellules sur leur support (Pearson and Bhalla, 1997)
- diminution de la mobilité cellulaire (Creutzenberg, *et al.*, 1995 ; Knorst, *et al.*, 1995 ; McAllen, *et al.*, 1981). Il semble que celle-ci soit principalement due à des variations de composition de la membrane cytoplasmique, notamment à une augmentation du récepteur CD11b induisant la fixation des phagocytes aux cellules épithéliales (Bhalla, 1996).

Les techniques développées pour mettre en évidence les déficits de la phagocytose en évidence sont :

- l'observation d'un développement bactérien généralement induit (Gilmour, *et al.*, 1993)
- le dénombrement de particules ingérées (Giannis, *et al.*, 1992)
- la mesure de la mobilité grâce à une migration sous agarose, en chambre de Boyden ou sur plaque d'or (Knorst, *et al.*, 1995 ; Lombard, *et al.*, 1994 ; Creutzenberg, *et al.*, 1995).

2.5 OBJECTIFS

Une évolution naturelle des techniques de bioindication consiste à utiliser des organismes possédant à la fois un temps de réponse plus faible que les végétaux et des possibilités d'intégration aux réseaux de mesures physico-chimiques.

Ainsi, l'expérimentation animale montre que les gaz oxydants, tels l'ozone et le dioxyde d'azote, ont une action dépressive sur les défenses immunitaires. Voisin a donc proposé une procédure d'exposition de cellules de lignée monocyttaire, appelée « mise en survie en phase gazeuse » (Voisin, *et al.*, 1977). Les macrophages préparés peuvent alors être mis au contact d'atmosphères polluées (Aerts, *et al.*, 1979). Des concentrations de l'ordre de la partie par million de NO₂ et d'ozone ont pu être mises en évidence au bout de 30 minutes d'exposition seulement par détermination de la viabilité cellulaire (Voisin, *et al.*, 1977 ; Voisin, *et al.*, 1979 ; Voisin, *et al.*, 1979). La mesure se réduit donc à une simple coloration et une mesure en spectrophotométrie dans le visible. Faisant suite à ces travaux, un test biologique de surveillance de la qualité des fumées d'incinération de déchets a vu le jour. Il associe la mise en survie en phase gazeuse des macrophages à un système d'exposition permettant la mise en contact des cellules avec les polluants (Wallaert, *et al.*, 1996 ; Gery, 1997). Ce test est actuellement en cours de normalisation par l'AFNOR. Toutefois, ces techniques nécessitent la présence d'un opérateur afin de quantifier la mortalité cellulaire et d'en déduire la charge polluante.

D'autre part, les effets des gaz polluants sur la mobilité ont été montrés en employant des chambres de Boyden ou la migration sous agarose. L'apparition des techniques d'analyse d'images devrait permettre de quantifier le déplacement des phagocytes plus rapidement. **L'objectif principal de cette étude est d'étudier l'influence de l'ozone, polluant atmosphérique majeur, sur la mobilité de macrophages en développant un système de traitement basé sur l'analyse d'images, capable de fournir en continu des données**

représentatives des répercussions physiologiques de ce polluant. Le **deuxième objectif concerne la réalisation d'un biocapteur autonome qui permettrait de compléter la panoplie d'appareils physico-chimiques des réseaux de mesure par un outil apte à prendre en compte la qualité globale de l'air tout en étant plus proche de l'impact sur la santé humaine**. La qualité de l'air respiré pourrait alors être jugée par son action immédiate sur du matériel biologique proche de l'animal et la nature des polluants déterminée grâce aux analyses de routine physico-chimiques.

Toutefois, l'étude des variations biochimiques et physiologiques de macrophages exposés à une charge polluante a aussi été abordée. Ainsi, la mesure de la production de NO, de H₂O₂ et des taux de calcium permettra d'évaluer le degré d'atteinte des mécanismes de protection de ces cellules et de compléter les variations de leurs capacités immunitaires.

MATERIELS

et

METHODES

3 MATERIELS ET METHODES

3.1 LE MATERIEL BIOLOGIQUE

3.1.1 Cellules employées

Les cellules appartiennent à la lignée myélocytaire monocytaire THP-1 (ATCC TIB-202). Elles sécrètent des cytokines dont IL-1 et TNF- α (Krakauer, 1985 ; Baqui, *et al.*, 1998). Leur membrane possède, entre autres, des récepteurs CD 16 (récepteur du fragment Fc des Ig G), des récepteurs pour le fragment C3b du complément et, en quantité moindre, des récepteurs CD 14 (récepteurs pour les LPS). Elle porte aussi des antigènes HLA de classe II dont les allèles -A2, -B5, -DRw1, -DRw2 ont été identifiés chez la cellule non activée. Ils sont complétés par les allèles -DP et -DQ après induction par INF γ (Yunis, *et al.*, 1989). L'ensemble de ces caractéristiques permet de classer cette souche en tant que monocyte.

Toutefois, les THP-1 sont douées de capacités phagocytaires dont la phagocytose médiée par le CD 16. Elles ont une activité lysosomale et peuvent se différencier en macrophages matures sous l'action d'un facteur externe comme des cytokines ou l'ajout de phorbol diester au milieu de culture par exemple (Tsuchiya, *et al.*, 1982).

Les THP-1 sont donc utilisées en tant que modèle soit pour les monocytes soit pour les macrophages ce qui leur vaut l'appellation de « macrophage like cells » ou de macrophage immature (Abrink, *et al.*, 1994 ; Delannoy, *et al.*, 1997 ; Ouchi, *et al.*, 1997). Elles conservent leurs caractéristiques de macrophages immatures durant au moins 14 mois (Tsuchiya, *et al.*, 1980). Après ce laps de temps, certaines d'entre elles se transforment en macrophages matures, dénommées THP-1-activées ou THP-1-a (Tominaga, *et al.*, 1998).

3.1.2 Milieu de culture

Le milieu de culture se compose de Roswell Park Memorial Institute 1640, plus connu sous l'appellation RPMI 1640, (Life Technology, Cergy-Pontoise, France) contenant du 2-mercaptoéthanol à une concentration de $2 \cdot 10^{-5}$ M, en tant qu'anti-oxydant, et supplémenté en :

- sérum de veau fœtal (Dominique Dutsher SA, Brumath, France) décomplémenté par chauffage à 56°C pendant 30 minutes (10 % du volume final de milieu de culture préparé),
- antibiotiques formés par une solution de pénicilline à 5000 U / ml et de streptomycine à 5000 µg / ml (1 % du volume final de milieu de culture préparé),
- glutamine à 200 mM (0,1 % du volume final de milieu de culture préparé).

3.1.3 Culture d'entretien

Les THP-1 sont conservées par une culture en flacon de 75 cm² à bouchon ventilé (Nunc). Elles sont cultivées de façon à maintenir une concentration cellulaire moyenne de 10⁶ cellules / ml, ce qui nous conduit à une remise en culture tous les quatre jours. Les dénombrements sont réalisés sur cellules de Mallassez.

Pour renouveler le milieu de culture, les cellules en suspension sont récupérées par centrifugation à 150 x g pendant 10 minutes (JOUAN BR 3.11). Le surnageant éliminé, les phagocytes sont repris dans le milieu présenté ci-dessus, préchauffé à 37°C. Les cellules sont déposées dans les flacons de culture puis placées dans un incubateur à CO₂ thermostaté à 37°C, à atmosphère saturée en humidité et enrichie à 5 % de CO₂ (Forma Scientific 3548).

3.2 ELABORATION DU MONTAGE DE PAILLASSE ET ESSAIS ASSOCIES

3.2.1 Systèmes d'exposition aux polluants atmosphériques

L'utilisation de la mobilité des macrophages alvéolaires pour mesurer la qualité de l'air a nécessité la mise au point d'un système d'exposition spécifique permettant de mettre les cellules au contact de la charge polluante et de stimuler leur déplacement tout en assurant leur survie.

Plusieurs systèmes ont été utilisés : lames de microscope pour immunofluorescence ou chambres à lamelle modifiées pour faciliter la diffusion de chimioattracteur, boîtes de Pétri, ... Après avoir essayé chaque prototype de cellule d'exposition, il s'est avéré que tous présentaient au moins l'un des inconvénients suivants : dessèchement de la suspension cellulaire avant la fin du temps d'essai, diffusion non homogène du chimioattracteur ou adhésion des macrophages au support.

Un système d'exposition basé sur des flacons pour culture cellulaire a donc été mis au point afin de répondre à l'ensemble des critères de sélection. Le bouchon du flacon reçoit le tuyau d'arrivée des gaz. D'autre part, la face opposée est percée d'orifices également répartis sur la surface permettant d'éviter la formation de courants gazeux préférentiels : la diffusion des polluants est alors quasiment homogène (Figure 5).

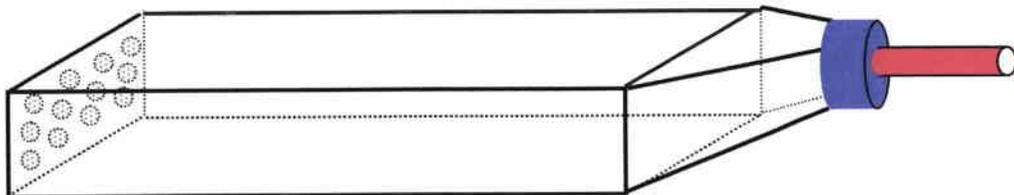


Figure 5 : Cellule d'exposition avec arrivée pour passage de gaz.

L'ensemble de ces opérations est réalisé en préservant la stérilité du flacon de culture.

Il permet donc :

- La survie des macrophages (utilisation d'un flacon de culture, stérilité maintenue jusqu'à la phase d'exposition)
- La mobilité cellulaire (surface non adhérente)
- L'exposition aux polluants atmosphériques (bouchon et flacon percé)

3.2.2 Système d'analyse

Il se compose du système d'exposition précédent connecté à la source de gaz. Le flacon d'exposition est déposé sur la platine chauffante d'un microscope inversé (Olympus modèle CHS) muni d'une unité de régulation thermique pour gamme ambiante « + 50°C » de précision 0,3°C. Il est équipé d'oculaires 10 X et d'un objectif 20 X. La prise d'image est réalisée au moyen d'une caméra CCD ½ pouce noir et blanc (Sony) reliée au microscope par un oculaire de projection vidéo 2,5 X occulté par un filtre vert améliorant les contrastes. Cet ensemble est placé dans une enceinte thermostatée à 37°C. Assistée par la platine chauffante, elle permet de conserver les cellules à 37°C et d'amener les gaz à bonne température.

Le système d'analyse d'images est composé d'un micro-ordinateur équipé, pour la partie hardware, d'un microprocesseur de type Pentium 100 MHz (Intel TM) à architecture PCI monté sur une carte mère Intel PCI 64 bits à chipset Triton. Celle-ci possède 16 Mo de RAM EDO, une carte vidéo Matrox Millenium ainsi qu'une carte d'acquisition Neoteck (National Instrument TM). La partie software est composée du système d'exploitation Windows 95 (Microsoft ©), du logiciel d'analyse d'images Optilab (National Instrument ©), du logiciel de programmation Labview (National Instrument ©).

L'ensemble du système est présenté sur la Figure 6.

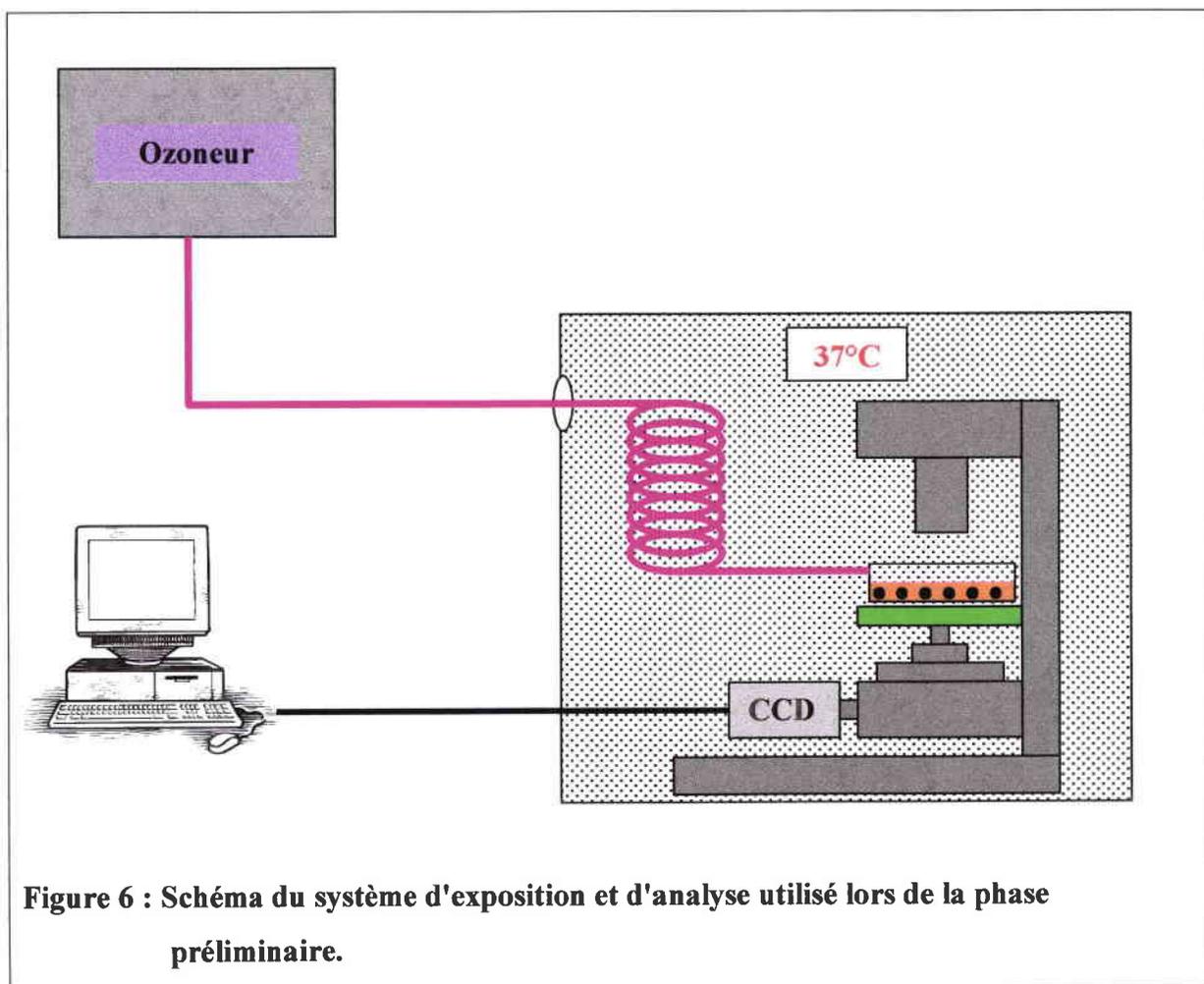


Figure 6 : Schéma du système d'exposition et d'analyse utilisé lors de la phase préliminaire.

3.2.3 Production de l'ozone

3.2.3.1 Production : Calibreur Portable Modèle 175

L'ozone est produit au moyen d'un Calibreur Portable Modèle 175 équipé d'un générateur d'air zéro (filtre à charbon actif couplé à une pompe à membrane et à un filtre 0,22 µm) fournissant un débit d'air de 3 L/mn (Thermo Environmental Instruments Inc.). Cet outil est conçu pour produire des concentrations multipoints de polluants atmosphériques en associant un ozoniseur interne et un système de dilution par capillaires fournissant trois concentrations plus un zéro. La gamme de concentrations d'ozone produites varie de 0 à 1100 ppb avec un débit de 3 L/mn. Le générateur d'air zéro sera employé seul afin de produire de l'air « propre » pour les séries d'essais où les cellules ne sont pas intoxiquées.

Le générateur d'ozone peut donc être utilisé comme standard de transfert pour l'étalonnage des analyseurs d'ozone mais le modèle 175 peut aussi être employé comme diluteur multi-polluants. Les rapports de dilution sont « Concentration du gaz / 80 », « Concentration du gaz / 190 » et « Concentration du gaz / 575 ».

D'autre part, les gaz passant dans le diluteur et l'ozone produit par le générateur, se rejoignent dans une chambre de mélange. Le modèle 175 peut être employé afin de générer des oxydes à partir des gaz introduits dans le diluteur. Il est notamment possible d'oxyder du monoxyde d'azote par de l'ozone et former ainsi du dioxyde d'azote.

3.2.3.2 Calibrage du Modèle 175

Le Calibre Portable Modèle 175 est équipé d'un potentiomètre de réglage de concentration d'ozone. Celui-ci permet de moduler la tension appliquée à la lampe UV qui le génère. Il convient donc de réaliser une calibration de l'appareil et de vérifier la dérivation éventuelle de production lors de son utilisation. Dans cette optique, deux techniques ont été employées :

- Le calibrage est réalisé au moyen d'un analyseur d'ozone à absorption UV.
- Des contrôles intermédiaires sont effectués avant chaque série d'essai par méthode iodométrique. Le flux gazeux barbotte pendant 5 minutes dans une solution d'iodure de potassium (KI). Ce dernier s'oxyde alors en I_2 donnant une coloration variant du jaune au brun en fonction de la concentration. Après avoir acidifié la solution ($pH < 2$) avec de l'acide sulfurique (H_2SO_4), le dosage de l'iode par du thiosulfate de sodium ($Na_2S_2O_3$) est effectué. La concentration d'ozone dans le flux gazeux peut alors être déterminée.

3.2.4 Etude de la mobilité

3.2.4.1 Préparation du matériel biologique

Chaque cellule d'exposition reçoit 1,5 ml de suspension cellulaire à 250 000 cellules vivantes par millilitre. Le dénombrement est réalisé sur cellule de Mallassez avec exclusion au Bleu Trypan 0,4 % (Dumont, 1989). La quantité de cellules utilisée permet d'obtenir une concentration moyenne de 4 à 6 cellules par champs optique lors de la capture d'image. Ce nombre est le minimum nécessaire à la représentativité de l'essai et le maximum qui puisse être géré avec la version du logiciel d'analyse d'image développée pour cette phase de travail.

La cellule d'exposition, avec son matériel biologique, est ensuite placée une nuit dans l'étuve de culture. Elles ne seront donc utilisées que le lendemain. Ceci permet de limiter l'influence des manipulations (centrifugation, remise en suspension, ...) sur les résultats obtenus.

3.2.4.2 Mise au point du logiciel d'analyse d'images

La première étape a consisté à produire le module d'analyse initial : la reconnaissance et l'isolement de cellules au repos. Des images de macrophages non activés sont prises en utilisant les logiciels d'acquisition fournis avec la carte d'acquisition vidéo. Elles sont ensuite traitées au moyen du programme Optilab (National Instrument™) en mettant en œuvre des procédures variées jusqu'à reconnaissance parfaite des cellules et d'elles seules. Les séquences de traitement mises au point servent à développer le premier module du logiciel d'analyse.

Le second module développé réunit l'enregistrement, le suivi et le traitement des différents paramètres pouvant être utiles à la détermination du comportement des macrophages et de ses variations.

Les différents essais réalisés par la suite ont permis de trier ces divers paramètres et d'établir une relation entre ceux-ci.

3.2.4.3 Trame du logiciel d'analyse d'images

1. Acquisition du signal vidéo

La caméra du microscope inversé envoie un signal continu au micro-ordinateur. Ces images sont alors numérisées puis transformées en niveaux de gris, soit 255 niveaux de gris ou encodage 8 bits⁴. Une image est capturée toutes les 10 secondes (Figure 7).

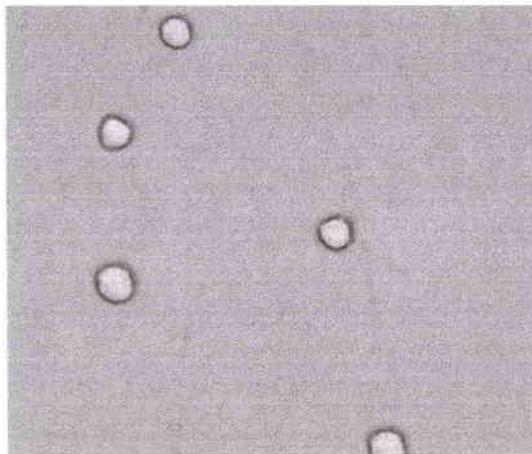


Figure 7 : Image en couleurs réelles (RVB, 24 bits) transmise par la caméra du microscope inversé présentant quelques macrophages

2. Obtention d'une image binaire

Pour chaque image, un histogramme fournit une représentation graphique de son contraste et de sa brillance. Il permet en outre d'identifier ses principales composantes comme le fond, le bruit et les objets. L'image est alors seuillée à partir du niveau de gris moyen des

⁴ Bit : 1 bit est égal à 8 octets. Un octet est une variable pouvant prendre la valeur 1 ou 0.

pixels⁵ ayant la fréquence la plus importante, ceci afin de prendre en considération les variations de l'intensité lumineuse liées à la condensation d'eau sur les parois de la cellule de mesure. A ce stade, l'image est représentée par une matrice où chaque pixel est représenté par la valeur « 0 » ou « 1 », encore appelé « éteint » ou « allumé » : les pixels ayant une valeur inférieure au seuil prennent la valeur « 0 » alors que les autres prennent la valeur « 1 ». Cette matrice peut alors subir les transformations mathématiques qui conduiront à l'identification de chaque cellule (Figure 8).

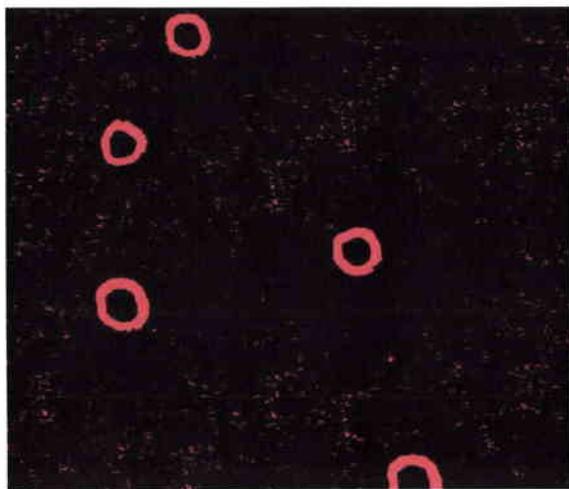


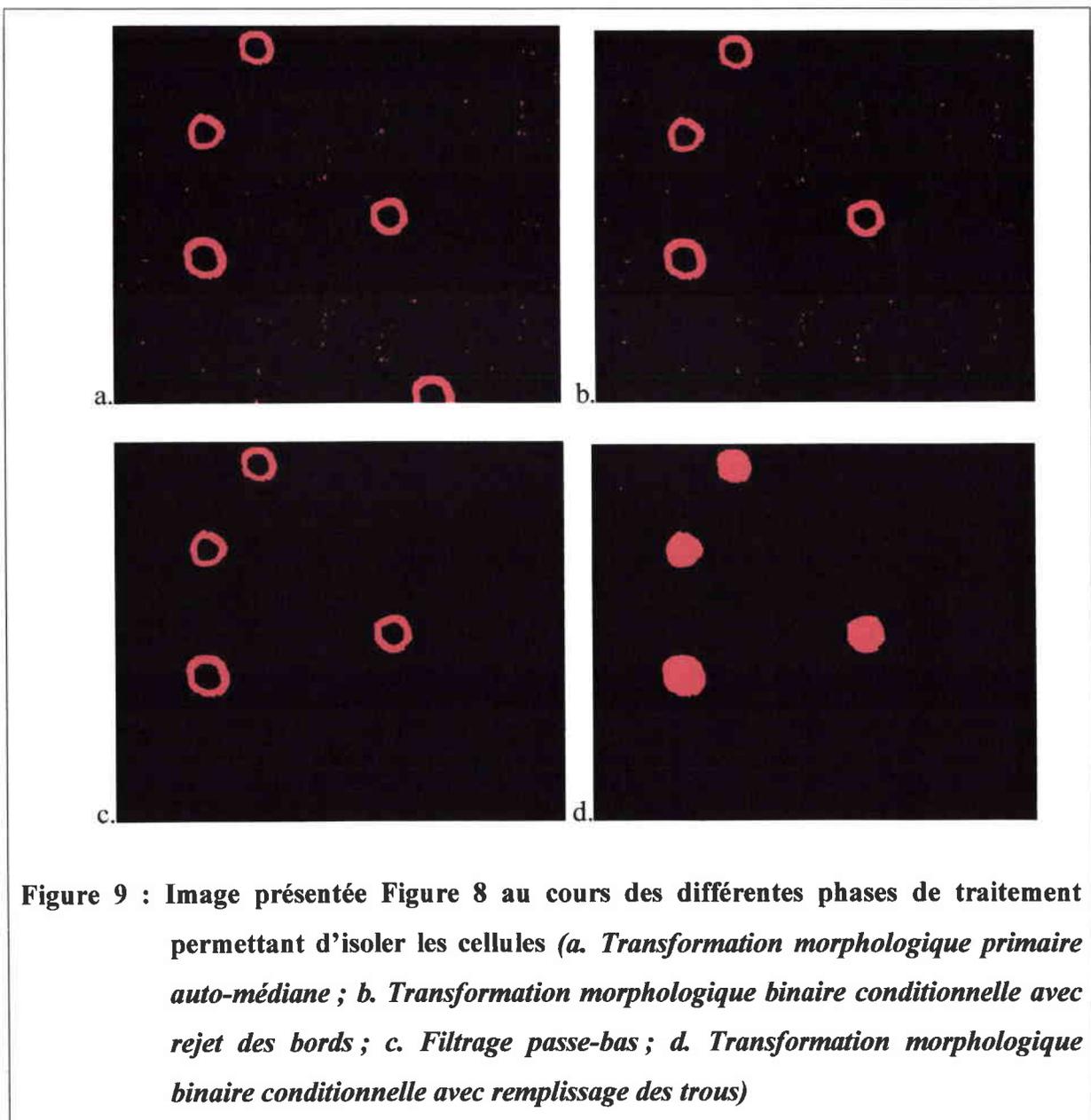
Figure 8 : Image présentée Figure 7 après seuillage. La silhouette des cellules est visible de même que de nombreux parasites.

3. Identification des cellules

La première étape est une transformation morphologique primaire dite « auto-médiane » avec pour élément structurant 3 x 3 (Voir Annexes). Cette fonction est une combinaison finie d' « ouvertures propres » et de « fermetures propres » qui isole des objets simplifiés, débarrassés des détails (Figure 9a) (Voir Annexes). La transformation morphologique binaire conditionnelle qui suit permet de rejeter les particules touchant le bord

⁵ Pixel : Plus petite unité de surface d'un écran

de l'image avec une connexité de 8 x 8 (Voir Chapitre Annexes). Les cellules partiellement « photographiées » ne sont donc pas prises en compte (Figure 9b). Ensuite, les particules ou artéfacts de l'image sont éliminés par l'application d'un filtre passe-bas : ce dernier éteint les pixels qui constituent un objet disparaissant à la suite de trois érosions successives avec un élément structurant 3 x 3 (Figure 9c). Enfin, la dernière étape d'analyse consiste à utiliser une transformation morphologique binaire conditionnelle remplissant les pixels éteints au sein des objets restants avec une connexité 8 x 8. Sur chaque cliché, les macrophages présents peuvent alors être identifiés (Figure 9d).



4. Calcul de la Vitesse d'Accroissement de Surface (V_{AS})

Les différentes images traitées sont superposées au fil du temps donnant la trace des cellules en déplacement (Figure 10).

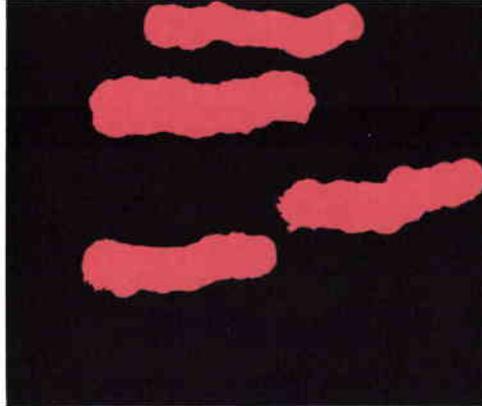


Figure 10 : Résultat de la superposition des images seuillées pendant 20 minutes à partir de l'image présentée à la Figure 8

Les variations de cette trace sont alors enregistrées durant 20 minutes. Une courbe composée de 120 points de mesure représente l'évolution de la surface balayée par les macrophages en fonction du temps (Figure 11). La réalisation d'un historique permet d'éliminer la surface représentée par les cellules immobiles. Les valeurs corrigées sont ensuite rapportées à une cellule. La pente de la courbe obtenue est représentée de la **vitesse moyenne de l'accroissement de surface (V_{AS})** qui est proportionnelle à la vitesse moyenne de déplacement des cellules au cours de l'essai.

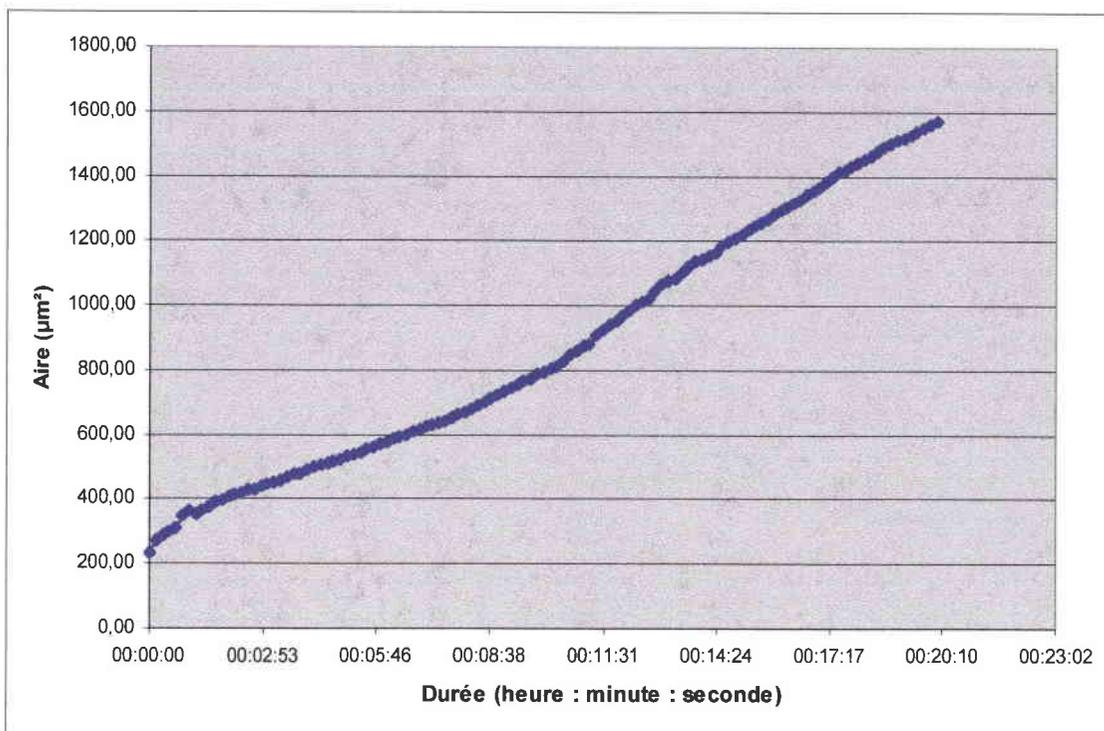


Figure 11 : Courbe représentant la variation de la surface balayée par des macrophages en déplacement durant 20 minutes avec une mesure toutes les 10 secondes, soit 120 points de mesure

3.2.4.4 Etude de la mobilité

La cellule d'exposition, préparée la veille, est déposée ouverte sur la platine chauffante du microscope inversé. Elle est alors connectée soit au générateur d'air zéro soit au Modèle 175 selon qu'il s'agisse d'un témoin ou d'une exposition aux polluants gazeux. La cellule d'exposition est ensuite laissée au repos environ 20 secondes afin de laisser les macrophages se stabiliser. Puis 100 µl de solution chimiotactique sont déposés en tête de cellule d'exposition, ce volume étant négligeable vis à vis de celui déjà présent. Une phase de repos d'environ 20 secondes est à nouveau nécessaire afin que les macrophages ne soient plus sensibles au flux de liquide engendré par le dépôt. L'analyse d'images de 20 minutes peut alors être déclenchée.

3.3 ELABORATION DU PROTOTYPE

3.3.1 Mise au point d'un procédé de culture autonome

La réalisation d'un biocapteur en continu basé sur l'utilisation de macrophages nécessite la mise en place d'un système de production de cellules réduisant au mieux le nombre d'interventions de maintenance. Dans ce but deux systèmes ont été envisagés :

- **Le premier** est basé sur la connaissance des divisions cellulaires. En effet, les THP-1 ayant un taux de multiplication d'environ 2 tous les quatre jours, nous pouvons envisager de mettre en place une série de réservoirs contenant un nombre décroissant de cellules. Les compartiments arrivant à maturité à des dates décalées dans le temps, ceux-ci seront utilisés successivement par un automate. La maintenance se réduit ici au changement de l'intégralité des cartouches épuisées.
- **Le second** consiste à réaliser un bioréacteur où les cellules seront produites en continu, la maintenance se réduisant à l'apport de flacons de milieu de culture préalablement conditionné.

3.3.1.1 Première alternative : utilisation de cartouches à concentrations

cellulaires différenciées

Afin d'étudier cette possibilité de fonctionnement, quatre flacons ont été réalisés avec des concentrations cellulaires différentes. Ils sont ensuite placés dans l'étuve de culture. La production de phagocytes ainsi que leur taux de mortalité sont suivis par comptage sur une cellule de Mallassez avec exclusion au Bleu Trypan.

3.3.1.2 Seconde alternative : culture en réacteur

Matériel

Les cellules sont cultivées dans un cytotqueur de laboratoire de 2 litres (Série DISCOVERY, Inceltech, France). Ce système se compose d'une cuve en verre à fond hémisphérique, de volume utile de 0,75 litres, surmontée par une platine servant de support aux différents capteurs et entrées / sorties de fluides.

Les capteurs retenus permettent le suivi de la température, du pH et de l'oxygène dissous. La gestion des régulations est assurée par système de contrôle analogique (MOD 7F, Inceltech, France) équipé de régulateurs correspondant aux paramètres mesurés.

La réalisation d'une culture discontinue permettra de déterminer les caractéristiques de croissance de la souche ainsi que les conditions nécessaires à la mise en œuvre d'une culture en continu.

Milieu de culture

Les cellules sont produites dans un milieu de culture identique à celui de la culture cellulaire en flacon.

Détermination des conditions de culture : culture discontinue

Le cytotoculteur estensemencé avec 2.10^5 cellules / ml dans le milieu de culture mis au point pour les THP-1, concentration retenue pour la majorité des cultures de cellules de mammifères (Pinton, 1991). Les courbes de croissance de la culture sont réalisées à partir de comptages cellulaires avec exclusion au Bleu Trypan sur cellule de Mallassez.

Les paramètres suivants sont enregistrés afin de déterminer l'efficacité et l'utilité des procédures de régulation :

- **Température** : La consigne est fixée à 37,0°C. La température est mesurée au moyen d'une sonde thermique. En cas de dépassement de la consigne, une électrovanne permettant la circulation d'eau « froide » dans une épingle étanche, est ouverte. Par contre, le réchauffement du système est réalisé par la fermeture du circuit électrique alimentant une ceinture chauffante ceignant la cuve du réacteur.
- **pH** : La consigne est fixée à 7,50 UI sachant que cette valeur correspond à un pH moyen du milieu de culture préparé et placé en étuve et que les conditions optimales de développement de cellules de mammifères varient entre 6,9 et 7,9 UI avec un pH optimum situé dans un palier de 0,4 UI (Goergen, 1992 ; Martial, 1991). La valeur de pH optimale sera recherchée lors de la mise en œuvre de la culture cellulaire en continu. La mesure est effectuée par une électrode de verre à électrolyte gélifié. La régulation est assurée, selon le cas, par l'ajout d'HCl 0,5 N ou de NaOH 0,5 N stériles au moyen de pompes péristaltiques.

- Oxygène : La consigne est fixée à 60,0 % de la valeur maximale de référence utilisée pour étalonner la sonde, à savoir la valeur indiquée pour le milieu saturé en oxygène. En premier lieu, nous avons étudié les performances de la régulation de gaz dissous par variation de la vitesse d'agitation. En effet, le régulateur permet d'asservir la vitesse d'agitation à la concentration d'oxygène dissous : en cas de défaut, une autorisation de dépassement de la consigne prédéterminée peut être accordée. En second lieu, nous avons mis en œuvre une régulation par bullage d'air comprimé dans le milieu de culture, asservie à la mesure de l'oxygène dissous par action du régulateur sur une électrovanne. L'air comprimé utilisé est à une pression de 2 bars, délivré avec un débit de 3 litre / mn et débarrassé des contaminants éventuels par passage sur un filtre 0,22 µm.
- Agitation : La consigne est fixée à 40 tours / min de façon à maintenir une suspension cellulaire homogène et éviter le cisaillement des macrophages.

3.3.2 Elaboration du prototype de laboratoire : principe

Le prototype se compose de quatre parties :

- La production de matériel biologique : elle sera assurée soit par des cartouches à concentration cellulaire différenciée, soit par un cytotuteur fonctionnant en production continue dont les paramètres régulés seront ceux précisés par la culture discontinue puis optimisés durant la phase continue.
- La cellule d'analyse : elle est constituée d'un compartiment recevant une fraction de la suspension cellulaire produite. Les macrophages y sont mis en présence des contaminants atmosphériques puis stimulés par un agent chimioattracteur.
- Le système d'acquisition : un microscope inversé équipé d'un objectif 20 X et d'une caméra CCD noir et blanc numérise l'image. Celle-ci est transmise à un micro-ordinateur afin de déterminer la mobilité des cellules stimulées.
- Le calculateur et les régulations : Cet ensemble détermine le degré de pollution atmosphérique ainsi que le bon fonctionnement du prototype. De plus, les informations qu'il est nécessaire de mesurer puis d'analyser afin d'assurer la pérennité de la culture des macrophages, sont prises en compte. L'ensemble de ces opérations est réalisé par une station de travail industrielle qui sert donc à la fois de régulateur et de calculateur.

3.4 DOSAGES BIOCHIMIQUES

3.4.1 Préparation des cellules

Un volume de 10 ml de suspension cellulaire, à une concentration de 250 000 cellules / ml, est déposé dans un flacon d'exposition de 25 cm². Celui-ci est ensuite déposé une nuit dans l'étuve de culture afin de reproduire les conditions employées pour l'étude de la mobilité cellulaire. Les flacons contiendront donc un nombre comparable de cellules. De plus, les THP-1 ayant été remises en culture dans du milieu nutritif neuf au même moment, la quantité de molécules sécrétées, ou consommées, sera elle aussi similaire dans les différents flacons.

3.4.2 Calcium intracellulaire (Ca²⁺)

Principe

Le dosage du calcium est réalisé au moyen d'un indicateur fluorescent, le Fura-2 (Grynkiewicz, *et al.*, 1985).

Mode opératoire

La préparation cellulaire reçoit 1,8 mM de Fura-2 puis est placée à l'abri de la lumière pendant 30 minutes dans un incubateur à CO₂ (37°C ; 5% de CO₂ ; saturation en humidité). Les macrophages sont ensuite lavés 3 fois avec du RPMI 1640, puis remis en suspension dans 10 ml de milieu de culture. Le réactif non internalisé est ainsi éliminé. Les cellules sont alors exposées à l'ozone de 0 à 30 minutes.

Ensuite, 150 µl de suspension cellulaire sont déposés dans les puits d'une microplaque de titration. La lecture est effectuée au moyen d'un fluorimètre avec pour longueur d'onde d'excitation 380 nm et d'émission 510 nm.

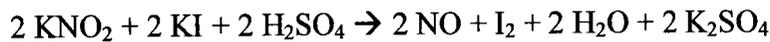
3.4.3 Monoxyde d'azote dans le surnageant de culture (NO)

Principe

Le dosage du monoxyde d'azote est réalisé au moyen d'un détecteur NO (World Precision Instrument) équipé d'une sonde ampérométrique à membrane sélective.

Mode opératoire

Une courbe de calibration est réalisée à partir d'une solution de H₂SO₄ à 0,1 M et de KI à 0,1 M dans laquelle des volumes croissants de KNO₂ sont ajoutés :



Le détecteur et la sonde calibrés, la mesure de l'oxyde d'azote (nM) produit par les macrophages est effectuée. Afin de garantir un contact suffisant entre l'électrode et le surnageant de culture, il a été nécessaire d'augmenter le volume de suspension cellulaire dans les flacons : 20 ml de milieu de culture contenant 250 000 cellules / ml sont donc déposés dans un flacon d'exposition de 80 cm². Ce dernier est pourvu d'un orifice supplémentaire afin de permettre le passage de la sonde. Les cellules sont exposées durant 30 minutes et l'évolution de la production de monoxyde d'azote suivie pendant 30 autres minutes.

3.4.4 Peroxyde d'hydrogène dans le surnageant de culture (H₂O₂)

Principe

La méthode spectrophotométrique du peroxyde d'hydrogène développée par Pick et Keisari (1980), est basée sur l'oxydation du Rouge Phénol (phénolsulfophthaleine) en un composé dont le spectre d'absorption est différent de celui du colorant natif (Pick and Keisari, 1980). Une coloration mesurable dans le spectre visible (610 nm), dont l'intensité est proportionnelle à la concentration de H₂O₂ (exprimée en nM), est obtenue. Cette réaction est

catalysée par la peroxydase de raifort (HRP). De plus, l'addition de NaOH permet à la fois de stopper la réaction et d'en augmenter l'intensité.

Mode opératoire

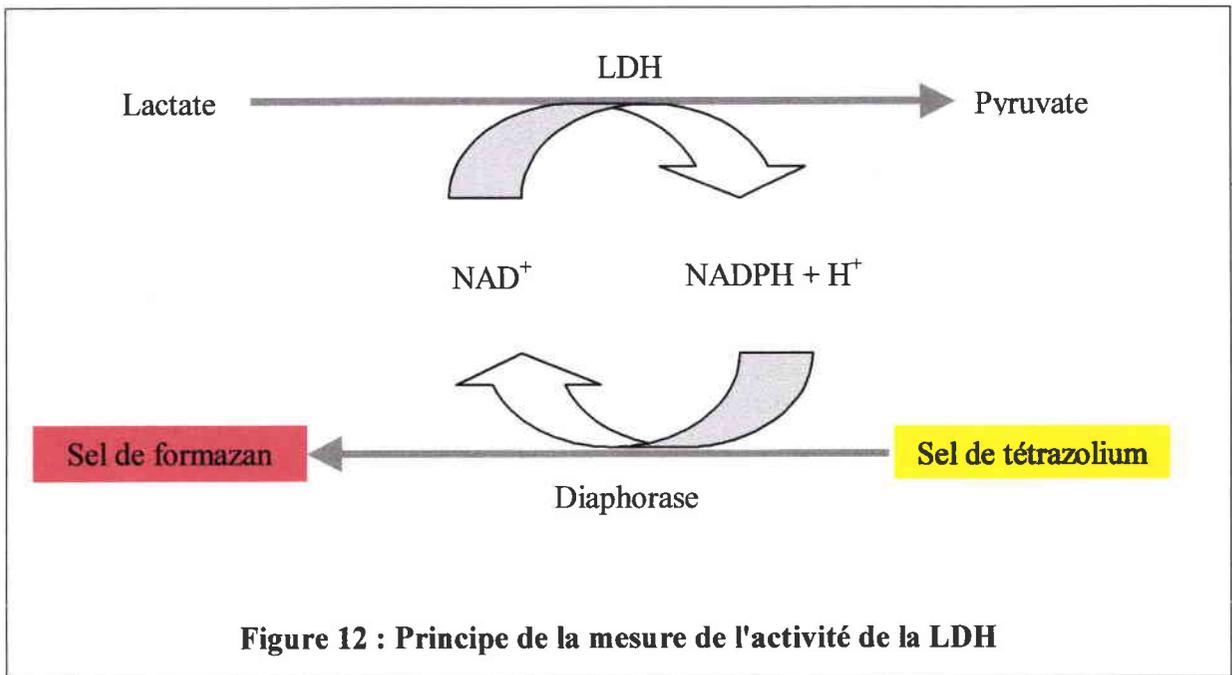
Dans un premier temps, une courbe de calibration est réalisée avec des solutions de H₂O₂ dont les concentrations varient de 80 µM à 10 mM. Les solutions sont maintenues 15 mn à 37°C puis 1 ml de solution de Rouge de Phénol à 0,2 mg / ml contenant 17,6 U / ml de HRP est ajouté. L'ensemble est alors replacé 15 mn à 37°C. La réaction est ensuite arrêtée par 50 µl de NaOH 1 N. L'intensité de la coloration est mesurée à 610 nm par un spectrophotomètre (Modèle DU 640 B, Beckman).

En ce qui concerne les mesures réalisées sur le matériel biologique, 1 ml de suspension cellulaire est mis en présence de 1 ml de solution de Rouge de Phénol à 0,2 mg / ml contenant 17,6 U / ml de HRP. L'ensemble est placé 15 mn à 37°C. Le surnageant est alors récupéré par centrifugation (5 mn ; 2500 t / mn). Celui-ci reçoit alors 50 µl de NaOH 1 N afin de bloquer la réaction de coloration.

3.4.5 Lactate déshydrogénase dans le surnageant de culture (LDH)

Principe

La lactate déshydrogénase assure la transformation du lactate en pyruvate. Lors de cette conversion, le NAD⁺ est réduit en NADH/H⁺. En présence de catalyseur (diaphorase), ce dernier est oxydé permettant la réduction des sels de tétrazolium (jaunes) en sels de formazan (rouges). Cette modification de coloration est mesurable à 490 nm (Figure 12) (Racher, *et al.*, 1990).



Mode opératoire

La LDH étant une enzyme cytosolique, sa présence dans le surnageant de culture est un indicateur de la viabilité cellulaire. Un index de cytotoxicité reflétant la nocivité d'un composé pour les cellules, peut être calculé :

$$\text{Cytotoxicité}(\%) = \frac{X - LS}{LM - LS}$$

où :

- LS : libération spontanée de LDH
- LM : libération maximale de LDH
- X : valeur mesurée

La suspension cellulaire à tester est prélevée et centrifugée (150 x g ; 10 mn) afin d'éliminer la fraction cellulaire. 100 µl de surnageant et 100 µl de mélange réactionnel sont alors déposés dans les puits de mesure.

La libération spontanée est déterminée à partir du surnageant d'une culture diluée à moitié. La libération maximale est, quant à elle, mesurée après lyse complète des cellules par du Triton X-100 à 2 % (v/v) et récupération du surnageant de culture. De même que précédemment, 100 µl de ces différents contrôles sont prélevés, ajoutés à 100 µl de mélange réactionnel et déposés dans les puits de la plaque de microtitration.

Après 30 mn de repos à l'abri de la lumière et à température ambiante, l'ensemble peut être révélé à 490 mn.

3.5 TESTS STATISTIQUES

La comparaison de deux groupes d'échantillons faibles ($N < 10$) sera effectuée au moyen du test Mann-Whitney. Ce test statistique peut aussi être mis en œuvre pour la comparaison de populations de variance inégales.

La comparaison de plusieurs groupes d'échantillons faibles ($N < 10$) sera effectuée au moyen du test d'analyse de variances de Kruskal-Wallis. Ce test statistique peut aussi être mis en œuvre pour la comparaison de populations de variance inégales.

La comparaison de deux d'échantillons ($10 < N < 50$) sera effectuée au moyen du test t de Student après vérification de la normalité des populations.

La comparaison de plusieurs échantillons ($10 < N < 50$) sera effectuée au moyen d'une analyse de variance après vérification de la normalité des populations.

Si l'hypothèse d'une différence significative apparaît à l'issue des tests précédents, le test de Tukey sera mis en œuvre pour comparer les groupes d'échantillons par paires.

Si l'hypothèse d'une différence significative apparaît à l'issue des tests précédents, le test de Dunnett sera mis en œuvre pour comparer les groupes d'échantillons à une série témoin.

ETUDES

EXPERIMENTALES

4 ETUDES EXPERIMENTALES

La première partie de ce travail consiste à développer un bioessai afin de montrer la faisabilité d'un biocapteur de pollution atmosphérique basé sur la mobilité de macrophages alvéolaires. Dans cette optique, un montage de laboratoire sera réalisé et les procédures de préparation et d'exposition des macrophages étudiées. L'ozone, gaz caractéristique des pollutions oxydantes, servira de polluant de référence.

La seconde partie concerne l'élaboration du prototype du biocapteur. Le fonctionnement automatique de ce dernier et la nécessité d'une maintenance réduite conditionneront les différentes étapes de développement abordées. Le prototype sera calibré au moyen de deux polluants « purs », l'ozone et le monoxyde d'azote puis d'un mélange composé d'ozone, de monoxyde d'azote et de dioxyde d'azote, caractéristiques des pollutions liées au transport routier.

Enfin, l'impact de l'ozone sur la physiologie cellulaire sera abordé. Dans cette optique, l'activation des macrophages et la production de métabolites de défense, après exposition à l'ozone dans les conditions du bioessai, seront mesurées pour évaluer le degré d'atteinte des mécanismes de défense de la cellule.

4.1 ETUDE DE FAISABILITE : BIOESSAI

L'étude de faisabilité du biocapteur est effectuée au moyen d'un bioessai. Ce dernier est basé sur l'exposition de THP-1 à un flux gazeux grâce à une cellule d'exposition (Figure 6), puis sur la mesure de la mobilité cellulaire après stimulation par un composé chimiotactique.

4.1.1 Mobilité naturelle des THP-1

Il est donc nécessaire de déterminer, dans un premier temps, l'influence de la préparation des cellules sur la mobilité avant l'exposition aux gaz. Dans cette optique, la mesure de la mobilité naturelle des THP-1, donc sans chimioattracteur, est réalisée cellule de mesure fermée durant l'intégralité de la procédure et cellule de mesure ouverte afin de simuler la phase de dépôt des composés chimiotactiques employés dans le bioessai (Figure 14).

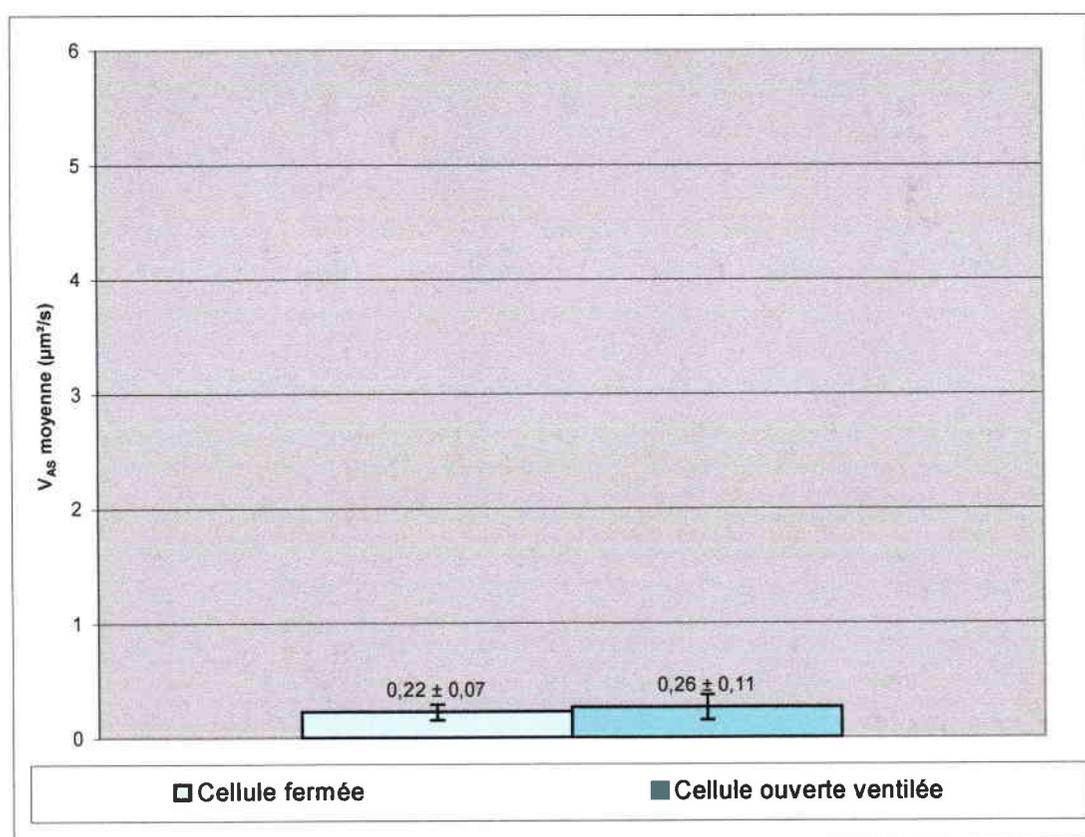


Figure 13 : V_{AS} naturelle des macrophages exprimée en $\mu\text{m}^2/\text{s}$ (Nombre d'essais par traitement : 3. Nombre moyen de cellules par essai : 6. Test de Mann-Whitney : pas de différence statistiquement significative)

La Figure 13 représente la vitesse d'accroissement de surface (V_{AS}) naturelle des macrophages, cellule de mesure fermée et ouverte. Les phagocytes ont une V_{AS} de l'ordre de $0,24 \mu\text{m}^2$ par seconde. De plus, celle-ci n'est pas statistiquement différente dans les deux conditions de test.

La V_{AS} n'est donc ni altérée par la pénétration d'air ambiant à l'intérieur de la cellule d'exposition durant la phase de simulation de dépôt de chimioattracteur ni par l'absence d'une atmosphère saturée en humidité et enrichie à 5 % de CO_2 pour une durée de test de 20 minutes.

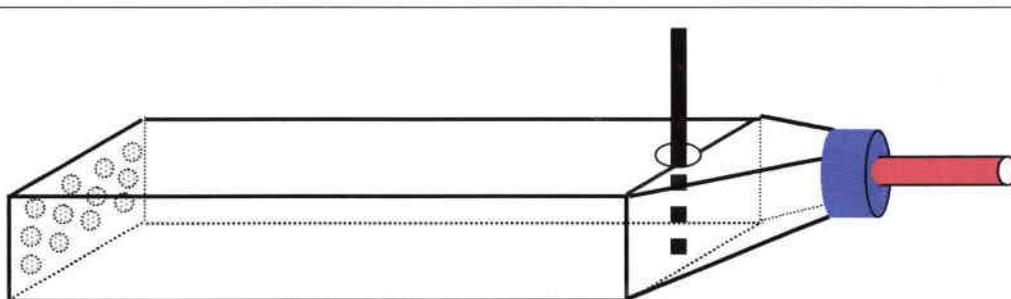
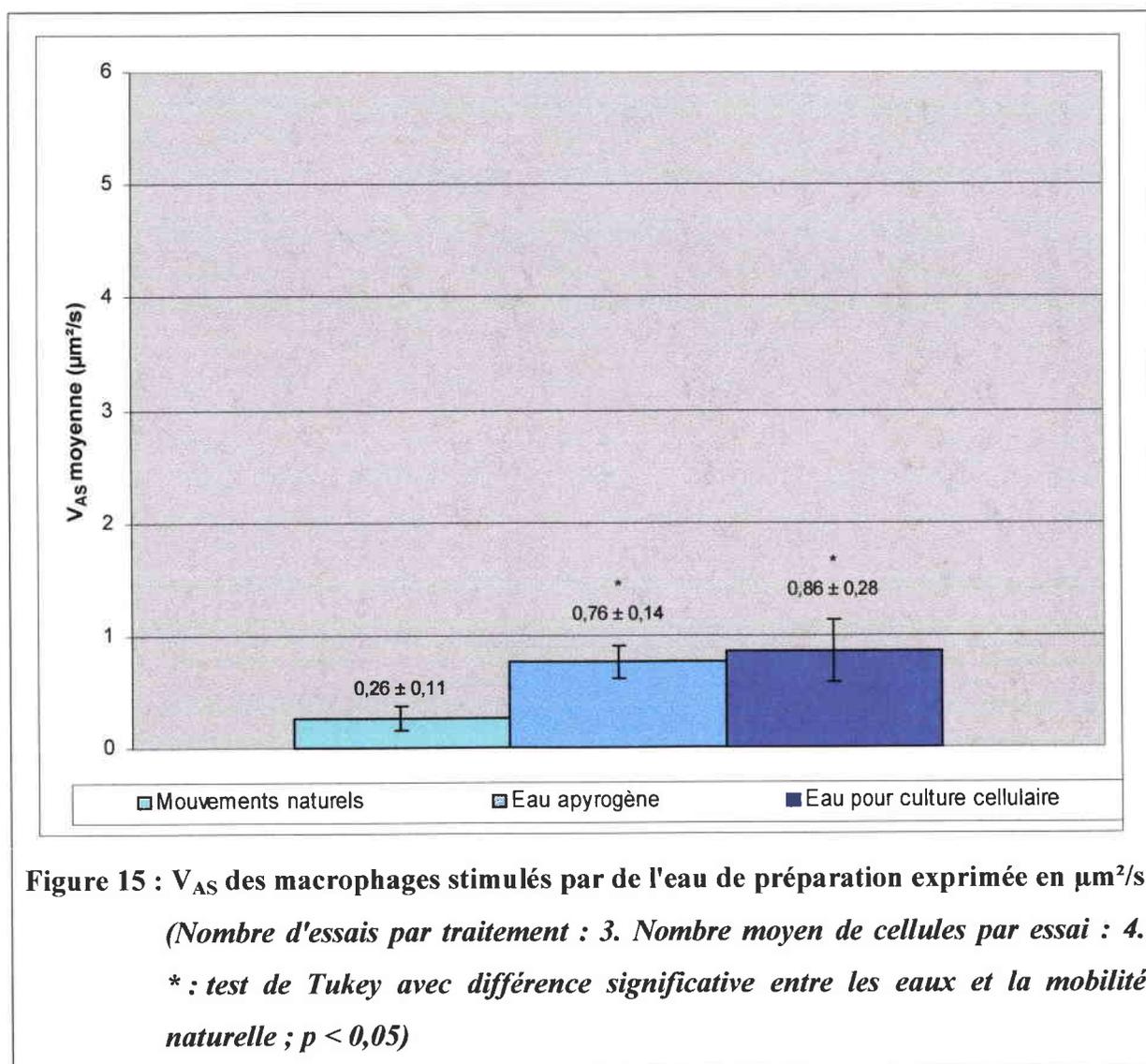


Figure 14 : Cellule d'exposition avec ouverture et canules d'injection de chimioattracteurs

Nous utiliserons donc la cellule d'exposition ouverte ce qui permettra d'effectuer les dépôts de substances activatrices du déplacement.

4.1.2 Action de l'eau de préparation des substances chimioattractrices sur la mobilité

Pour mieux comprendre l'action de solutions déposées dans la cellule de mesure, il convient de connaître l'effet de l'eau de préparation utilisée sur la mobilité cellulaire. Trois séries d'expériences ont été réalisées, la première représentant la mobilité naturelle des cellules sans ajout de substances, la seconde des cellules mises en présence d'eau apyrogène et la dernière avec de l'eau pour culture cellulaire (Figure 15).



L'eau a une action activatrice sur la mobilité des macrophages multipliant la V_{AS} d'un facteur environ égal à 3 par rapport au témoin. Cette activation n'est pas statistiquement différente dans les deux cas. La mobilité induite n'est donc pas liée à la présence de molécules

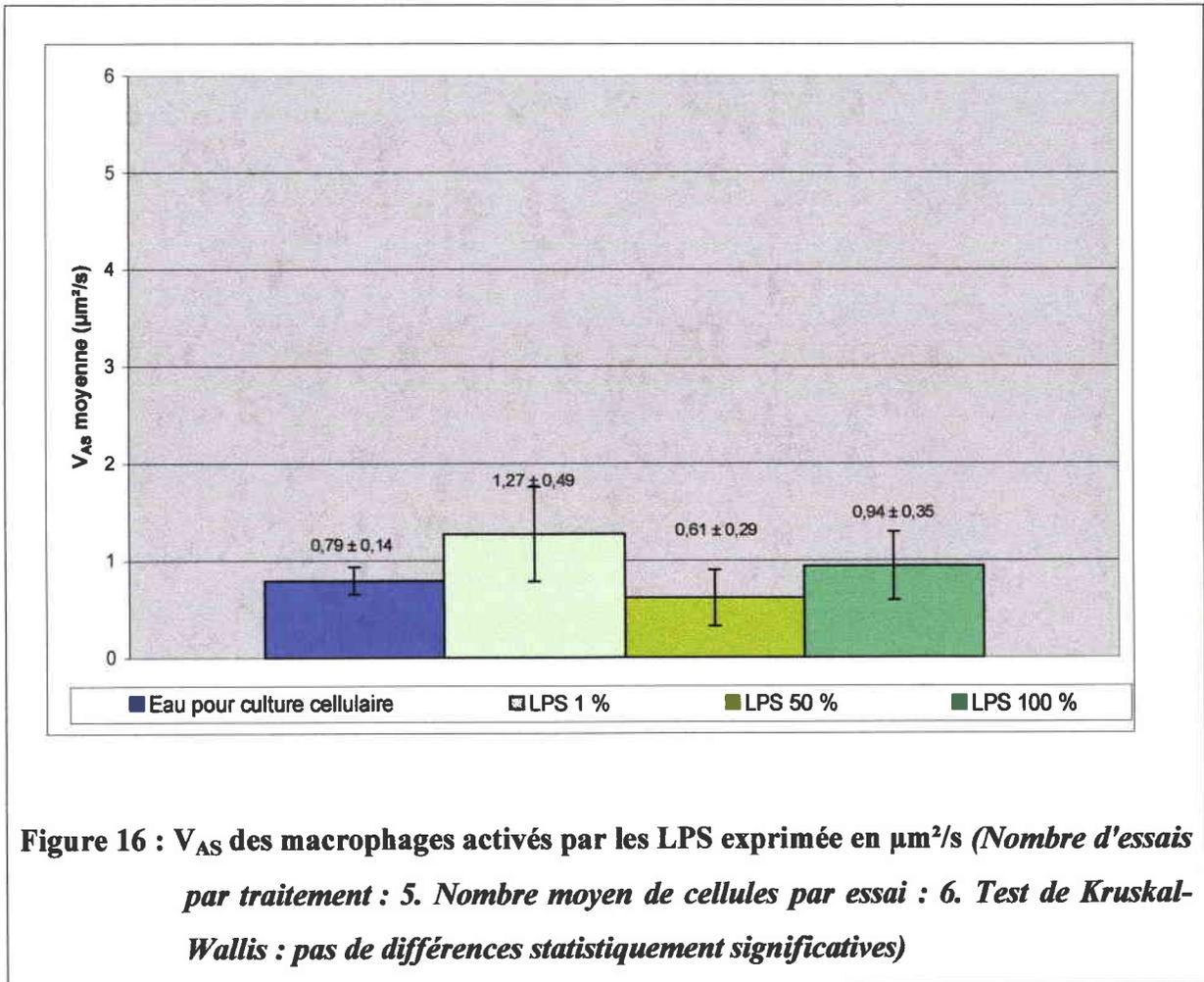
résiduelles ayant une action chimiocinétique directe. Cependant, l'ajout local d'eau dans le milieu de culture provoque la dilution de ce dernier et crée un gradient de concentration qui provoque le déplacement des phagocytes.

L'eau peut donc être employée comme activateur indirect de la mobilité cellulaire. Toutefois, le déplacement est ici lié à une modification physique du milieu. Or nous cherchons à induire une réponse immunitaire macrophagique, celle-ci étant mesurée par le déplacement de la cellule qui précède la phagocytose. Il est donc nécessaire d'utiliser une molécule chimiotactique.

Nous emploierons l'eau pour culture cellulaire afin de préparer les solutions chimioattractrices.

4.1.3 Action des LPS sur la mobilité

Nous avons vu précédemment (Voir 2.4.1.2) que le chimiotactisme des macrophages pouvait être induit par la présence d'un gradient de lipopolysaccharides (LPS) ou de fMLP, ces deux composés étant émis soit par des bactéries potentiellement pathogènes soit par des cellules lésées. Le premier type de molécule activatrice utilisée est représenté par les LPS (Sigma, France).



La Figure 16 présente la V_{AS} des macrophages activés par des concentrations croissantes de LPS. Lorsque les macrophages sont stimulés par différentes dilutions de LPS, la V_{AS} n'est statistiquement pas différente de celle des cellules stimulées par de l'eau pour culture cellulaire. De plus, la variabilité de la réponse est très importante (jusqu'à 39 % de la valeur moyenne).

En effet, il est difficile de mettre des LPS en solution dans l'eau, ceux-ci ayant tendance à former des vésicules, ou micelles, de taille très variable. Il n'est donc pas possible

d'obtenir une solution activatrice de concentration homogène et reproductible. La qualité du gradient de concentration produit n'est donc pas suffisamment constante pour induire un déplacement significatif et contrôlé des phagocytes, donc un bioessai fiable.

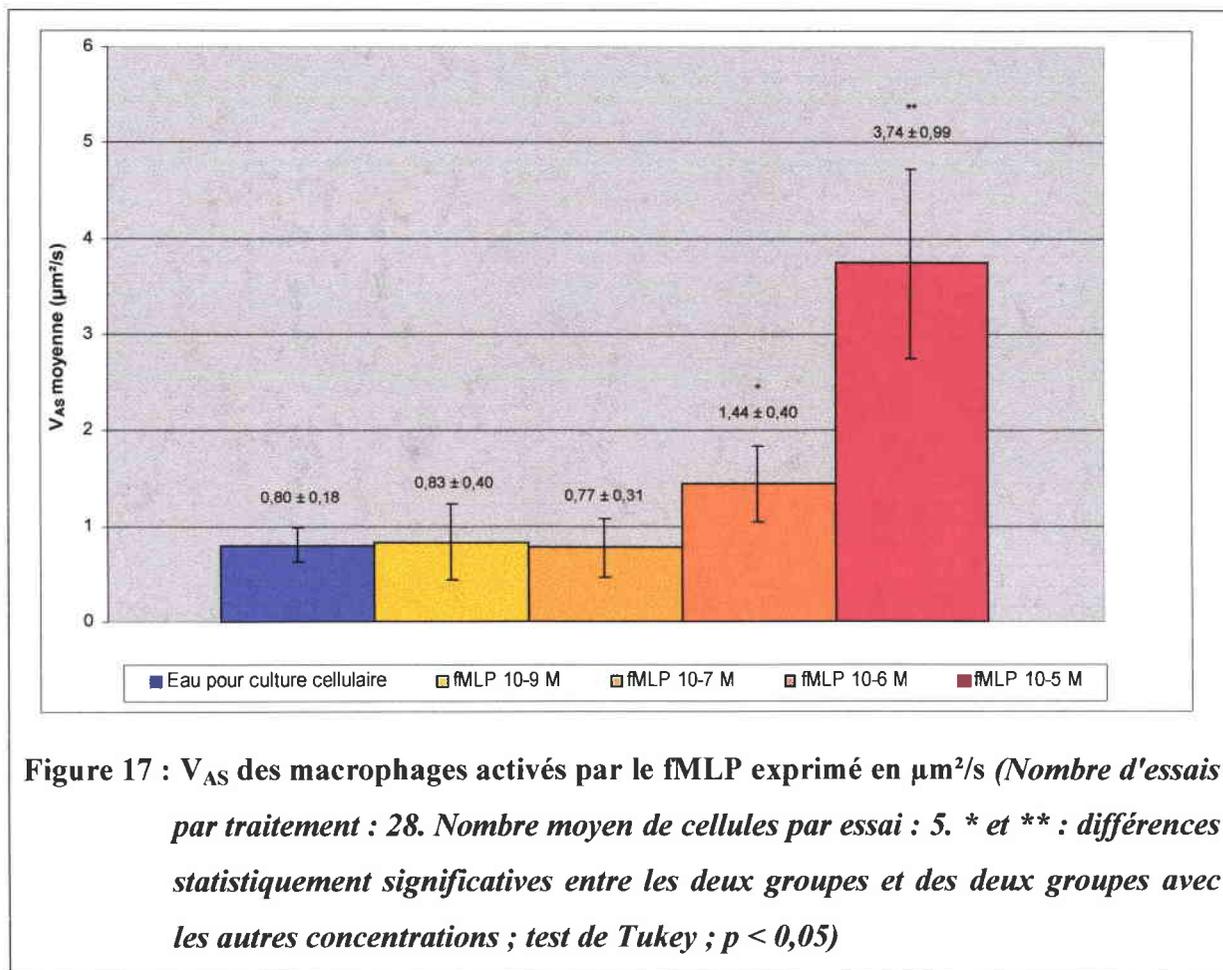
Les LPS ne peuvent donc pas être employés comme chimioattracteur dans les conditions expérimentales développées pour cette étude.

4.1.4 Action du fMLP

4.1.4.1 V_{AS} en fonction de la concentration

La seconde molécule activatrice que nous avons testée est le fMLP qui est une autre molécule de référence de l'activation du chimiotactisme des macrophages (Mege, *et al.*, 1990).

La Figure 17 montre les V_{AS} de macrophages observées pour des solutions de fMLP de concentrations 10^{-9} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M et 10^{-5} M.



Lorsque les cellules sont stimulées par une solution de fMLP à 10^{-9} M ou 10^{-7} M, la V_{AS} n'est pas statistiquement différente de celle des macrophages activés par de l'eau pour culture cellulaire. Par contre, les concentrations 10^{-6} M et 10^{-5} M ont une action chimiocinétique importante, la multipliant respectivement d'un facteur environ égal à 1,7 et 4.

Le fMLP a donc bien une action chimiotactique sur les macrophages lorsqu'il est utilisé à une concentration supérieure à 10^{-7} M. Cette concentration peut donc être considérée comme la limite physiologique de réaction des cellules pour le mode opératoire retenu. De

plus cette limite, indiquant la haute sensibilité du matériel biologique, est comparable à celles présentées dans la littérature (Mege, *et al.*, 1990) avec des techniques beaucoup plus longues : migration sous agarose (Schwartz and Christman, 1979 ; Creutzenberg, *et al.*, 1995) ou mesures de la phagocytose en utilisant des particules marquées (Allan and Wilkinson, 1978 ; Canning, *et al.*, 1991 ; Lombard, *et al.*, 1994).

Toutefois, le fMLP peut avoir une action cytotoxique sur les cellules. La cytotoxicité du fMLP, pour des concentrations variant de 10^{-9} M à 10^{-3} M, sur les macrophages est donc déterminée par mesure de la concentration en LDH dans le surnageant d'une culture à 10^5 cellules / ml (Tableau 3).

Tableau 3 : Cytotoxicité (%) du fMLP à des concentrations variant de 10^{-9} M à 10^{-3} M pour des durées d'exposition variables sur les THP-1

		Temps d'exposition					
		5	10	15	20	25	30
[fMLP]	10^{-3} M	1,8 ± 1,2	3,4 ± 2,9	9,9 ± 3,9	19,2 ± 7,9	23,5 ± 10,9	41,9 ± 6,2
	10^{-4} M	0	0	0	3,1 ± 0,3	3,6 ± 1,1	4,1 ± 0,7
	10^{-5} M	0	0	0	3,8 ± 0,7	3,8 ± 0,3	3,9 ± 0,3
	10^{-6} M	0	0	0	1,1 ± 0,3	1,9 ± 0,5	2,5 ± 1,3
	10^{-7} M	0	0	0	0,7 ± 0,1	1,0 ± 0,2	1,8 ± 0,5
	10^{-8} M	0	0	0	0	0	0
	10^{-9} M	0	0	0	0	0	0

La concentration 10^{-3} M présente un effet cytotoxique qui apparaît dès la 5^{ème} minute d'exposition. Pour les concentrations variant de 10^{-4} M à 10^{-7} M, cet effet ne peut être observé qu'à partir de la 20^{ème} minute. Il reste cependant relativement faible avec des valeurs comprises entre 0,7 et 4,1 %. Une relation dose – effet, est aussi mise en évidence au-delà de 15 minutes. Toutefois, les concentrations de fMLP de 10^{-8} M et 10^{-9} M semblent sans effet toxique sur une durée d'exposition de 30 minutes. Ceci permet d'expliquer « l'effet inhibiteur » du fMLP sur la mobilité cellulaire des concentrations supérieures à 10^{-8} M lors des essais à longue durée d'incubation (supérieure à 24 heures) (Spilberg, *et al.*, 1981 ; Rossi, *et al.*, 1985).

Les concentrations de 10^{-6} M et 10^{-5} M semblent donc être le meilleur compromis entre la toxicité du fMLP (respectivement 1,1 % et 3,8 % après 20 minutes d'exposition), et de son action chimiotactique (respectivement $1,44 \mu\text{m}^2/\text{s}$ et $3,74 \mu\text{m}^2/\text{s}$ pour 20 minutes d'essai). La concentration 10^{-4} M pourrait aussi être mise en œuvre. Elle n'est cependant pas retenue car, du fait de l'accroissement de mobilité, le séquençage du signal vidéo devrait être plus important réduisant les temps de traitement de l'image.

Nous avons choisi d'utiliser le fMLP à une concentration de 10^{-5} M car la mobilité cellulaire est plus importante.

4.1.4.2 V_{AS} en fonction de l'âge des cellules

La Figure 17 nous a permis de constater qu'il était possible de mettre en évidence des différences statistiquement significatives entre diverses concentrations de fMLP, soit 10^{-5} M, 10^{-6} M et 10^{-7} M qui représente la limite physiologique d'action de ce composé dans les conditions expérimentales retenues pour le bioessai. Cependant la variabilité attachée à chaque mesure est relativement importante. Cette phase de l'étude a donc été réalisée afin de tenter de réduire la variabilité relative aux essais et plus particulièrement celle qui se rattache à l'utilisation du matériel biologique. Les macrophages que nous utilisons, sont issus de la lignée cellulaire THP-1 et leurs caractéristiques biochimiques et physiologiques peuvent s'altérer à compter du 14^{ème} mois de culture (Tsuchiya, *et al.*, 1980). Celles-ci sont, par contre, toujours intactes pour les cellules remises en culture après conservation cryogénique.

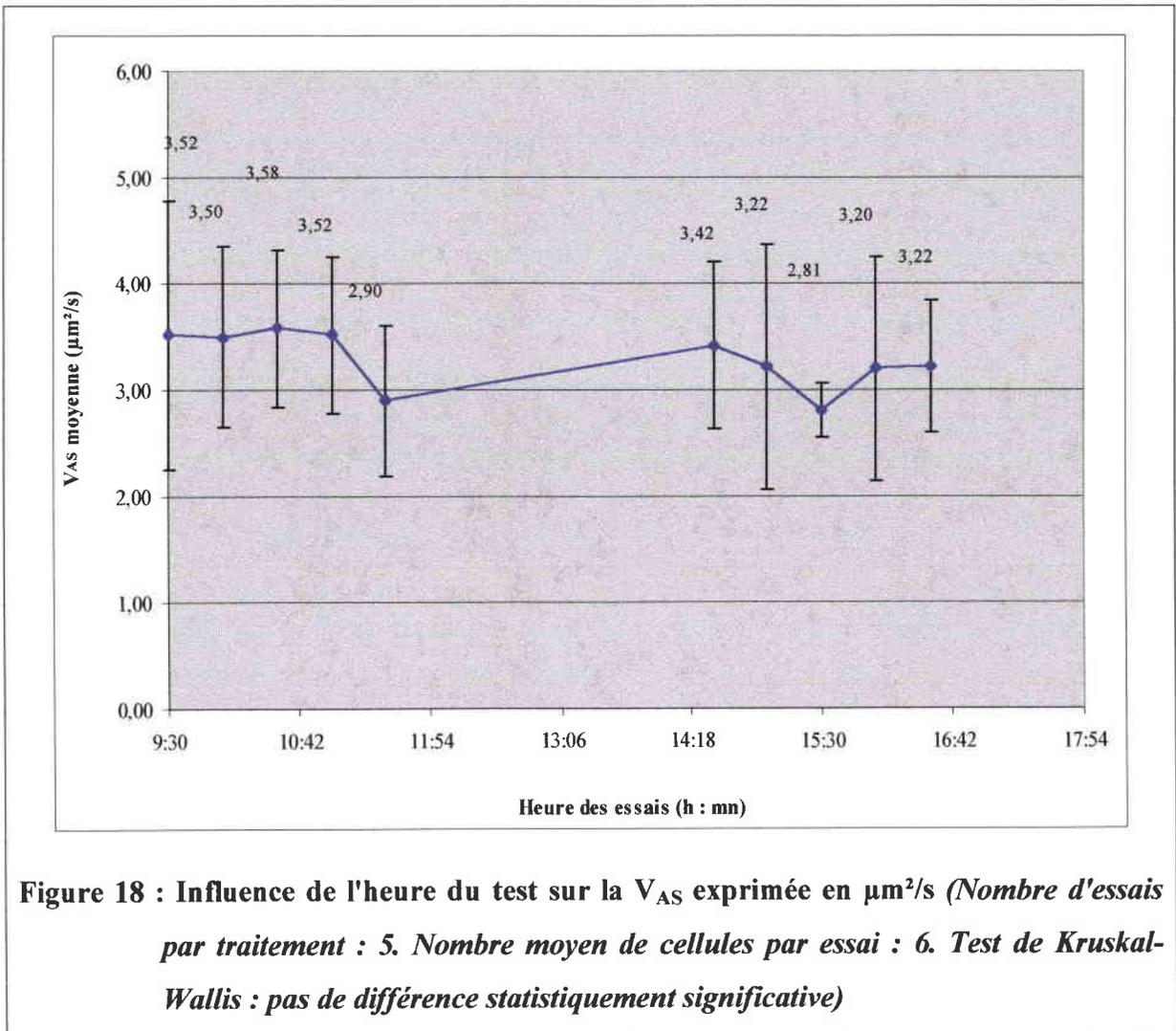
Cependant aucune étude montrant les variations des caractéristiques morphologiques, biochimiques ou physiologiques des cellules de la lignée THP-1, n'a été réalisée pour des périodes plus courtes concernées par cette étude (1 à 4 jours). Une cause de la variabilité de la mobilité des macrophages pourrait donc être liée à une évolution de la cellule à court ou moyen terme.

Les macrophages utilisés sont préparés la veille de leur utilisation puis maintenus une nuit dans l'étuve de culture. Nous nous sommes donc intéressés, dans un premier temps, aux variations de mobilité qui pourraient exister entre les macrophages utilisés le matin même et ceux utilisés en fin de journée (Figure 18).

De plus, tous les quatre jours, la culture mère, d'où sont issues les cellules testées, est centrifugée, scindée en deux populations et remise en milieu de culture neuf. L'étude des

variations qui pourraient exister entre les macrophages provenant d'une culture mère à des âges différents, a donc constitué la deuxième phase de cette approche (Figure 19).

1. Influence de l'heure



Les cellules sont préparées selon les conditions présentées dans le chapitre « Matériel et méthodes » (1,5 ml de suspension cellulaire à 250 000 cellules / ml préparées la veille de l'essai) et testées à heures régulières avec une stimulation par le fMLP à 10^{-5} M.

La Figure 18 montre que les cellules ont une V_{AS} moyenne d'environ $3,30 \pm 0,80 \mu\text{m}^2$ par seconde, ce qui est en accord avec les résultats précédents. En outre, aucune différence statistiquement significative ne peut être mise en évidence entre les vitesses moyennes

relevées aux différentes heures de test. La qualité des résultats obtenus ne subit, elle non plus, aucune influence en fonction de l'heure, la variabilité des écarts types étant aléatoire.

L'heure de réalisation des essais n'influe donc en rien sur le niveau et la qualité des résultats obtenus.

2. Influence de l'âge de la culture mère

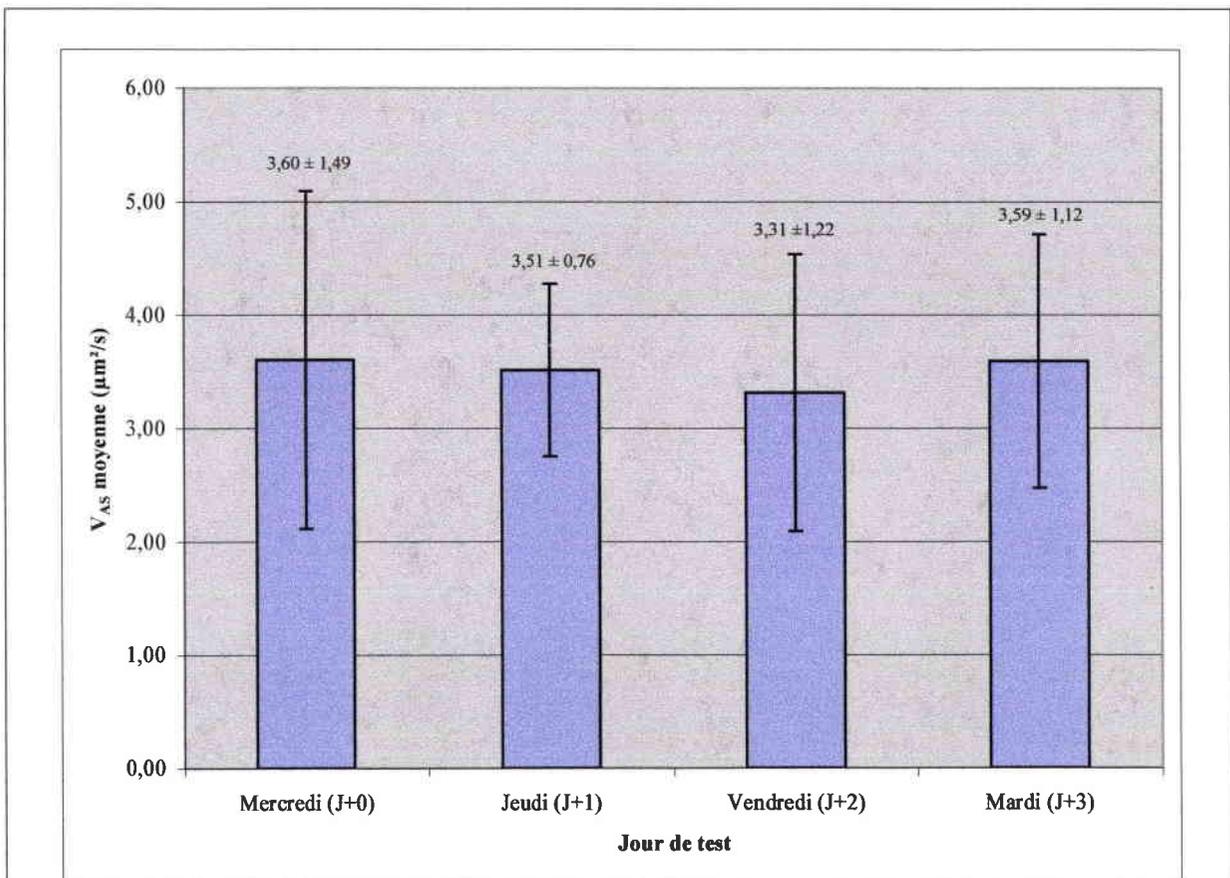


Figure 19 : Influence de l'âge de la culture mère sur V_{AS} exprimée en µm²/s (Nombre d'essais par traitement : 5. Nombre moyen de cellules par essai : 6. Test de Kruskal-Wallis : pas de différence statistiquement significative)

La Figure 19 représente la V_{AS} moyenne des macrophages dans les conditions d'étude de la mobilité que nous avons définies au préalable. Les cellules de la culture mère sont

remises dans du milieu neuf au jour J. Elles sont placées dans les mêmes conditions que précédemment, aux jours J, J+1, J+2 et J+3.

Les cellules ont une V_{AS} moyenne d'environ $3,50 \pm 1,10 \mu\text{m}^2$ par seconde, ce qui est comparable aux résultats précédents. De plus, aucune variation de mobilité statistiquement significative ne peut être observée entre les différents jours de test.

Les variations existant entre les différents jours d'essai n'entraînent donc pas d'augmentation anormale de variabilité de V_{AS} . La variabilité de la réponse est donc interne à la mesure et au mode opératoire. Elle peut par ailleurs s'expliquer par le faible nombre de cellules utilisé au cours de chaque essai.

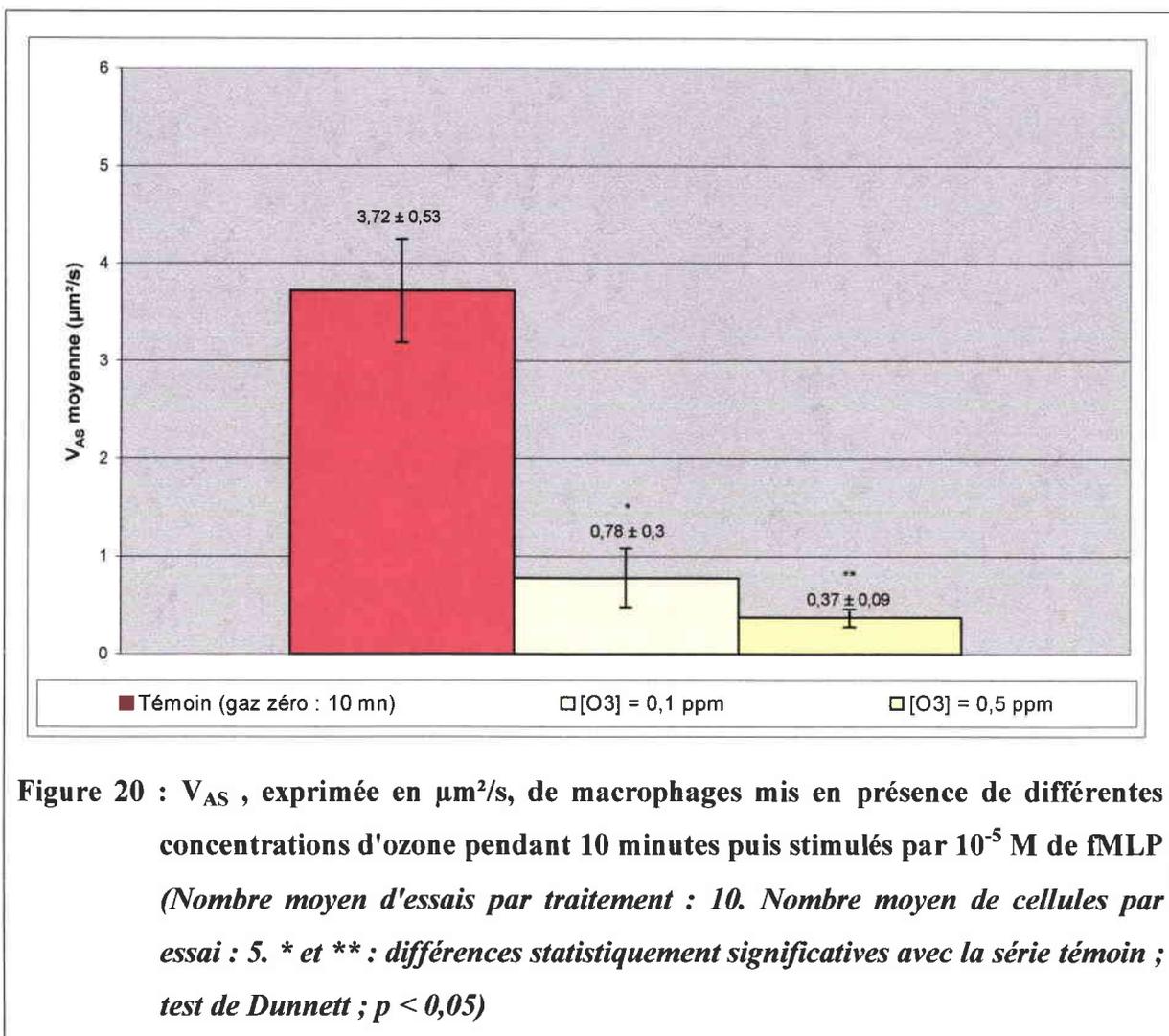
Les macrophages peuvent donc être utilisés indifféremment quel que soit le nombre de jours (+0, +1, +2 ou +3) séparant leur utilisation de la remise en culture de la suspension cellulaire mère (jour J).

4.1.5 Exposition à l'ozone

Après avoir défini les conditions de préparation des THP-1 et d'activation du chimiotactisme cellulaire, les phagocytes sont exposés à de l'ozone, gaz caractéristique des pollutions photochimiques. Afin de montrer la faisabilité du prototype, il a donc été nécessaire d'étudier les différents paramètres de l'exposition au flux polluant, à savoir, la concentration et la durée d'exposition permettant la mise en évidence d'une différence de mobilité suffisante.

4.1.5.1 En fonction de la concentration

La concentration en polluant est le premier paramètre susceptible d'affecter les cellules mises à son contact. Les macrophages sont exposés à un flux d'air contenant des concentrations d'ozone différentes durant 10 mn puis stimulés pendant 20 minutes par $100 \mu\text{l}$ de fMLP à 10^{-5} M. Le lot témoin, quant à lui, subit le même traitement excepté pour le gaz d'exposition qui est remplacé par du gaz zéro (Voir 3.2.3) (Figure 20).



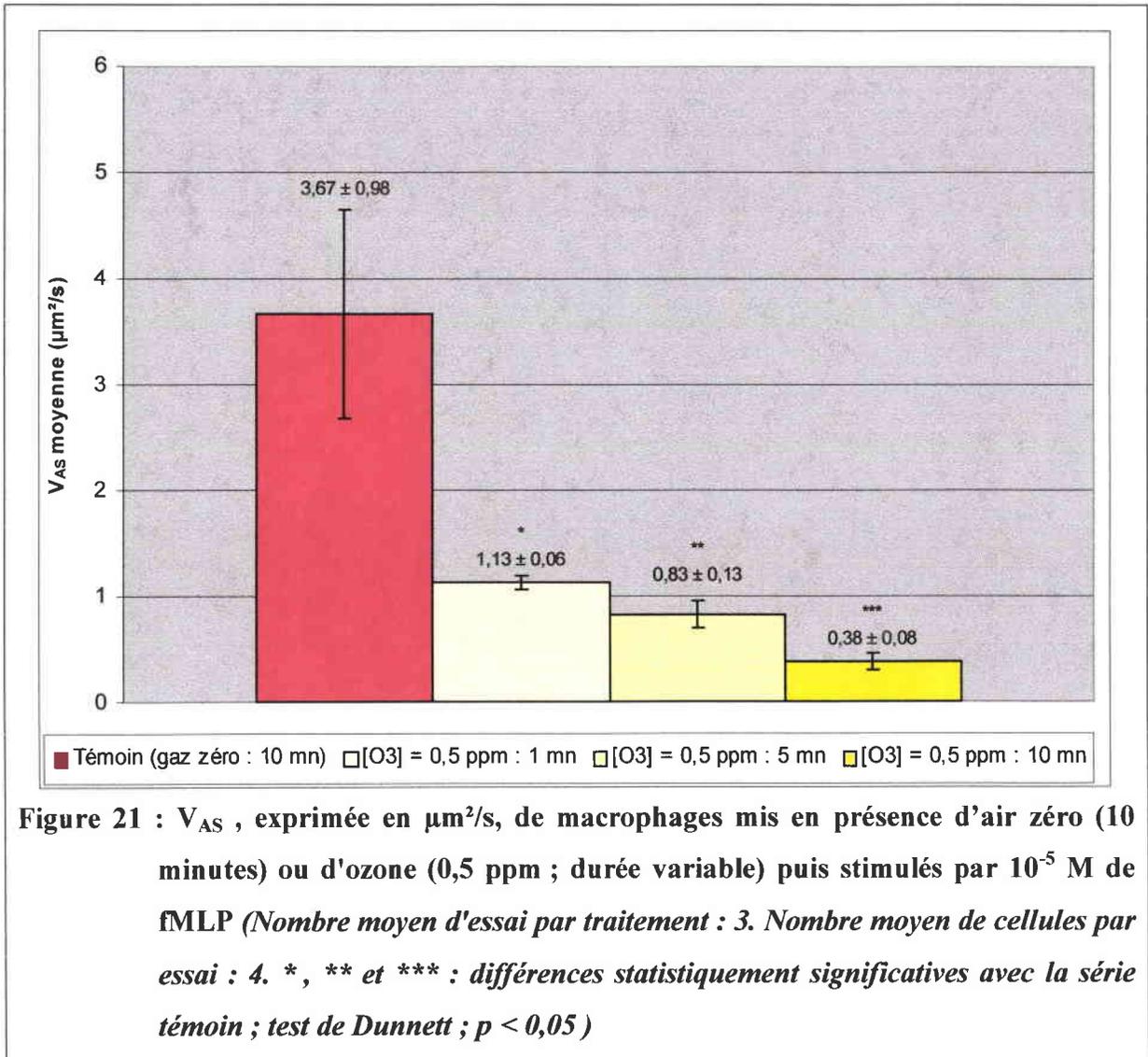
Les cellules exposées à 0,1 ppm ont une V_{AS} diminuée d'environ 79 % par rapport à la série témoin. De plus, elle diminue avec l'augmentation de la concentration ($[\text{O}_3] = 0,5$ ppm ; diminution de 90 % par rapport à la série témoin).

L'ozone a donc bien une action dépressive sur la V_{AS} et donc sur la mobilité des macrophages. D'autre part, la perte de mobilité cellulaire est d'autant plus importante que la concentration de polluant est forte.

Nous retiendrons la concentration de 0,5 ppm au cours de la phase de validation de la méthode de mesure, la différence de V_{AS} y étant plus importante.

4.1.5.2 En fonction du temps

Outre la concentration, le temps de diffusion des gaz dans le milieu est un paramètre qui influe sur la quantité de polluant mis au contact des cellules.



Nous pouvons constater que les effets de l'ozone se font ressentir dès la première minute d'exposition (Figure 21). De plus, la perte de V_{AS} augmente régulièrement avec le temps de contact (de 70 % pour 1 minute à 90 % pour 10 minutes d'exposition).

Le temps d'exposition est donc bien un paramètre à prendre en compte pour la détermination de l'effet d'un polluant atmosphérique sur la V_{AS}, et donc la mobilité des macrophages.

Nous retiendrons un temps de contact de 10 minutes pour la phase de validation car la différence de vitesse y est plus marquée.

4.1.6 Validation expérimentale

Pour valider la technique expérimentale et montrer la faisabilité d'un biocapteur, nous avons réalisé une série d'essais avec des macrophages mis en présence d'un air contenant 0,5 ppm d'ozone durant 10 minutes puis stimulées par 100 μ l de fMLP à 10^{-5} M, et une série témoin.

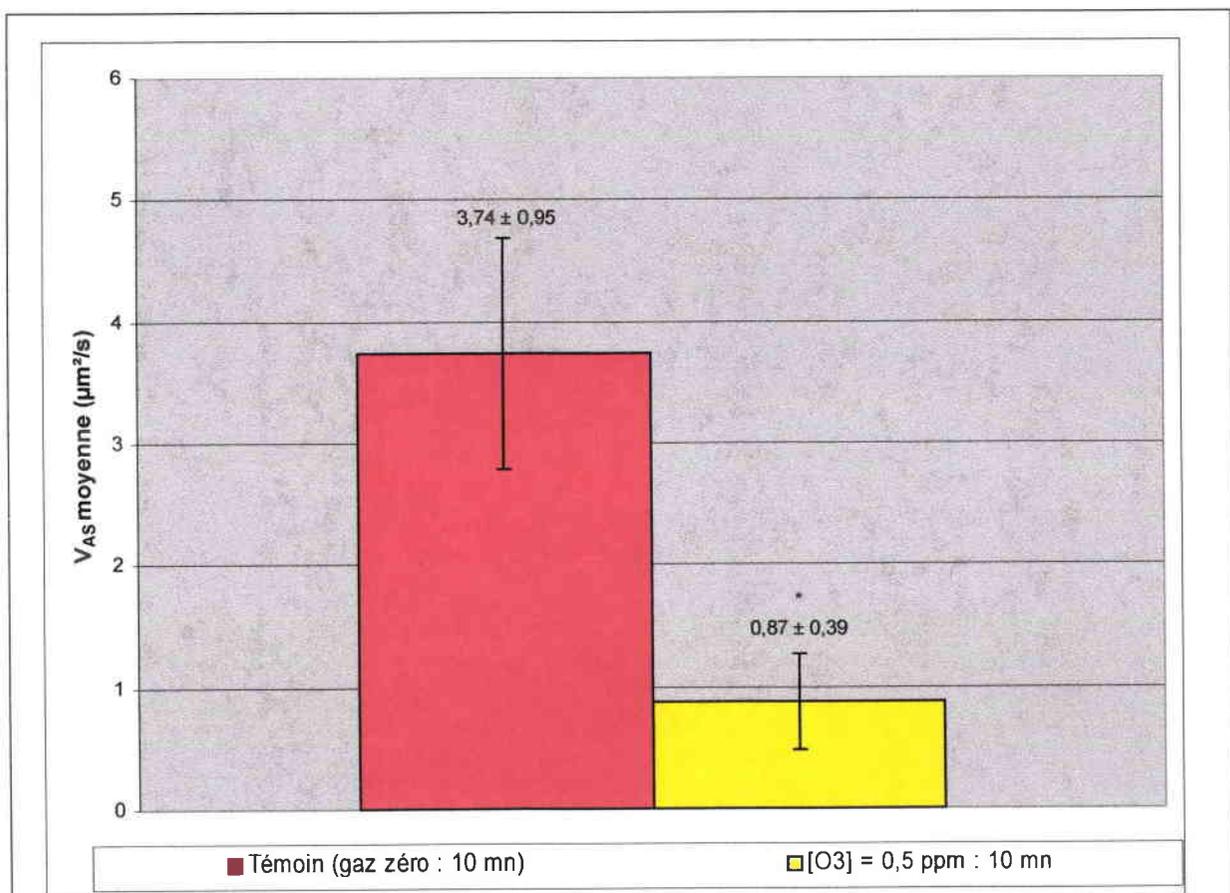


Figure 22 : Comparaison des V_{AS} (exprimée en μm²/s) de macrophages mis en présence d'air pollué par de l'ozone ou d'air zéro (Témoin) puis stimulés par 10^{-5} M de fMLP (Nombre moyen d'essais par traitement : 28. Nombre moyen de cellules par essai : 5. * : différence statistiquement significative avec la série témoin ; test de Dunnett ; $p < 0,05$)

La Figure 22 montre clairement que l'ozone diminue la V_{AS} des macrophages et donc leur mobilité. La V_{AS} est divisée d'un facteur environ égal à 4 passant de $3,74 \mu\text{m}^2/\text{s} \pm 0,95 \mu\text{m}^2/\text{s}$ à $0,87 \mu\text{m}^2/\text{s} \pm 0,39 \mu\text{m}^2/\text{s}$. La validité de ce résultat a été vérifiée au moyen du test t de Student ($p < 0,01$) et du test de Dunnett ($p < 0,05$) après vérification de la normalité de la distribution des résultats pour chaque population (test de Shapiro et Wilk ; $p < 0,05$) (Maurice, 1993). La littérature présente des concentrations d'ozone et des effets similaires (diminution de la phagocytose et de la capacité migratoire) lors d'expositions chroniques de durées allant de 2 heures à 2 jours (Coffin, *et al.*, 1968 ; Coffin and Gardner, 1972 ; Schwartz and Christman, 1979 ; McAllen, *et al.*, 1981 ; Valentine, 1985 ; Becker, *et al.*, 1991 ; Canning, *et al.*, 1991 ; Gilmour, *et al.*, 1991 ; Gilmour and Selgrade, 1993 ; Gilmour, *et al.*, 1993 ; Gilmour, *et al.*, 1993 ; Jakab, *et al.*, 1995 ; Polzer, *et al.*, 1994).

La mesure de la V_{AS} des macrophages activés par du fMLP ($100 \mu\text{l}$; 10^{-5}M) peut donc être réalisée au moyen du montage de laboratoire. De plus, la méthode que nous avons développée permet de mettre en évidence l'influence de l'ozone sur la V_{AS} et donc sur la vitesse de déplacement des phagocytes. Dans le cas d'une exposition à 0,5 ppm durant 10 minutes, la V_{AS} est alors diminuée d'un facteur égal à 4.

4.1.7 Impact de l'ozone sur la physiologie cellulaire

Les résultats obtenus lors de la réalisation des bioessais (Voir Chapitre III.A.) ont permis de conclure que l'ozone diminue la mobilité des phagocytes et, donc, l'efficacité de la phagocytose. Or la perte de mobilité n'est que la traduction « macroscopique » de lésions sub-cellulaires. Ces altérations, causées par un agent extérieur, sont susceptibles d'engendrer une réaction physiologique permettant à la cellule de résister à l'agression.

Afin de caractériser la réponse physiologique des macrophages à l'ozone, nous avons en premier lieu cherché à déterminer la cytotoxicité de ce gaz, dans les conditions expérimentales du bioessai, par mesure de la concentration en LDH dans le surnageant de culture. Les cellules ayant été plus ou moins lésées par la présence de polluant, nous nous sommes intéressés aux taux de calcium intracellulaire, sa variation étant le signe d'une activation métabolique, puis aux quantités de peroxyde d'hydrogène et de monoxyde d'azote libérées dans le milieu de culture en tant que molécules de défense. L'ensemble des résultats obtenus est présenté par le Tableau 4.

Tableau 4 : Cytotoxicité de 0,5 ppm d’ozone sur les THP-1 et détermination de la réponse cellulaire par mesure du calcium intracellulaire, du peroxyde d’hydrogène et du monoxyde d’azote libérés dans le milieu de culture (Concentration moyenne : 10^5 cellules / ml ; Nombre d’essais : 4 ; Nombre de réplicats : 3. * : différence statistiquement significative ; test de Dunnett ; $p < 0,05$)

Durée d’exposition (minutes)	0	5	10	15	20	25	30
Indice de cytotoxicité ⁶ (%)	0	0,82 ± 0,51	4,43 ± 2,20*	9,18 ± 1,03*	21,00 ± 2,99*	32,21 ± 3,52*	64,05 ± 4,67*
Ca ²⁺ intracellulaire (Intensité de fluorescence)	5728 ± 166	6013 ± 103*	5680 ± 113	5743 ± 188	5790 ± 158	5905 ± 122*	6019 ± 119*
H ₂ O ₂ (nM)	0,71 ± 0,10	28,44 ± 0,14*	35,44 ± 0,25*	88,25 ± 0,36*	14,25 ± 0,13*	7,36 ± 0,37	2,65 ± 0,41
NO (nM)	940,5 ± 29,5	944,0 ± 58,9	866,0 ± 36,5	840,0 ± 39,6	973,0 ± 24,5	1222,0 ± 55,3*	1460,0 ± 19,5*

L’ozone a donc bien une *action cytotoxique* sur les cellules. De plus, la cytotoxicité croît avec la durée d’exposition entre 5 et 30 minutes traduisant un effet dose / réponse. D’autre part, la toxicité de la molécule à 0,5 ppm se fait ressentir dès les 5 premières minutes d’exposition avec une TL50, déduite par interpolation entre 25 et 30 minutes, voisine de 28 minutes (Tableau 4). Outre l’action cytotoxique de l’ozone pour des concentrations de 0,1 à 0,4 ppm lors d’études à long terme (Mochitate, *et al.*, 1992) ; Arsalane, *et al.*, 1995), les résultats obtenus montrent que O₃ est aussi toxique à court terme (20 mn) à 0,5 ppm.

Le *calcium intracellulaire* semble croître au cours des 5 premières minutes d’exposition puis décroître rapidement durant les 5 minutes suivantes. Une nouvelle augmentation de la concentration du calcium intracellulaire, plus lente, semble lui succéder au cours des 20 minutes restantes (Tableau 4).

La quantité de *peroxyde d’hydrogène* libérée dans le milieu augmente légèrement durant les 10 premières minutes d’exposition. La variation s’accroît très fortement au cours des 5 minutes suivantes avant de diminuer et de retrouver des taux normaux. De plus, la phase

⁶ Mesurée par dosage de la LDH

de libération massive de H_2O_2 suit de 5 minutes la première phase d'activation cellulaire mise en évidence par le dosage du calcium intracellulaire (Tableau 4).

En ce qui concerne le *monoxyde d'azote*, les concentrations sont voisines de la libération spontanée jusqu'à la 15^{ème} minute d'exposition. Une seconde phase de libération apparaît entre 25 et 30 minutes (Tableau 4).

Le taux de *calcium* est maintenu constant dans la cellule au repos.

Le *peroxyde d'hydrogène* fait partie des premières molécules après exposition à l'ozone. De plus, elle suit de 5 minutes la première phase d'activation cellulaire mise en évidence par le dosage du calcium intracellulaire ce qui semble confirmer l'hypothèse selon laquelle la *variation de calcium intracellulaire* pourraient être un signal d'activation pour des réactions intracellulaires, notamment la régulation de la poussée respiratoire (Holian, *et al.*, 1994 ; Hoyal, *et al.*, 1996). D'autre part, aucune autre phase de libération de H_2O_2 n'a pu être mise en évidence sur la durée des essais (30 minutes). Le peroxyde d'hydrogène pourrait donc être employé par les macrophages que comme premier système de défense contre les agressions ozonées de courte durée. En ce qui concerne le *monoxyde d'azote*, la mortalité cellulaire représente 10 % de la population au moment de la phase de libération et elle croît régulièrement sur la même période de temps. La libération de NO pourrait donc être liée à la perte d'intégrité membranaire des cellules exposées qui provoquerait la libération de LDH dans le milieu de culture. Toutefois, la quantité de calcium intracellulaire semble augmenter elle aussi sur le même laps de temps traduisant une activation du métabolisme cellulaire. Le NO libéré pourrait donc aussi être le résultat d'une synthèse en réponse à des lésions de plus en plus importantes. Le NO pourrait alors être considéré comme un deuxième système de défense cellulaire intervenant dans les agressions à long terme. Ces résultats corroborent le fait que le calcium soit un inducteur de la NO synthase (Laskin, *et al.*, 1994 ; Raddassi, *et al.*, 1994). Toutefois, seule l'étude de l'activité de la NO synthase et sa production permettrait de vérifier ces hypothèses.

L'ozone a donc un effet cytotoxique sur les macrophages avec un TL50 atteinte à 28 minutes pour 0,5 ppm. D'autre part, cette agression provoque l'activation des mécanismes de défense cellulaire et conduit à la libération de molécules de défense dont le peroxyde d'hydrogène et le monoxyde d'azote.

4.2 ELABORATION DU PROTOTYPE DE LABORATOIRE

Après avoir vérifié l'influence de l'ozone sur le comportement des macrophages et notre capacité à en mesurer certaines modifications, l'élaboration d'un prototype de laboratoire a été initiée afin de créer un outil biologique de mesure de la qualité globale de l'air qui puisse compléter les appareils de mesures physico-chimiques employés par les réseaux de mesure de la qualité de l'air.

Le prototype se compose de quatre parties :

- La production du matériel biologique peut être assurée soit par l'utilisation de flacons de culture différenciée soit par une culture en réacteur fonctionnant en production continue dont les paramètres régulés seront ceux précisés par la culture discontinue.
- La cellule d'exposition est constituée d'un compartiment recevant une fraction de la suspension cellulaire produite. Les macrophages y sont mis en présence des contaminants atmosphériques puis stimulés par le fMLP à 10^{-5} M.
- Le système d'acquisition se compose d'un microscope inversé équipé d'un objectif 20 X et d'une caméra CCD noir et blanc qui numérise l'image. Celle-ci est transmise à un micro-ordinateur afin de déterminer la V_{AS} des cellules stimulées.
- Le calculateur et les régulations sont réalisés par une station de travail PC. Elle détermine le degré de pollution atmosphérique ainsi que le bon fonctionnement du prototype. Les informations nécessaires afin d'assurer la pérennité de la culture des macrophages sont aussi prises en compte, de même que la gestion des transferts de fluides.

4.2.1 Mise au point d'un procédé de culture autonome

4.2.1.1 Première alternative : utilisation de flacons à concentrations cellulaires différenciées

Afin d'étudier cette possibilité de fonctionnement, quatre flacons de culture (Nunc, 80 cm²) ont été utilisés avec des concentrations cellulaires différentes. Ils sont ensuite placés dans l'étuve de culture. La production de macrophages et leur taux de mortalité sont suivis par comptage sur une cellule de Mallassez avec exclusion au Bleu Trypan 0,4 %.

La Figure 23 montre les variations du nombre de macrophages vivants présents dans un flacon de culture contenant des cellules à une concentration identique à celle de la culture mère, appelée « normale », et trois dilutions de cette même suspension cellulaire, soit $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$ et $\frac{1}{8}$.

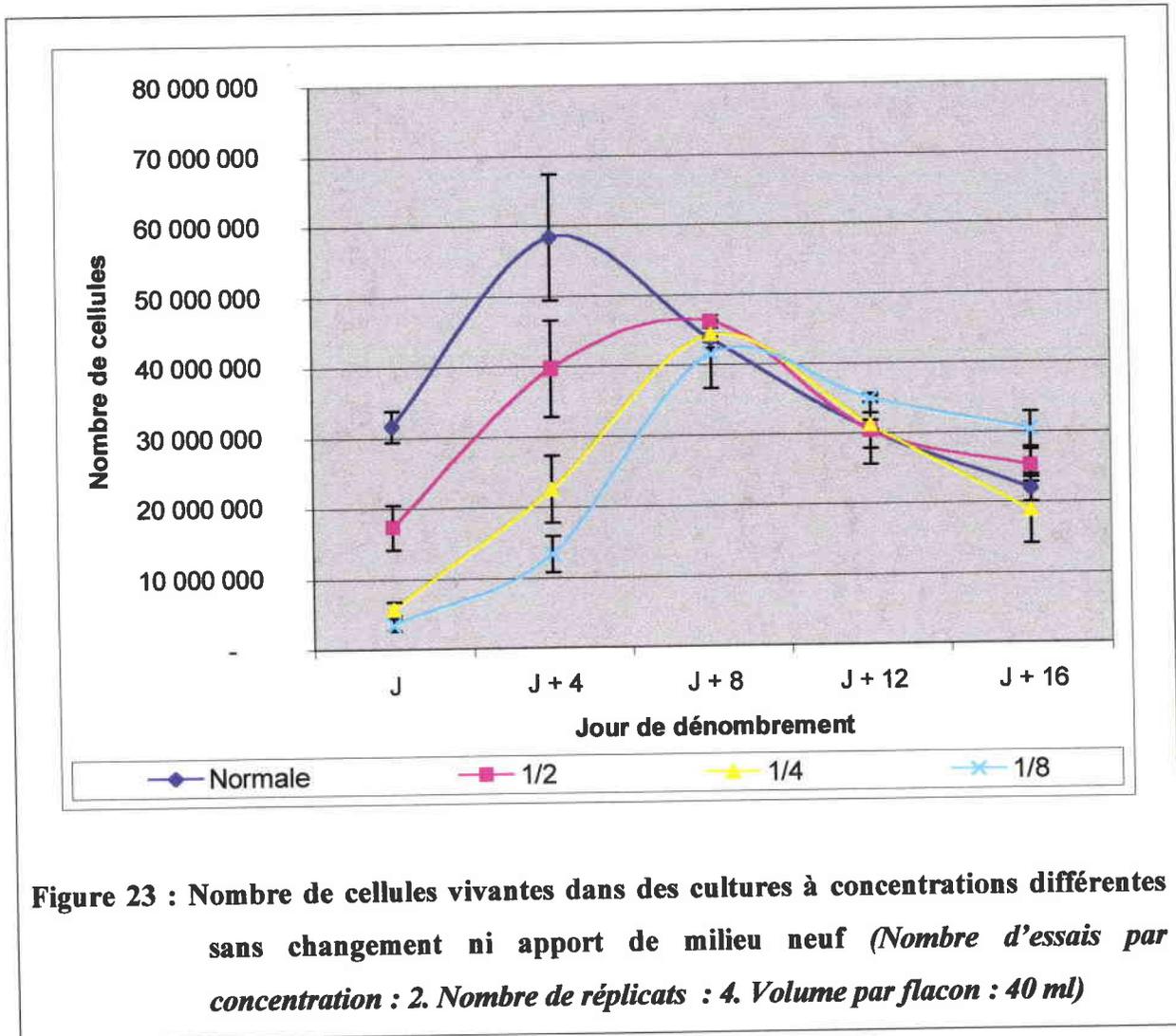


Figure 23 : Nombre de cellules vivantes dans des cultures à concentrations différentes sans changement ni apport de milieu neuf (Nombre d'essais par concentration : 2. Nombre de réplicats : 4. Volume par flacon : 40 ml)

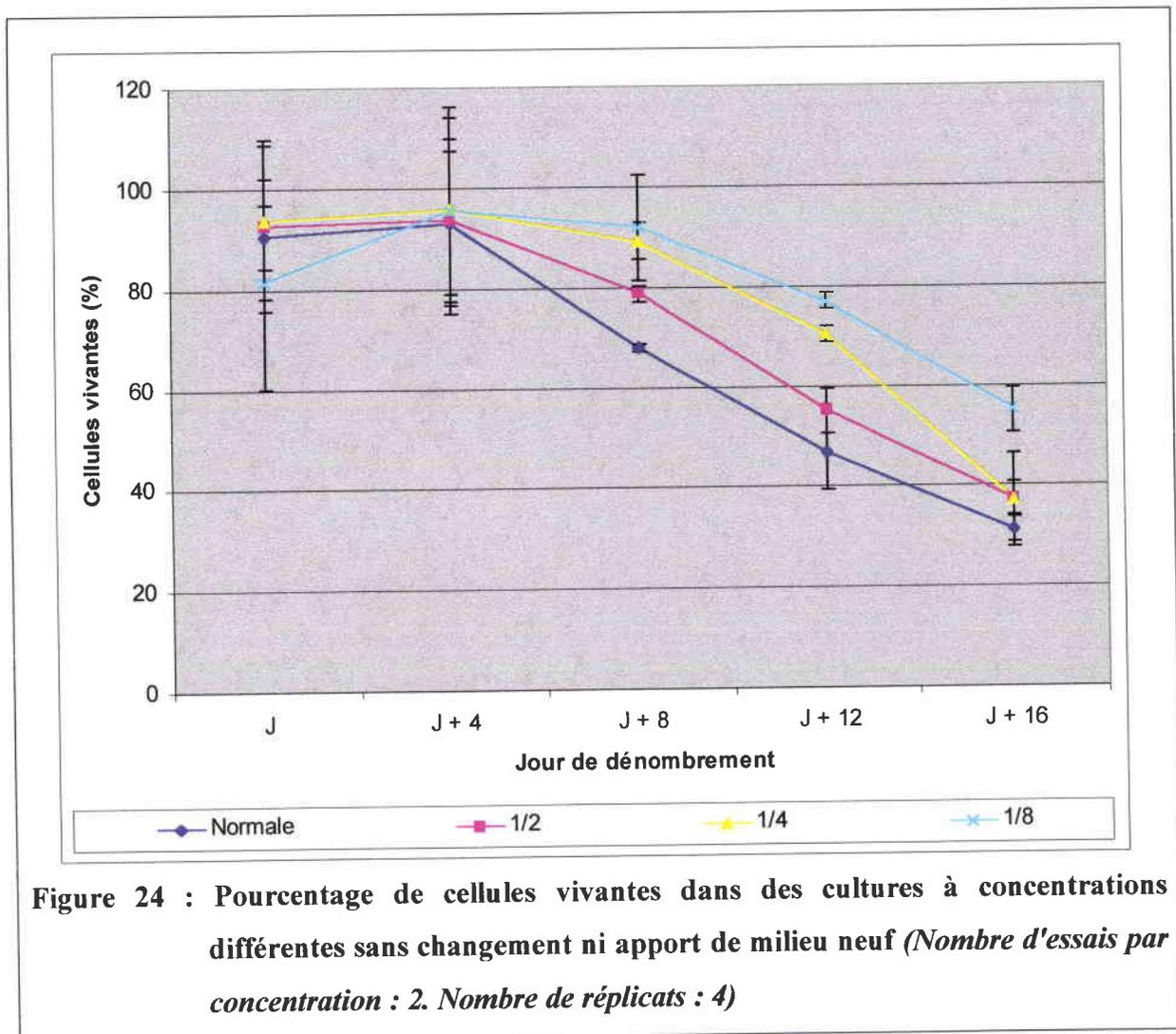
Nous pouvons constater que le nombre de macrophages présents dans la flasque à concentration cellulaire dite « normale », croît jusqu'au jour J + 4, puis décroît régulièrement au cours du temps jusqu'à J + 16. Les différentes dilutions ont une population qui croît d'autant plus vite que la dilution est forte entre J + 4 et J + 8. Le nombre de macrophages est identique pour l'ensemble des flacons de culture au jour J + 8 puis décroît au fil du temps.

Il semble donc qu'un compartiment à concentration identique à la culture mère du jour de préparation J au jour J + 4 puis un flacon de culture dont la dilution soit comprise entre $\frac{1}{2}$

et $\frac{1}{8}$ pour les jours J + 4 à J + 8, puisse être utilisé pour fournir le nombre de cellules nécessaires aux essais.

Afin de préciser davantage ces différentes données, nous nous sommes intéressés à la proportion de cellules vivantes présentes dans les différents flacons de culture.

La Figure 24 présente les variations du pourcentage de macrophages vivants dans le milieu de culture par rapport au nombre total de cellules pour les cultures présentées précédemment. Nous considérerons qu'un pourcentage moyen de 90 % au moins sera nécessaire pour réaliser des essais dans de bonnes conditions.



La concentration dite normale et la dilution $\frac{1}{2}$ ont un nombre de cellules vivantes voisin de 90 % jusqu'à J + 4. De plus, la dilution $\frac{1}{4}$ reste supérieure à 90 % jusqu'à J + 8. Enfin, la flasque diluée à $\frac{1}{8}$ présente un pourcentage de cellules vivantes supérieur à 90 % pour les jours J + 4 à J + 8. Le pourcentage de cellules vivantes dans le milieu de culture est donc d'autant plus faible que le nombre de cellules présentes au départ dans le milieu est faible.

L'ensemble de ces résultats montre qu' **un flacon de culture à deux compartiments pourrait être réalisée afin d'alimenter un système automatique en cellules pendant 8 jours**. Le premier compartiment contenant des macrophages à une concentration similaire à celle de la culture mère pourra être exploité les 4 premiers jours suivant la mise en place dans le système alors que le second, dont la concentration cellulaire serait le quart de la précédente, pourrait être utilisé du 4^{ème} au 8^{ème} jour, l'ensemble devant être renouvelé à la fin de cette période.

4.2.1.2 Seconde alternative : la culture en bioréacteur

La culture de cellules en continu peut être un autre moyen d'obtenir la biomasse nécessaire à la réalisation des mesures. Or, la littérature ne fait pas état de culture de THP-1 en bioréacteur. L'étude des conditions de croissance en culture discontinue permettra d'abord de déterminer les paramètres de croissance optimale de la souche. La culture en continu sera ensuite réalisée.

4.2.1.2.1 Culture discontinue

1. Croissance cellulaire

Les conditions de culture discontinue sont (Voir Chapitre II.C.1b.) :

- *Température* = $37^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$
- *Agitation* = 40 tours / mn \pm 1 tours / mn
- *pH* = $7,5 \pm 0,05$ avec régulation par ajout de NaOH et HCl à 0,5 N
- *Oxygène* = 60 % \pm 5 % avec régulation par addition d'air comprimé filtré (2 bars ; 3 l / mn ; filtre 0,22 μm)
- *Ensemencement* : $2,5 \cdot 10^5$ cellules / ml

Trois cultures discontinues successives ont été effectuées. Pour chacune, deux prélèvements de 3 ml sont effectués chaque jour afin de suivre l'état de la culture. La courbe de croissance peut alors être tracée pour les conditions définies ci-dessus (Figure 25).

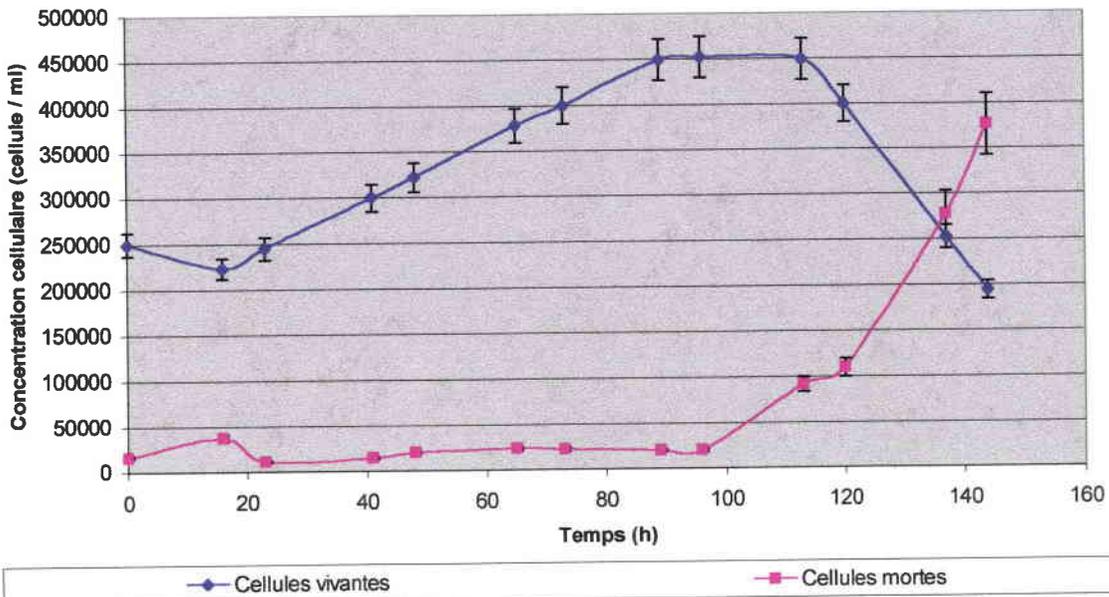


Figure 25 : Courbe de croissance et graphes associés pour des THP-1 en culture discontinue (Nombre de cultures : 3 ; Durée : 140 h / culture ; Dénombrements réalisés en triplicats sur chaque échantillon)

La variation de concentration des macrophages dans le réacteur est fonction d'une part de la vitesse de prolifération réelle de la souche et d'autre part de sa vitesse de décès. Ainsi, alors que le nombre de cellules croît constamment dans le réacteur, les courbes représentatives de la prolifération réelle et du décès cellulaire permettent la description de plusieurs phases de développement :

1. 0 – 19 h : Le nombre de cellules vivantes diminue de $2,5 \cdot 10^5$ cellules / ml à $2,1 \cdot 10^5$ cellules / ml, et le réacteur s'alcalinise (seul l'acide est consommé). Cette phase peut correspondre à l'adaptation des macrophages au mode de culture. En effet, les cellules se développent habituellement en fond de flacon dans une étuve à CO_2 (37°C ; atmosphère saturée en humidité et enrichie à 5% de CO_2). Ici, elles sont en suspension, agitées, avec une régulation d'oxygène par injection d'air et de pH par ajout de soude ou d'acide chlorhydrique. Les contraintes subies par les phagocytes sont donc plus importantes que pour les cultures traditionnelles.
2. 20 – 90 h : Le nombre de cellules croît régulièrement, variant de $2,1 \cdot 10^5$ cellules / ml à $4,5 \cdot 10^5$ cellules / ml, ce qui indique un développement correct des macrophages dans les

conditions de culture fixées. De plus, la population double en 66 h au cours de cette phase. Ceci est en accord avec les temps de doublement pour les cultures en flacon de culture (60 à 70 h) (Tsuchiya, *et al.*, 1980) ainsi que les résultats obtenus sur nos propres cultures en flacon (Nunc, 80 cm²). D'autre part, le réacteur a tendance à s'acidifier : seule la base est consommée. En effet, en phase de croissance, les cellules absorbent les nutriments et produisent des métabolites rejetés dans le milieu de culture. C'est par exemple le cas de l'acide lactique qui résulte de la transformation du glucose lors de la glycolyse : 80 % du glucose peut ainsi être converti en acide lactique puis libéré dans le milieu de culture (Fiechter and Gmünder, 1989 ; Reitzer, *et al.*, 1979).

3. 91 – 115 h : La courbe décrit une phase plateau à une concentration de $4,5 \cdot 10^5$ cellules / ml. Le nombre de cellules mortes retrouvées dans le milieu de culture reste stable puis tend à augmenter illustrant l'équilibre dynamique de la culture suivie de l'amorce de son déclin.
4. 116 – 144 h : Le nombre de macrophages vivants diminue rapidement allant jusqu'à devenir inférieur à la quantité de cellules mortes à la 135^{ème} heure de culture. La phase de décroissance de la culture indique alors soit la disparition d'un substrat nécessaire au développement de la souche (facteur limitant), soit l'apparition de métabolites en concentration toxique dans le milieu. Le lactate est ainsi considéré comme un inhibiteur de croissance. Cet effet est cependant le plus souvent lié à l'acidification du milieu de culture et non à la nature chimique propre du composé (Kurano, *et al.*, 1990). Les ions ammonium résultant de la dégradation de la glutamine sont aussi considérés comme de forts inhibiteurs de croissance sans toutefois que le mécanisme de leur toxicité ait été élucidé.

En culture discontinue, les THP-1 peuvent donc être utilisées pendant au moins 90 heures et au mieux 115 heures avec les conditions que nous avons déterminées.

2. Vitesse spécifique de croissance et taux de dilution

Notre objectif étant de développer une culture en continue des macrophages, il convient de calculer les vitesses spécifiques de culture des macrophages. Celles-ci déterminent en effet les volumes qui peuvent être prélevés dans le cytotqueur ainsi que la quantité de milieu nutritif à ajouter de façon à conserver une concentration cellulaire constante.

Vitesse spécifique

De même que la concentration cellulaire totale, la vitesse spécifique de croissance apparente de la culture est une fonction de la vitesse spécifique de croissance réelle de la population cellulaire et sa vitesse spécifique de décès :

$$\mu_{\text{apparent}} = \mu_{\text{réel}} - \mu_{\text{décès}}$$

où :

- μ_{apparent} : vitesse spécifique de croissance apparente de la culture (h^{-1})
- $\mu_{\text{réel}}$: vitesse spécifique de croissance réelle de la culture (h^{-1})
- $\mu_{\text{décès}}$: vitesse spécifique de décès de la culture (h^{-1})

Or, nous cherchons avant tout à produire de la biomasse. Il nous faut donc déterminer la vitesse spécifique de croissance apparente (μ_{apparent}) de la culture qui est la seule à être relative aux seules cellules vivantes. La vitesse spécifique de croissance apparente est habituellement définie comme le rapport entre la pente de la courbe de croissance au temps T et la valeur moyenne de la concentration cellulaire au même instant. La variation de μ_{apparent} peut donc être décrite par la fonction :

$$\mu_{\text{apparent}} = \frac{1}{X} \cdot \frac{d(X)}{dt}$$

où :

- μ_{apparent} : vitesse spécifique de croissance apparente de la culture (h^{-1})
- X : concentration de cellules vivantes (cellule / ml)
- T : temps (h)

Ceci permet de tracer la courbe représentative de l'évolution de la vitesse spécifique de croissance apparente de la culture. Le tracé ainsi obtenu, associé à la courbe de croissance correspondante, permet de suivre plus précisément le développement cellulaire (Figure 26).

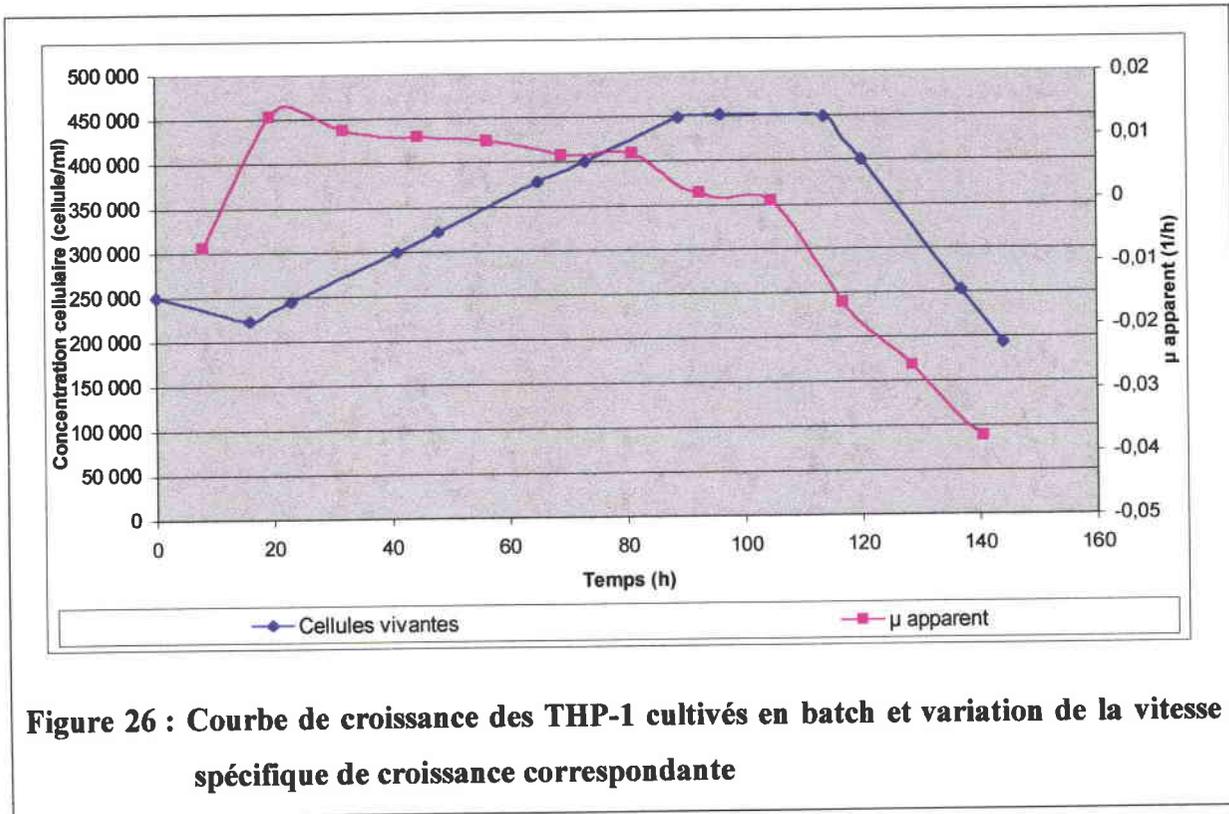


Figure 26 : Courbe de croissance des THP-1 cultivés en batch et variation de la vitesse spécifique de croissance correspondante

Plusieurs étapes peuvent être caractérisées :

1. 0 – 15 h : μ apparent est négatif mais croissant, traduisant la perte de matériel cellulaire mais aussi son ralentissement qui met en évidence l'adaptation des cellules au mode de culture.
2. 16 – 21 h : μ apparent décrit une courbe croissante positive et passe par un maximum correspondant au point d'inflexion de la courbe de croissance (μ apparent max. = $0,0153 \text{ h}^{-1}$) suivi de l'amorce de la phase exponentielle où les cellules se développent en conditions optimales.
3. 21 – 103 h : μ apparent décroît avec une pente faible en restant positif alors que le nombre de cellules augmente régulièrement. Cette phase correspond au ralentissement de la croissance cellulaire.

4. 103 – 140 h : μ_{apparent} décroît avec une pente importante et la biomasse diminue montrant que la culture est en phase de dégénérescence.

Taux de dilution

Dans l'optique de l'utilisation au sein du prototype, il est nécessaire de produire des cellules vivantes en quantité suffisante. En phase de mesure de la qualité de l'air, 375 000 cellules sont utilisées par analyse, soit par 30 minutes : 750 000 cellules.h⁻¹ sont donc nécessaires à la réalisation des mesures. Une mortalité aussi faible que possible étant souhaitable, il sera important de maintenir la culture dans sa phase de croissance exponentielle. La condition de l'équilibre est que le taux de dilution (D) soit égal à la vitesse spécifique de croissance et inférieur à la vitesse spécifique de croissance maximale :

$$D < \mu_{\text{apparent max.}}$$

$$D < 0,0153 \text{ h}^{-1}$$

Le débit à l'équilibre est donc de :

$$Q = D \cdot V$$

- où :
- Q : débit (ml.h⁻¹)
 - D : taux de dilution (h⁻¹)
 - V : volume du cytoculteur (ml)

Pour une culture de THP-1 en continu réalisée dans les conditions de la culture discontinue, le débit d'équilibre est donc inférieur à 11,4 ml / h. Il correspond à la quantité de milieu de culture qui peut être rajoutée, et soutirée, dans le cytoculteur afin de maintenir les cellules dans les conditions de croissance optimales. Il correspond par ailleurs à un prélèvement maximal d'environ 4 560 000 cellules / h. Toutefois, la valeur de consigne retenue pour le pH, a été déterminée à partir des valeurs moyennes employées pour d'autres cellules de mammifère. La valeur optimale pour la souche sera fixée après stabilisation de la culture en continu.

4.2.1.2.2 Culture en continu

Les conditions de culture de départ sont celles retenues lors de la réalisation des cultures discontinues précédentes :

- *Température* = $37^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$
- *Agitation* = $40 \text{ tours / mn} \pm 1 \text{ tours.mn}^{-1}$
- *pH* = $7,5 \pm 0,05$ avec régulation par ajout de NaOH et HCl à 0,5 N
- *Oxygène* = $60 \% \pm 5 \%$ avec régulation par addition d'air comprimé filtré (2 bars ; 3 l.mn^{-1} ; filtre $0,22 \mu\text{m}$)
- *Ensemencement* : $2,5 \cdot 10^5 \text{ cellules.ml}^{-1}$
- *Taux de dilution* $< 0,0153 \text{ h}^{-1}$

L'obtention d'une culture stabilisée débute par une culture discontinue réalisée dans les conditions établies précédemment. Le passage en continu est effectué en fin de phase exponentielle ce qui correspond à 80 heures de culture environ. Une fois la phase de culture en continu atteinte, l'influence du pH est déterminée afin de connaître le pH optimal de croissance de la souche. Pour chaque culture, deux prélèvements par jour sont effectués afin de suivre l'état de la culture. La courbe de croissance peut alors être tracée et son évolution au fil du temps suivie (Figure 27).

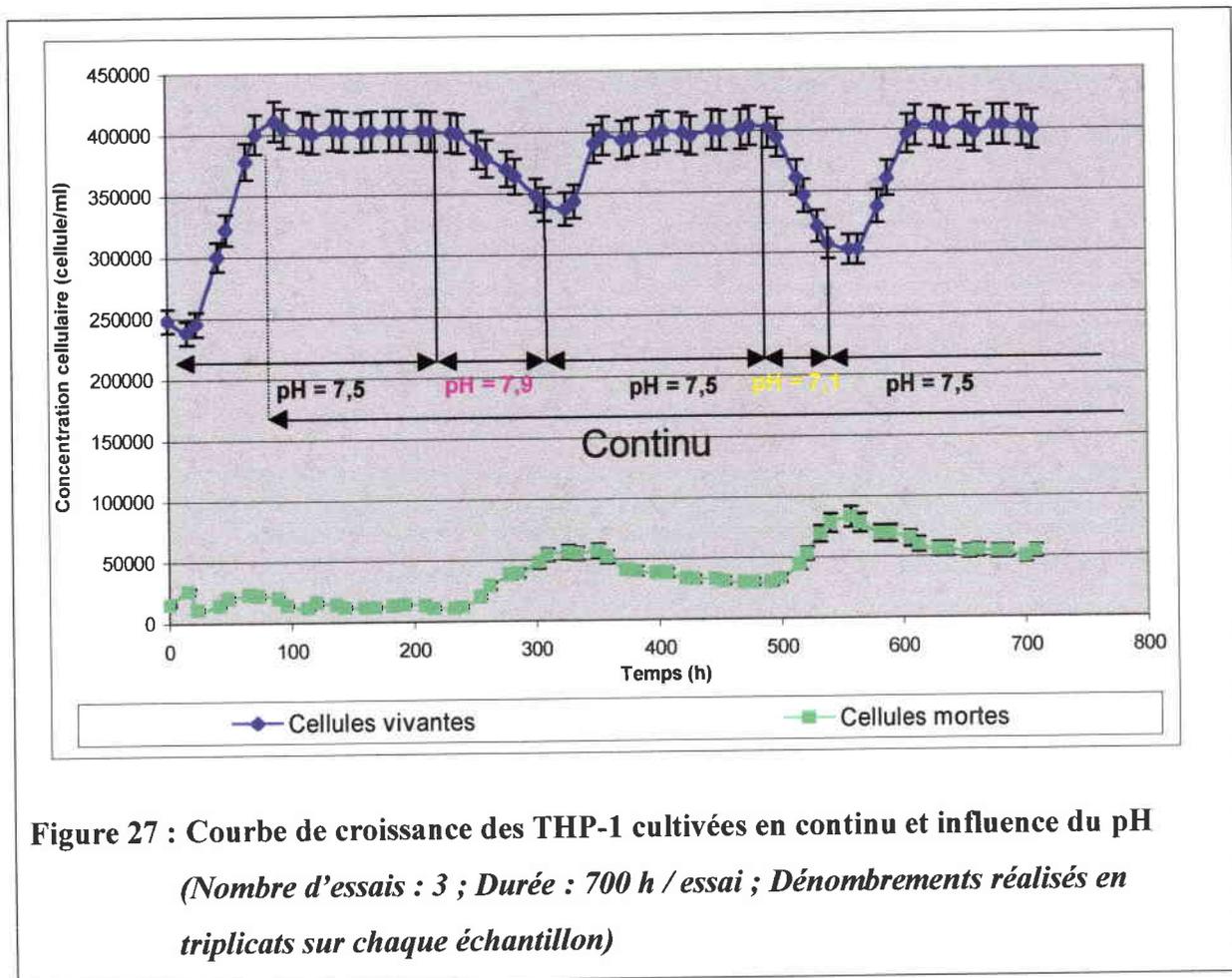


Figure 27 : Courbe de croissance des THP-1 cultivées en continu et influence du pH
(Nombre d'essais : 3 ; Durée : 700 h / essai ; Dénombrements réalisés en triplicats sur chaque échantillon)

Le tracé obtenu peut être décrit selon plusieurs phases distinctes :

1. 0 – 80 h : Le nombre de cellules varie conformément aux résultats obtenus lors de la réalisation des différentes cultures discontinues.
2. 80 – 230 h : La culture en continu débute à la 80^{ème} heure de culture avec mise en service de l'admission de milieu neuf et de l'extraction de suspension cellulaire. La population cellulaire se stabilise alors à 400 000 cellules.ml⁻¹ environ. Cette concentration est maintenue 150 heures sans modification. Le volume extrait durant cette période correspond à 1710 ml, soit approximativement 2,3 fois le volume du réacteur. Le débit de 11,4 ml / h appliqué au réacteur permet donc bien le renouvellement et la stabilisation de la population cellulaire.
3. 230 – 310 h : Le pH du réacteur est alcalinisé par addition de NaOH puis maintenu à 7,9. Le décès cellulaire augmente alors avec une perte moyenne de 800 cellules ml⁻¹ h⁻¹ sans que le plateau d'équilibre ne soit atteint.

4. 310 – 490 h : Le pH du réacteur est acidifié de façon à revenir à la valeur initiale, soit 7,5. La population cellulaire initiale est alors restituée.
5. 490 – 540 : Le pH est acidifié par addition de HCl et maintenu à 7,1. De même que lors de l'alcalinisation du réacteur, le décès cellulaire augmente avec une perte cellulaire moyenne de 2100 cellules ml⁻¹ h⁻¹ sans que le plateau d'équilibre ne soit atteint.
6. 540 – 710 h : Le pH est alcalinisé de façon à revenir à la valeur initiale, soit 7,5. La population cellulaire initiale est alors restituée. La valeur de 7,5 est donc adaptée pour la culture de THP-1 en réacteur. Elle est en accord avec les conditions optimales de développement définies pour des cellules de mammifères (Georgen, 1992 ; Martial, 1991).

Il est donc possible d'obtenir une culture continue stabilisée de THP-1 avec les paramètres définis lors de la culture discontinue. Celle-ci peut être maintenue au moins 700 heures avec pour *seul entretien le changement des solutions d'acide, de base et de milieu de culture ainsi que le remplacement du bidon recueillant les effluents* du prototype.

La recherche du pH optimal de développement de la souche montre que ce dernier se situe dans un palier compris entre les bornes 7,1 et 7,9. **La valeur médiane de 7,5 peut donc être retenue comme consigne pour la culture de THP-1 en réacteur.**

4.2.1.3 Choix du système de production de cellules

Deux systèmes d'alimentation automatiques du prototype en cellules ont donc été étudiés :

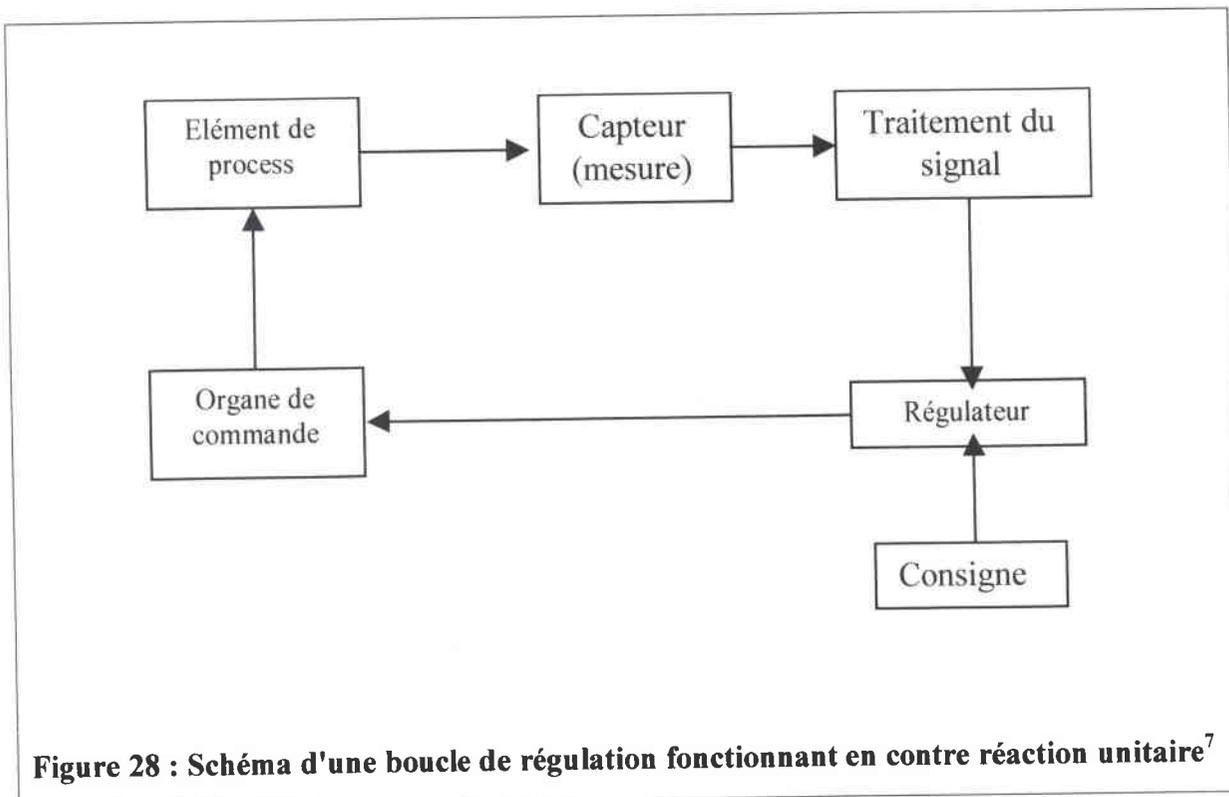
- *La culture en flacons* à concentration cellulaire différenciée assure l'alimentation du réacteur pendant 8 jours, au bout desquels les flacons doivent être remplacés. La population cellulaire est donc intégralement renouvelée.
- *La culture continue* en réacteur assure l'alimentation du réacteur pour une durée au moins égale à 700 heures, soit environ 1 mois, avec apport périodique de milieu de culture neuf, d'acide et de base. Dans ces conditions, la population cellulaire reste, quant à elle, homogène jusqu'au remplacement du réacteur.

La solution retenue sera la culture en continu. Outre le fait que la population cellulaire reste homogène, les différents paramètres physico-chimiques de la culture peuvent être contrôlés. Le milieu de culture reste donc lui aussi homogène. De plus, le suivi de la consommation d'acide, de base et d'oxygène permet de diagnostiquer les contaminations bactériennes ou fongiques éventuelles comme nous avons pu le vérifier lors de la mise en œuvre du prototype.

4.2.2 Mise au point des régulations et traitement de l'information

4.2.2.1 Principe

L'étude du batch a permis de déterminer les paramètres de culture des THP-1 et de fixer les consignes des boucles de régulation. Il est alors nécessaire d'identifier leurs différentes composantes (Figure 28).



⁷ Une boucle de régulation fonctionnant en contre réaction unitaire traduit une régulation faisant intervenir la mesure d'un paramètre unique (exemple : la température) qui est comparé à la valeur de consigne. Le résultat de cette comparaison peut alors provoquer l'activation de l'organe de commande (exemple : ceinture chauffante).

L'*élément de process* est le paramètre biologique ou physico-chimique mesuré par un *capteur* spécifique (pH, oxygène dissous, température, ...). La phase de *traitement du signal* qui suit, a pour objet principal de mettre le signal généré à une échelle exploitable par le régulateur. Elle diminue aussi les parasites, les artefacts et corrige les problèmes de linéarité de réponse du capteur. L'information est ensuite transmise au *régulateur* qui la compare à la *consigne* avant d'agir sur le ou les *organe(s) de commande*. Le régulateur doit, de plus, intégrer la présence de constantes de temps, comme le temps de réponse du capteur et de l'organe de commande face à la variation réelle de l'*élément de process*. Outre ces paramètres, il faut aussi considérer que l'intégration du réacteur dans le système de détermination de la qualité de l'air rajoute des contraintes.

4.2.2.2 Régulation de la température

- Capteur : Le capteur thermique utilisé est une sonde à résistance de type Pt 100. Basée sur la variation de résistance du platine en fonction de la température, elle est étalonnée avec une référence de 100 Ω pour 0°C. Sa gamme de mesure est supérieure à celle utilisée pour ce travail et la réponse fournie est linéaire. Toutefois, le capteur sera utilisé autour de 37°C. La linéarité de la réponse a donc été vérifiée entre 30 et 80°C (Figure 29).

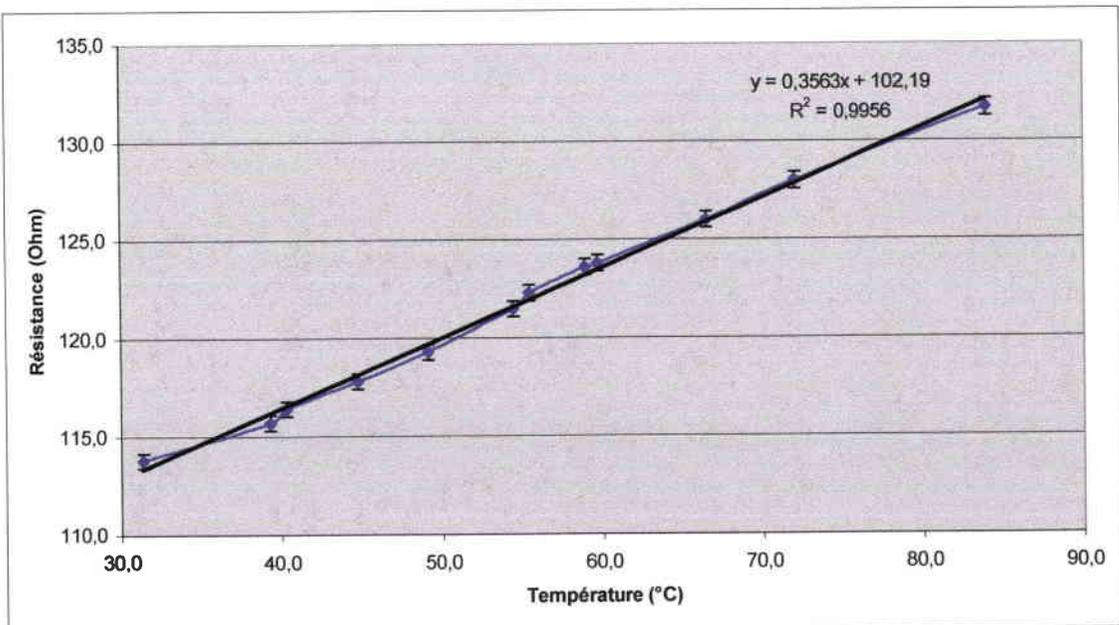
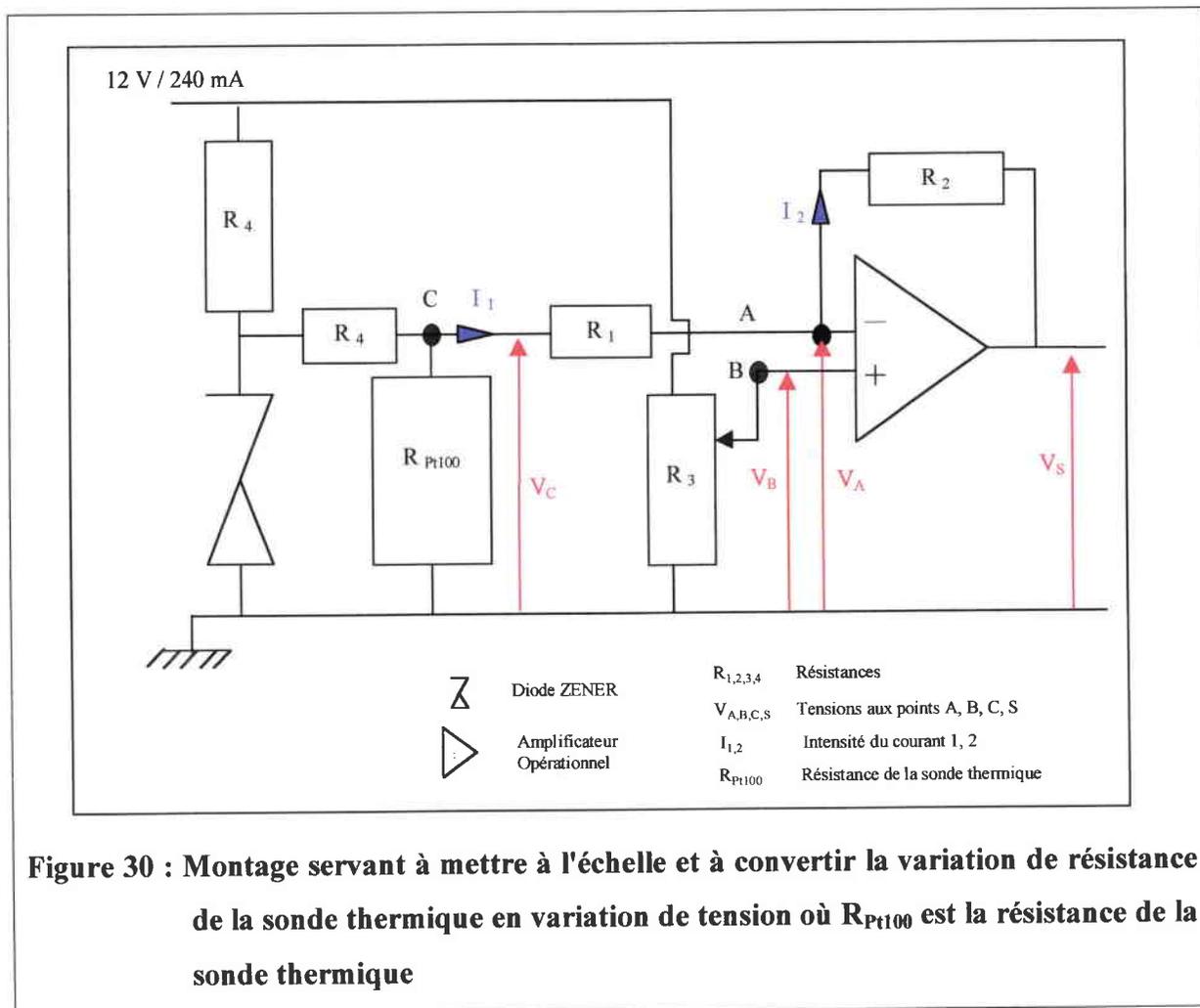


Figure 29 : Variation de la résistivité de la sonde thermique en fonction de la température avec la courbe de tendance correspondante ($r^2 = 0,9956$; Nombre de répliqués : 3)

- Traitement du signal : Les entrées de la carte d'acquisition (ATMIO 16 E 10, National Instrument) utilisée sur le prototype ne permettent d'acquérir que des variations de tension. Il est donc nécessaire de convertir le signal de la sonde, c'est à dire transformer une variation de résistivité en variation de tension. Un montage électronique basé sur un amplificateur opérationnel monté en inverseur avec diode ZENER est réalisé (Figure 30).



La relation suivante peut alors être établie :

$$V_S = (V_B - V_C) \cdot \frac{R_2}{R_1}$$

- où :
- V_S est la tension relevée par la carte d'acquisition
 - V_B , la tension au point B
 - V_C , la tension aux bornes de la résistance de la sonde thermique
 - R_1 et R_2 , des résistances

- Organe de commande : Une régulation à 0,1°C implique la mise en place d'un organe de chauffe, d'un organe de refroidissement et d'un fluide caloporteur. Le fluide le plus utilisé dans les cytotculteurs est l'eau car ce liquide possède une forte inertie thermique et peut être facilement homogénéisé. Cependant, afin de limiter les opérations de maintenance sur le prototype, nous nous servons plutôt de l'air. Certes, son inertie thermique est faible, mais il élimine les risques liés aux fuites de liquides au sein d'un système possédant de nombreuses sources électriques. Il évite de plus l'ajout d'une alimentation d'eau sur le site d'implantation du biocapteur. La cuve contenant les cellules est équipée d'une ceinture chauffante, la transmission de la chaleur étant assurée par le contact direct avec le verre. Le refroidissement de l'ensemble est assuré par une source d'air à une température inférieure à 37°C fournie par la climatisation de l'ensemble du bioréacteur à 20°C. Cette régulation permet d'augmenter rapidement la température du réacteur lors de la mise en service de celui-ci tout en autorisant une régulation fine en cours de fonctionnement.

4.2.2.3 Régulation du pH

- Capteur : Le capteur utilisé est une sonde pH à électrode de verre et électrolyte gélifié autoclavable (Metler Toledo). Basée sur la mesure de la différence de potentiel entre une électrode de mesure en argent et une électrode de référence en platine, elles fournissent une tension fonction du pH de la solution telle que :

$$E = 0,430 - 0,058 \cdot pH$$

- Traitement du signal : La tension délivrée par la sonde est donc de 0,058 mV par unité de pH. Nous voulons effectuer une régulation à 0,05 unités pH près ce qui correspond à une variation de 0,003 mV. Il est donc nécessaire d'amplifier ce signal afin qu'il soit mesurable. Un montage électronique basé sur un amplificateur opérationnel monté en inverseur est réalisé (Figure 31).

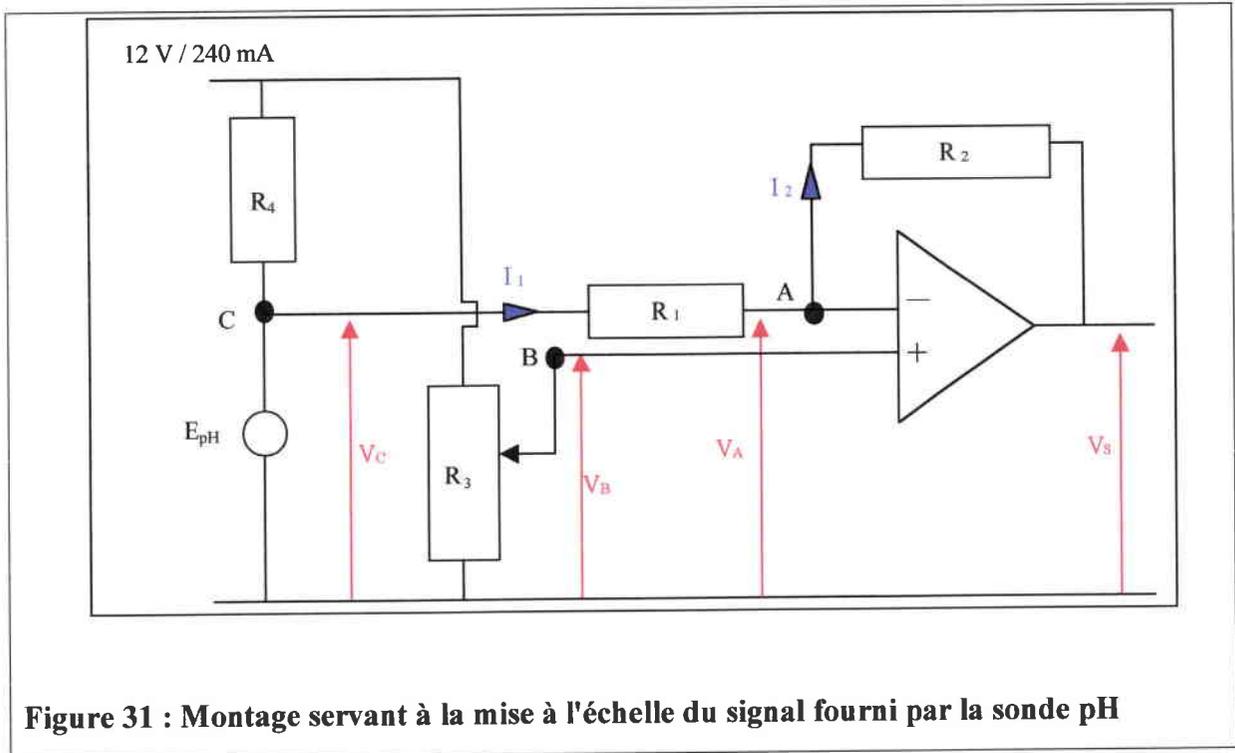


Figure 31 : Montage servant à la mise à l'échelle du signal fourni par la sonde pH

Une relation du même type que pour la mesure de la température, peut être établie :

$$V_S = (V_B - V_C) \cdot \frac{R_2}{R_1}$$

où :

- V_S est la tension relevée par la carte d'acquisition
 - V_B , la tension au point B
 - V_C , la tension aux bornes de la résistance de la sonde pH
 - R_1 et R_2 , des résistances
- **Organe de commande :** Nous avons vu lors de la réalisation du batch, qu'une régulation par ajout de NaOH et d'HCl était nécessaire. La régulation se limitera donc à actionner deux pompes péristaltiques alimentant le cytotoculteur en soude et acide chlorhydrique stériles.

4.2.2.4 Régulation du taux d'oxygène

- Capteur : Le capteur utilisé est une sonde à oxygène autoclavable (Metler Toledo). Basée sur la variation de potentiel entre une électrode dite de mesure et une électrode de référence avec un électrolyte fermant le circuit.
- Traitement du signal : La sonde délivre une tension proportionnelle à la quantité d'oxygène dissous. La tension correspondante est amplifiée par un montage du même type que celui employé pour la sonde pH.
- Organe de commande : Seule une « régulation » par apport d'oxygène sera utilisée. En effet, des variations de taux de 5 à 10 % étant tolérées par les cellules animales, l'élimination de l'oxygène sera assurée par la consommation cellulaire. L'organe effecteur est donc la pompe à membrane d'un générateur d'air zéro (Voir II.B.3) qui permet d'obtenir de l'air non pollué associé à un filtre 0,22 μm éliminant les micro-organismes.
- Régulation ? : Dans la configuration retenue, l'oxygène n'est pas, au sens strict du terme, régulé. En effet, pour parler de régulation, il faut pouvoir maîtriser l'ajout et le retrait d'O₂ dans le milieu. Le retrait de l'oxygène est habituellement réalisé par ajout d'azote. Or, nous avons choisi de limiter la « régulation » par des ajouts contrôlés d'oxygène. La consigne est fixée à 60 % de saturation ± 5 %. En cas d'insuffisance, une quantité prédéterminée d'oxygène est injectée. Celle-ci permet seulement de compenser la consommation cellulaire en oxygène. Ce principe de fonctionnement permet de détecter les variations importantes de consommation d'O₂, signe de développement bactérien ou fongique dans le réacteur, comme nous avons pu le vérifier à plusieurs reprises. En effet, le surplus de consommation lié à la croissance de ces espèces n'est pas compensé par des ajouts prédéterminés d'oxygène. Le milieu s'appauvrit donc en oxygène. La mesure de la sonde à oxygène a donc été reliée à une alarme fixée à 50 % de saturation. La sonde est donc utilisée afin de contrôler les apports en oxygène nécessaires au bon développement des cellules mais aussi en tant qu'indicateur de contamination.

4.2.2.5 Régulation de niveau

- Capteur : Une cellule photoélectrique est appliquée contre la surface transparente du réacteur à la hauteur de fonctionnement choisie.
- Organe de commande : Une pompe péristaltique est chargée du prélèvement de la suspension cellulaire. L'admission de milieu de culture est assuré par l'ouverture d'une électrovanne.
- Régulation : A chaque cycle de fonctionnement du biocapteur, une fraction de la suspension cellulaire contenue dans le cytoculteur est prélevée. La quantité de liquide dans le réacteur diminue donc au fil du temps. La cellule photoélectrique émet un faisceau lumineux continu. Si le niveau de la suspension cellulaire est suffisant, ce faisceau est absorbé. Le détecteur de la cellule photoélectrique n'est pas activé et un nouveau cycle de fonctionnement peut être initié. Par contre, si le niveau est trop faible, le faisceau électrique active le détecteur de la cellule photoélectrique. L'électrovanne placée sur la ligne d'admission de milieu de culture est alors ouverte jusqu'à ce que le faisceau de la cellule photoélectrique soit coupé par le milieu de culture revenu à la hauteur de consigne.

4.2.2.6 Le traitement de l'information

Le logiciel développé est chargé, en premier lieu, de déterminer le degré de pollution atmosphérique. Il doit donc effectuer les calculs nécessaires à l'établissement d'indices relatifs au degré de pureté de l'air ambiant mais aussi contenir les éléments nécessaires à la gestion des transferts de fluides dans la cellule d'analyse. De plus, il est nécessaire d'intégrer les éléments de contrôle de bon fonctionnement de l'appareil ainsi que l'émission des alarmes associées.

Seuls les calculateurs permettent de prendre en compte l'ensemble de ces contraintes. Un schéma global pour le système de collecte de l'information peut alors être proposé (Figure 32).

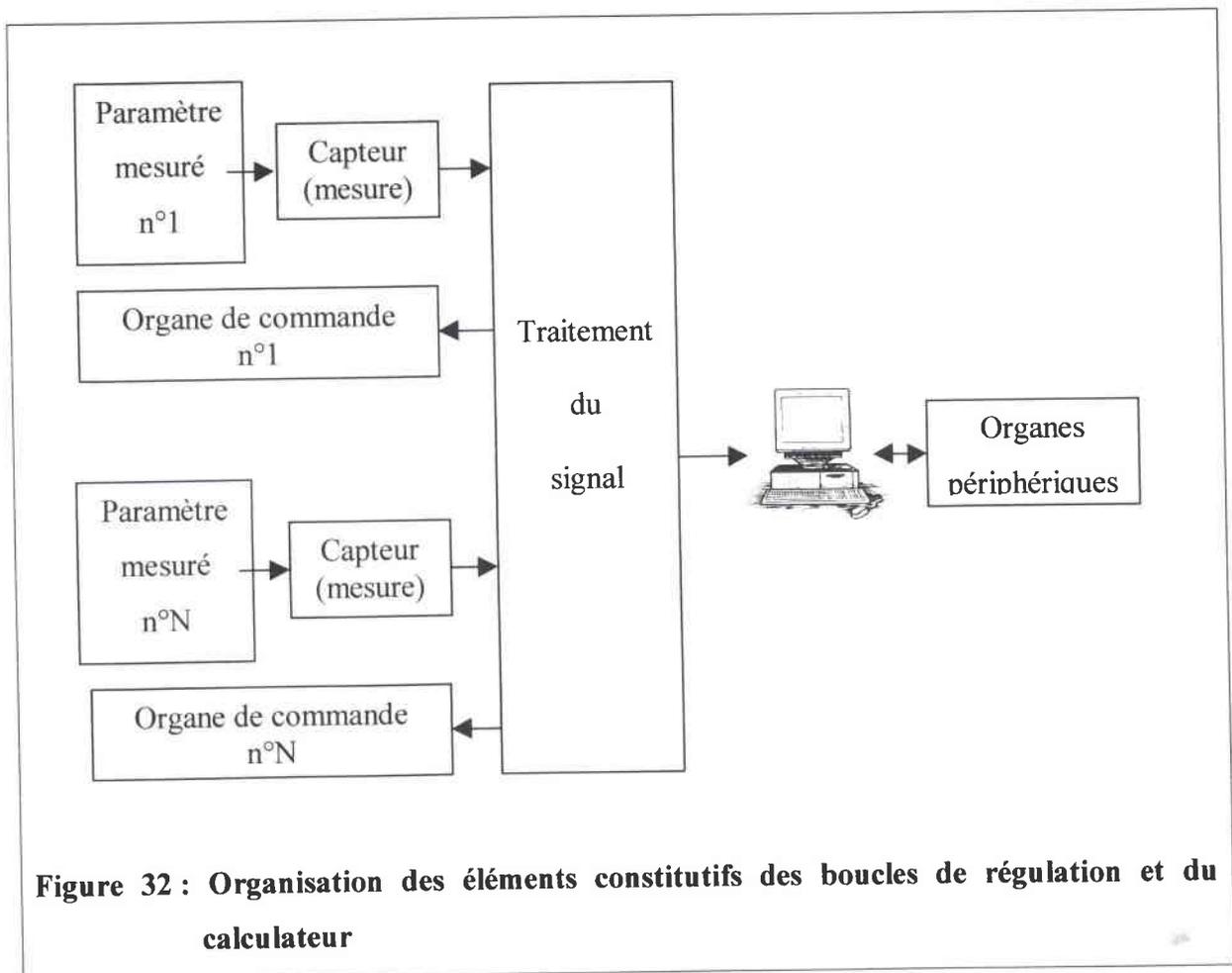


Figure 32 : Organisation des éléments constitutifs des boucles de régulation et du calculateur

4.2.2.7 Logigramme du programme informatique

Le logiciel développé doit donc permettre de :

- réguler les paramètres nécessaires au bon fonctionnement du réacteur cellulaire
- déterminer la charge polluante de l'atmosphère
- contrôler le bon fonctionnement des différents organes du prototype
- contrôler le bon fonctionnement du système de mesure
- gérer les procédures d'alarme inhérentes aux niveaux de qualité de l'air
- gérer les procédures d'alarme inhérentes aux contrôles de bon fonctionnement

L'ensemble de ces caractéristiques conduit au développement d'un logiciel dont le fonctionnement peut être décrit selon deux cycles imbriqués :

- Le premier, général, permet d'appréhender le déroulement d'un cycle de fonctionnement de 24 heures (Figure 33) :
 - Un témoin journalier est tout d'abord réalisé en présence d'air zéro⁸ stagnant et la V_{AS} comparée à une valeur guide ceci afin de détecter une altération possible de la souche ou de la culture. En cas d'échec, cet essai est réitéré. Au bout de trois tentatives infructueuses, une alarme pourra alors être générée.
 - Un second témoin avec exposition à un flux d'air zéro est fait par demi-journée. De même que précédemment, trois tentatives infructueuses déclencheront une alarme.
 - Les mesures de qualité de l'air sont, quant à elles, effectuées en boucle. La V_{AS} obtenue est traduite en indice de qualité de l'air puis comparée à une valeur guide. En fonction du résultat, une alarme pourra être déclenchée.
- Le second permet de décrire les différentes étapes qui interviennent lors de la réalisation d'un essai (témoins, mesure de la qualité de l'air) (Figure 34) :
 - Le pH est régulé en continu pendant la réalisation des étapes décrites ci-après. Contrairement aux versions précédentes, la version Labview 5.0 (National InstrumentTM) est en effet conçue pour fonctionner en multitâche. Plusieurs opérations peuvent donc être réalisées simultanément.

⁸ L'air zéro est obtenu par passage d'air à 3 l.mn⁻¹ sur charbon actif et filtration à 0,22 µm.

- Les opérations qui conduisent à la mesure sont découpées en séquences de manière suivante :
 1. *Au niveau du cytotoculteur* : La régulation du niveau du cytotoculteur permet de conserver un volume réactionnel constant et, donc, une concentration cellulaire peu variable. Le déclenchement d'une alarme prévient l'opérateur d'un défaut d'alimentation. L'oxygène dissous est aussi « régulé », avec les restrictions vues précédemment. Une alarme reliée au défaut d'oxygène permet d'identifier une contamination possible du réacteur et donc la nécessité d'un arrêt momentané du réacteur afin de remplacer ce dernier.
 2. *Au niveau de la cellule de mesure* : La première phase consiste à admettre un volume de suspension cellulaire tel que la consommation horaire nécessaire au bon fonctionnement du réacteur en continu soit assurée. Cette admission a lieu toute les demi heures et représente donc la moitié du volume défini par le taux de dilution précédemment calculé. Ce volume, plus important que la quantité nécessaire au bon déroulement des essais, permet aussi de mouiller correctement la surface de la cellule. L'excédent est ensuite éliminé de façon à conserver une lame liquide qui peut être soit exposée à de l'air zéro stagnant (témoin journalier) ou en flux (témoin air zéro), soit exposée à l'air (mesure de la qualité de l'air).
 3. *L'analyse* conduisant à la mesure de la qualité de l'air peut alors débiter.
 4. La suspension de THP-1 est évacuée, la cellule de mesure nettoyée et une nouvelle mesure peut avoir lieu.

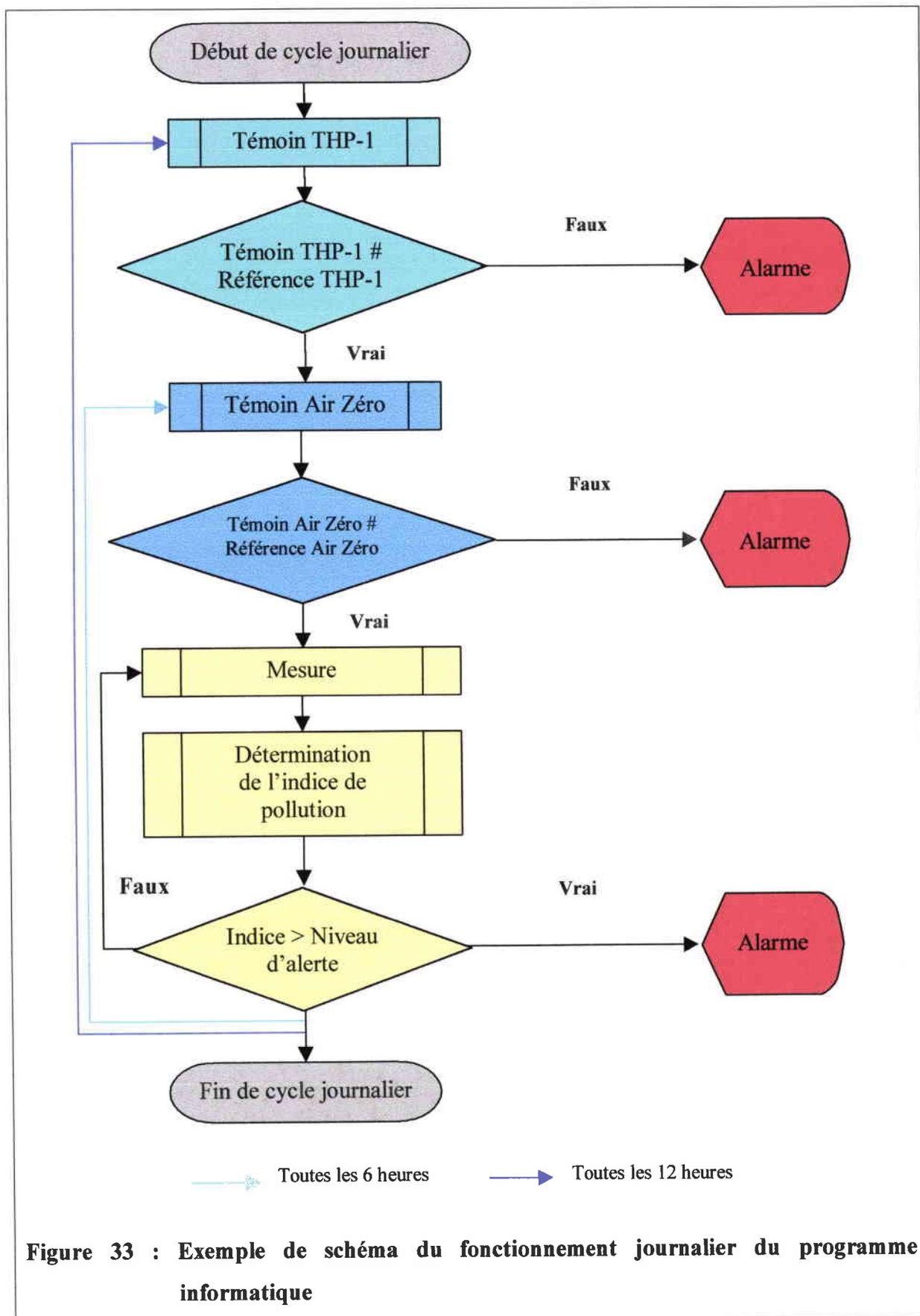


Figure 33 : Exemple de schéma du fonctionnement journalier du programme informatique

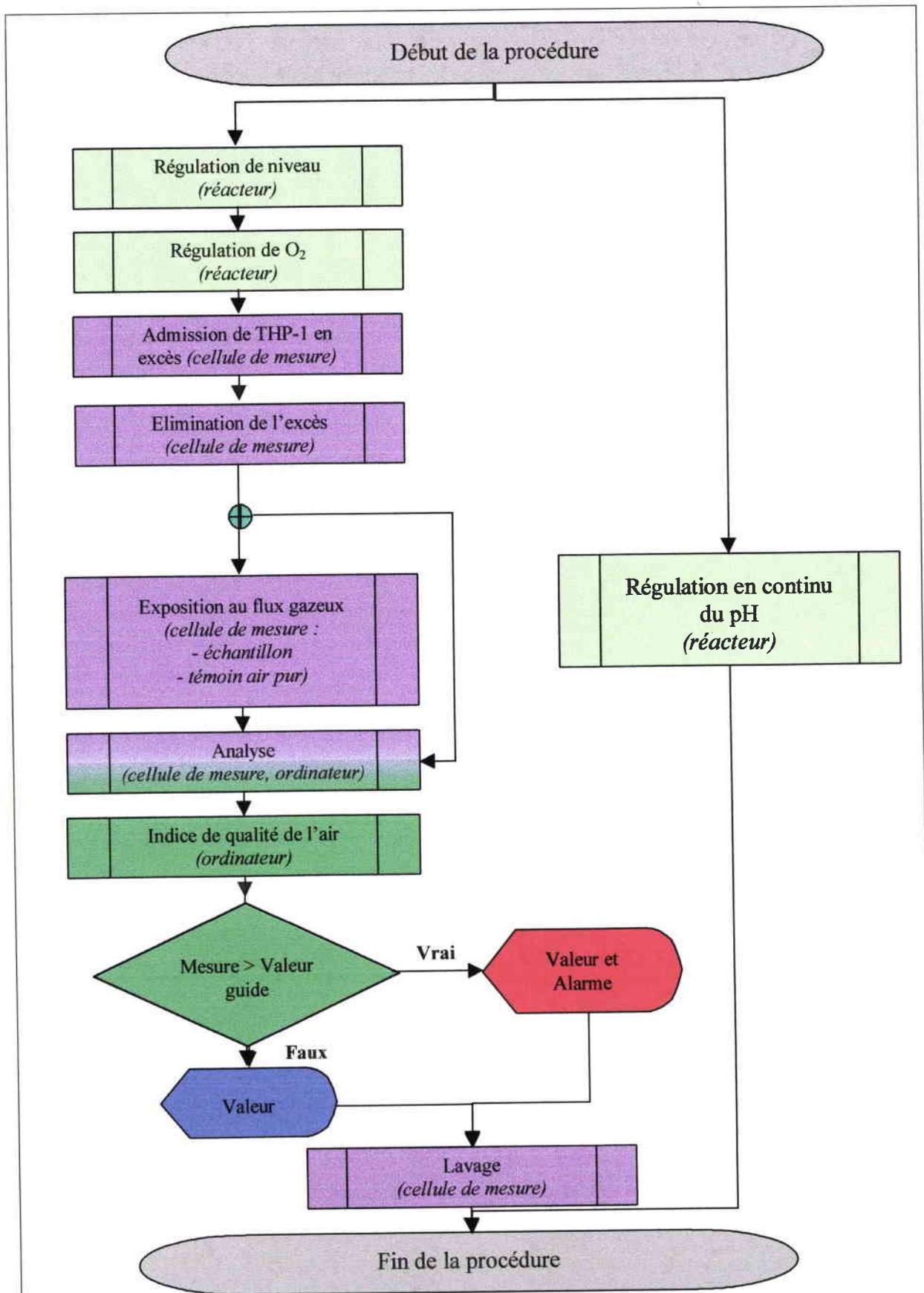


Figure 34 : Schéma du fonctionnement du logiciel pour la réalisation d'une mesure

4.2.2.8 Procédure d'analyse d'image

La méthode d'analyse développée pour le bioessai est insuffisante pour une utilisation en continu. En effet, il est difficile de prédire, et donc de réguler avec précision, le nombre et la position des cellules dans une suspension injectée automatiquement. De plus, la présence d'amas cellulaires épisodiques gêne considérablement l'analyse. Il a donc été nécessaire de compléter la procédure mise en place par un traitement supplémentaire visant à :

- prendre en compte les cellules tant qu'elles sont présentes dans le champ optique,
- éliminer les amas cellulaires,
- prendre en compte les cellules qui quittent un amas
- éliminer les cellules qui rencontrent un amas

Les premières étapes permettant la reconnaissance des macrophages ont été conservées. Une image est donc traitée toutes les 10 secondes. Chaque cellule ou amas est alors identifié par les coordonnées du carré dans lequel il s'inscrit (Figure 35). Les amas sont éliminés par un tri effectué sur la surface, la surface de ces derniers étant supérieure à celle des cellules isolées. Ceci conduit, à l'issue de la première acquisition d'image, à la création d'un enregistrement par cellule où figure ses coordonnées et sa surface.

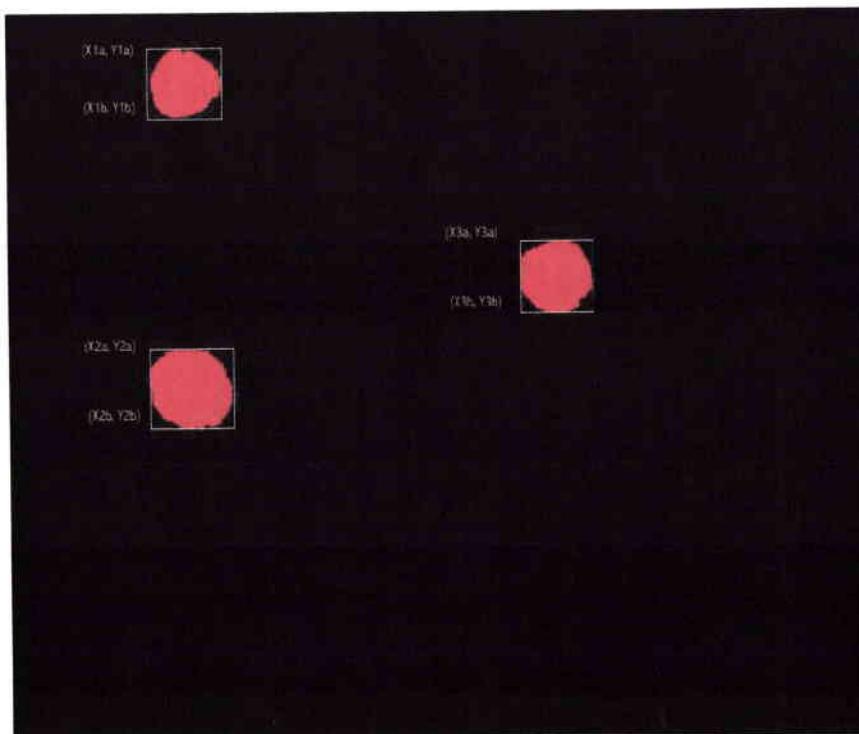


Figure 35 : Carrés dans lesquels s'inscrivent les cellules et coordonnées correspondantes

Lors des acquisitions suivantes, un traitement identique est réalisé puis les images superposées. Les traces des cellules peuvent alors s'inscrire dans un rectangle dont un des angles, au moins, a les mêmes coordonnées que le carré d'où il est issu (Figure 36). Chaque cellule est donc suivie et identifiée par comparaisons successives. L'enregistrement de la nouvelle surface de la trace est réalisé pour chaque itération.

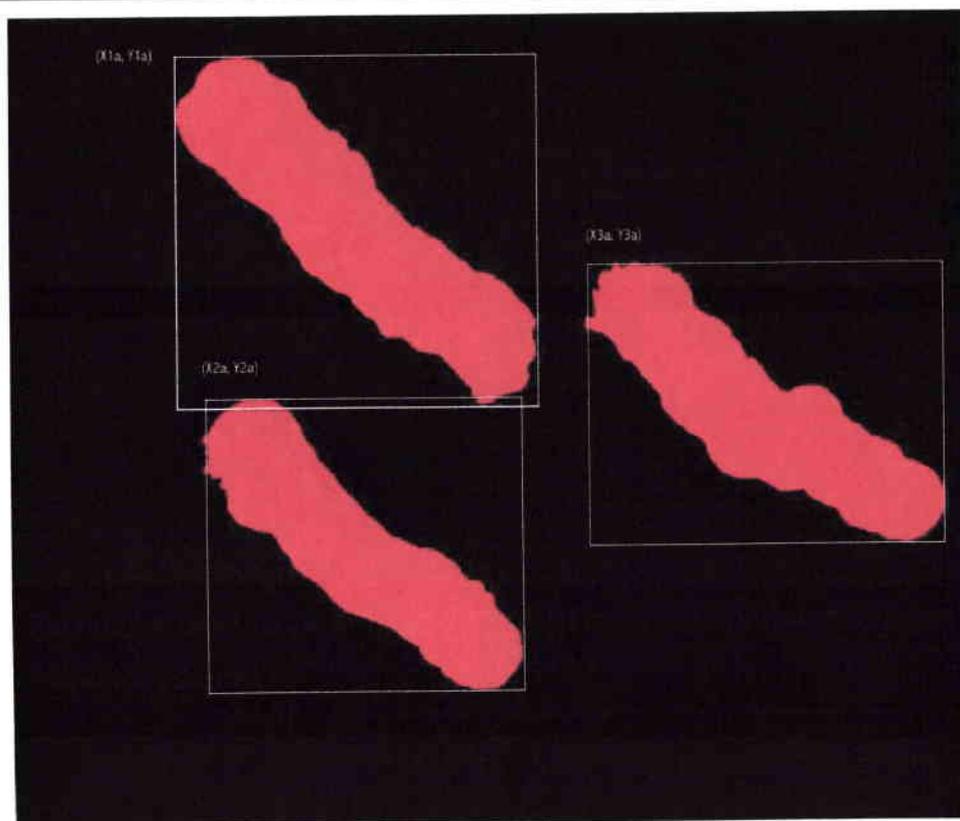


Figure 36 : Rectangles dans lesquels s'inscrivent les traces des cellules et coordonnées correspondantes

Par contre, lorsque qu'une cellule apparaît sur la zone de mesure, aucune coordonnée ne correspond à sa position. Un enregistrement est donc créé avec les coordonnées et la surface de la nouvelle cellule.

A l'issue de la phase d'acquisition, le temps de présence de chaque cellule est déterminé par le nombre de valeurs enregistrées pour sa surface multiplié par 10 secondes (durée séparant deux acquisitions d'images). La V_{AS} de chaque cellule est alors calculée pour son temps de présence dans la zone de mesure.

4.2.3 Détermination de la V_{AS} des cellules activées par le fMLP

Les différentes phases de développement du prototype abordées précédemment, conduisent à des modifications des procédures mises en œuvre pour le bioessai. De plus, l'automatisation du procédé implique la création d'une cellule de mesure intégrant les composants nécessaires aux transferts de fluides (suspension cellulaire, fMLP, air zéro, air ambiant). Il est donc nécessaire de calibrer le nouveau système de mesure en déterminant la V_{AS} de macrophages activés par 10^{-5} M de fMLP en présence d'air zéro.

4.2.3.1 La cellule d'exposition et la procédure de lavage

La cellule de mesure est chargée de recevoir une fraction de la suspension cellulaire. Celle-ci est répartie de façon à constituer une lame liquide au fond de la cellule d'exposition. Les macrophages y sont mis en présence d'un échantillon gazeux prélevé dans l'atmosphère par une pompe à membrane puis les macrophages sont stimulés par du fMLP à 10^{-5} M. Le temps d'analyse écoulé, les cellules sont évacuées par aspiration. Le compartiment doit ensuite être nettoyé pour éliminer les traces de fMLP, les phagocytes résiduels et les bactéries qui auraient pu se déposer dans la cellule de mesure au cours de la phase d'exposition à l'air ambiant. Enfin, la suspension cellulaire est renouvelée pour recommencer un nouveau cycle.

La cellule d'analyse doit donc posséder une voie d'exposition aérienne et les entrées / sorties pour la suspension cellulaire et le liquide de nettoyage (solution de pénicilline et streptomycine ; 30 secondes). De plus, le matériel biologique est maintenu à 37°C afin de préserver des conditions de survie optimales. La face inférieure est composée de polyéthylène transparent traité pour la culture cellulaire. La face supérieure est translucide munie d'un filtre vert augmentant les contrastes de l'image en noir et blanc et d'un diaphragme (Figure 37).

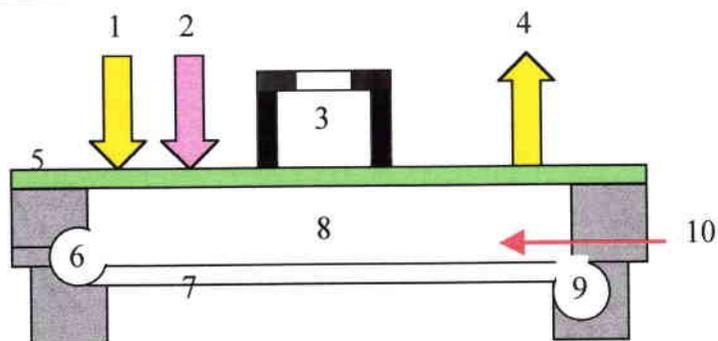


Figure 37 : Schéma de la première cellule d'exposition (1. Admission d'air ; 2. Solution de lavage ; 3. Diaphragme ; 4. Sortie d'air ; 5. Filtre vert ; 6. Admission de suspension cellulaire ; 7. Polyéthylène transparent ; 8. Chambre d'exposition ; 9. Evacuation des liquides ; 10. Admission de fMLP)

4.2.3.2 V_{AS} des cellules activées par le fMLP, optimisation de la cellule d'exposition et de la procédure de lavage

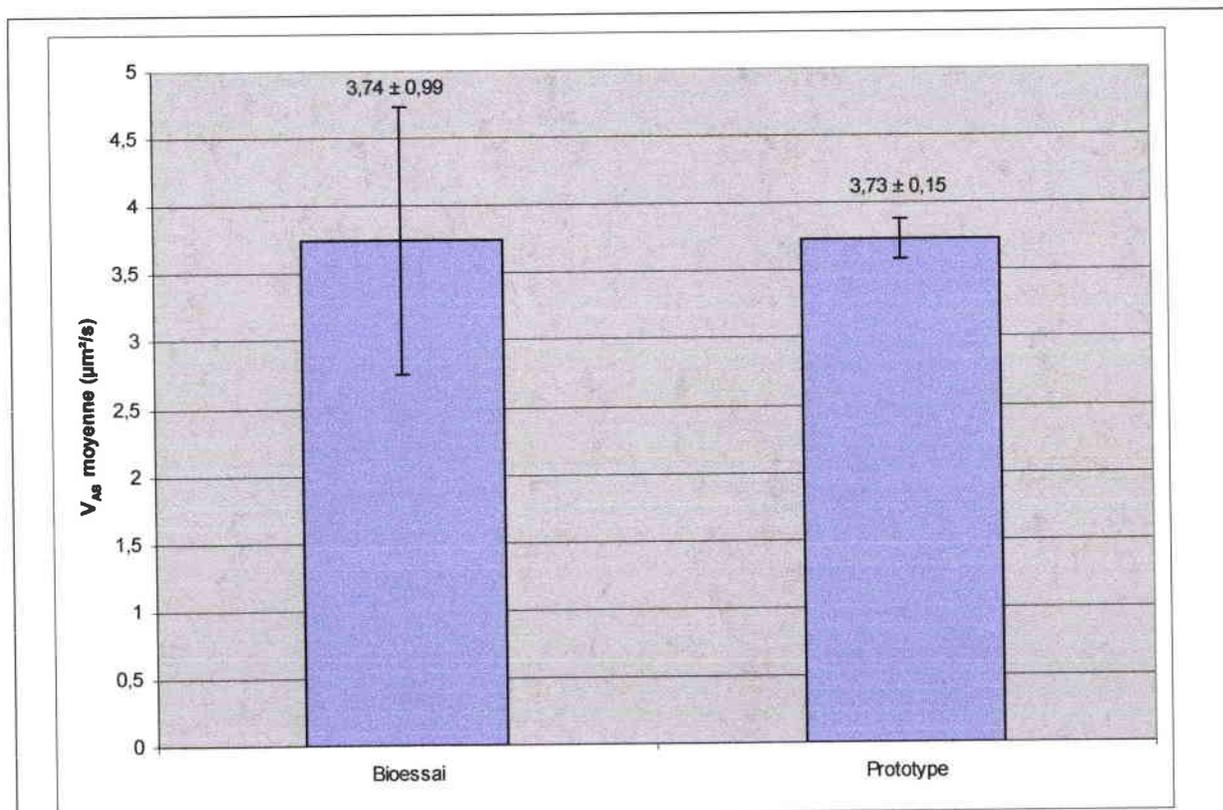


Figure 38 : V_{AS} des macrophages activés par 100 μl de fMLP à 10^{-5} M après 10 minutes d'exposition à de l'air purifié dans le cas du bioessai et du prototype de laboratoire (Nombre moyen d'essais par traitement : 30 ; Nombre moyen de cellules par essais pour le bioessai : 5 ; Nombre moyen de cellules par essais pour le prototype : 30. Test t de Student : pas de différence significative).

La Figure 38 représente la V_{AS} des cellules activées par du 100 μl de fMLP à 10^{-5}M dans le cas du bioessai et du prototype de laboratoire, soit respectivement des V_{AS} moyennes de $3,74 \mu\text{m}^2/\text{s} \pm 0,99$ et $3,73 \mu\text{m}^2/\text{s} \pm 0,15$.

La V_{AS} des macrophages activés n'est pas statistiquement différente dans les deux cas. Les procédures mises en œuvre dans la réalisation du prototype de laboratoire permettent donc de mesurer la V_{AS} des macrophages et de reproduire automatiquement les conditions de mesure manuelles du montage initial. Toutefois, la variabilité de la réponse est plus faible dans le cas du prototype ce qui peut résulter de l'augmentation du nombre de cellules prises en considération dans le calcul de la V_{AS} .

Si ce système s'est avéré suffisant en ce qui concerne l'exposition des cellules aux gaz et à l'acquisition de l'image, nous nous sommes rendus compte que la cellule d'analyse s'était montrée très sensible aux contaminations bactériennes et fongiques rendant obligatoire un nettoyage manuel quotidien. Cette sensibilité est le résultat de plusieurs phénomènes combinés :

1. L'air analysé, qui n'est pas filtré, véhicule bactéries et spores
2. Le milieu nutritif baignant les cellules est un milieu riche
3. La voie d'admission de suspension cellulaire présente des zones de stagnation inaccessibles au lavage
4. La solution de pénicilline / streptomycine est inadaptée aux contaminations fongiques.

La cellule d'exposition a donc été **modifiée** afin d'éliminer au mieux les zones de stagnation. L'admission de suspension cellulaire est placée à environ 5 mm au dessus de la lame de polyéthylène (Figure 39, Point 6).

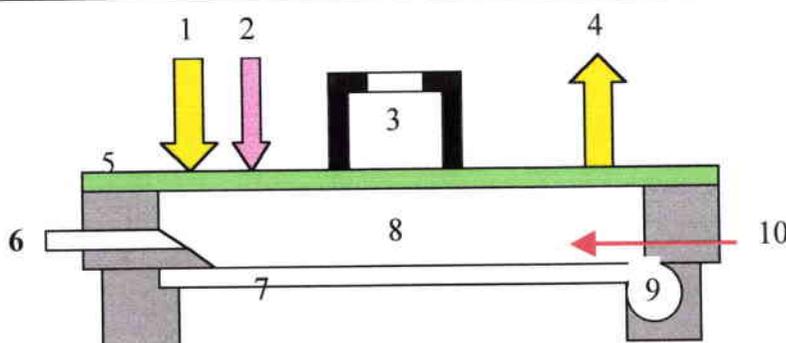
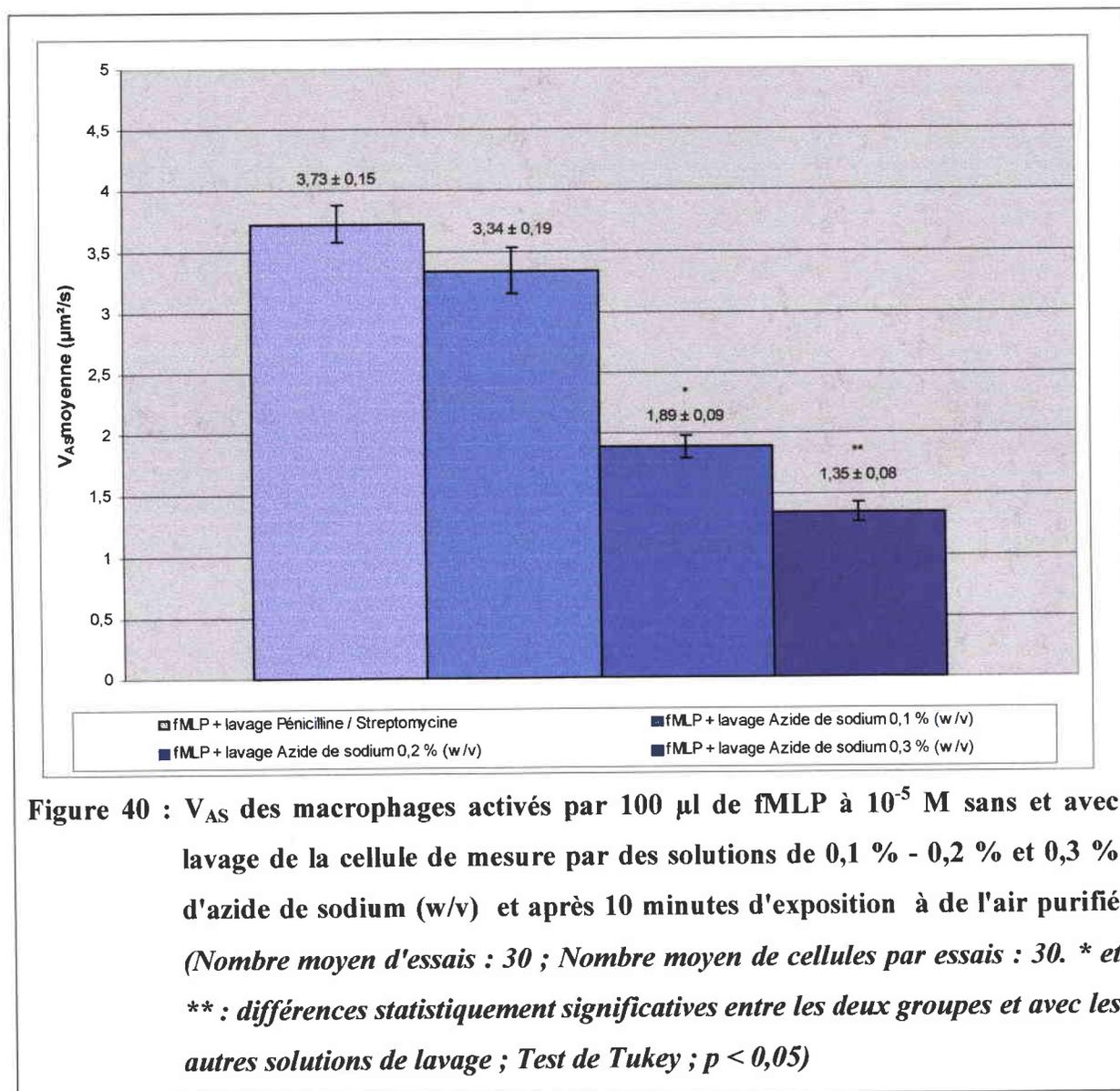


Figure 39 : Schéma de la seconde cellule d'exposition (1. Admission d'air ; 2. Solution de lavage ; 3. Diaphragme ; 4. Sortie d'air ; 5. Filtre vert ; 6. Admission de suspension cellulaire ; 7. Polyéthylène transparent ; 8. Chambre d'exposition ; 9. Evacuation des liquides ; 10. Admission de fMLP)

La solution de lavage est aussi remplacée par un bactéricide / fongicide à large spectre, soit une solution d'azide de sodium. Du fait de la toxicité de ce composé, les concentrations 0,1 % - 0,2 % - 0,3 % (w/v) ont été utilisées afin de déterminer l'influence de chacune d'elle sur la contamination de la cellule d'exposition mais aussi sur la mobilité cellulaire (Figure 40).



En ce qui concerne la contamination de la cellule d'exposition, seules les solutions à 0,2 % (w/v) et à 0,3 % (w/v) limitent les contaminations. Celles-ci persistent mais le nettoyage manuel de la cellule de mesure n'est nécessaire que toutes les 72 heures. Cependant, la V_{AS} des macrophages est altérée par la présence des résidus du lavage par l'azide de sodium. Elle est diminuée d'un facteur environ égal à 0,90 dans le cas d'une

solution à 0,1 % (w/v), 1,9 dans le cas d'une solution à 0,2 % (w/v) et à 2,7 pour une solution à 0,3 % (w/v).

La solution consistant à employer une solution d'azide de sodium à 0,2 % a donc été retenue comme meilleur compromis entre l'efficacité contre les contaminations par les micro-organismes et la perte de mobilité. Toutefois, la cellule d'exposition et la procédure de lavage ont aussi été modifiées afin d'améliorer l'élimination des résidus de lavage. Une arrivée supplémentaire est ainsi aménagée afin de rincer la cellule de mesure (durée de rinçage : 45 secondes) après le nettoyage avec l'azide de sodium 0,2 % (w/v) (Figure 41).

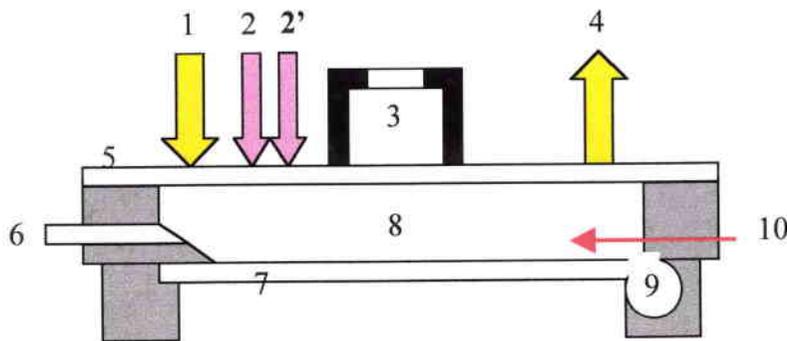


Figure 41 : Schéma de la seconde cellule d'exposition (1. Admission d'air ; 2. Solution de lavage ; 2'. Solution de rinçage ; 3. Diaphragme ; 4. Sortie d'air ; 5. Filtre vert ; 6. Admission de suspension cellulaire ; 7. Polyéthylène transparent ; 8. Chambre d'exposition ; 9. Evacuation des liquides ; 10. Admission de fMLP)

L'ensemble des modifications effectuées permet de restaurer la V_{AS} initiale (Figure 42).

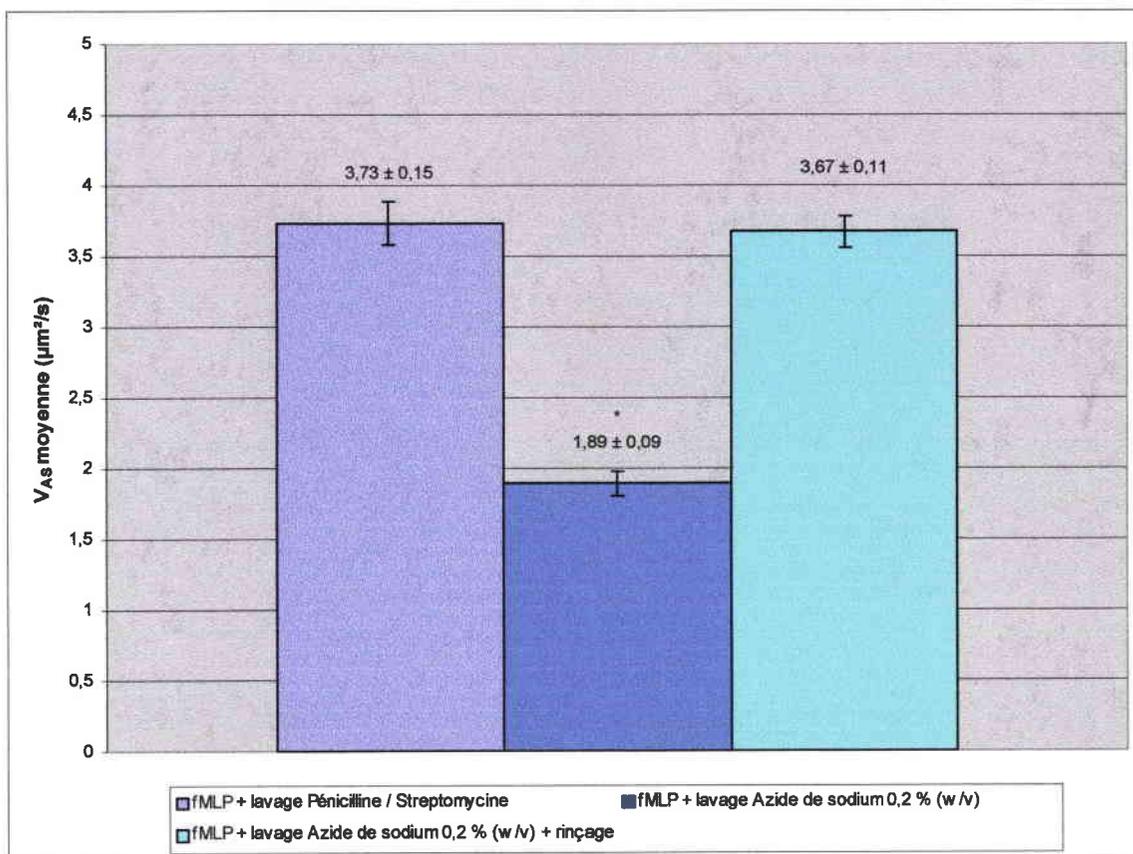


Figure 42 : V_{AS} des macrophages activés par 100 µl de fMLP à 10⁻⁵ M après lavage de la cellule de mesure par une solution de 0,2 % (w/v) d'azide de sodium, rinçage ou non par l'eau déminéralisée stérile et après 10 minutes d'exposition à de l'air purifié (*Nombre moyen d'essais : 30 ; Nombre moyen de cellules par essais : 30. * : différence statistiquement significative avec les autres procédures de lavage ; Test de Tukey ; p < 0,05*)

Les procédures mises au point pour le prototype de laboratoire permettent de **mesurer en continu la V_{AS} des macrophages pendant environ 72 heures sans opération de maintenance.** Dans ce cas, la V_{AS} mesurée est de l'ordre de **3,67 µm²/s ± 0,11** pour des macrophages activés par 100 µl de fMLP à 10⁻⁵ M après 10 minutes d'exposition à de l'air purifié.

4.3 MESURE DE LA QUALITE DE L'AIR AVEC LE PROTOTYPE DE LABORATOIRE :

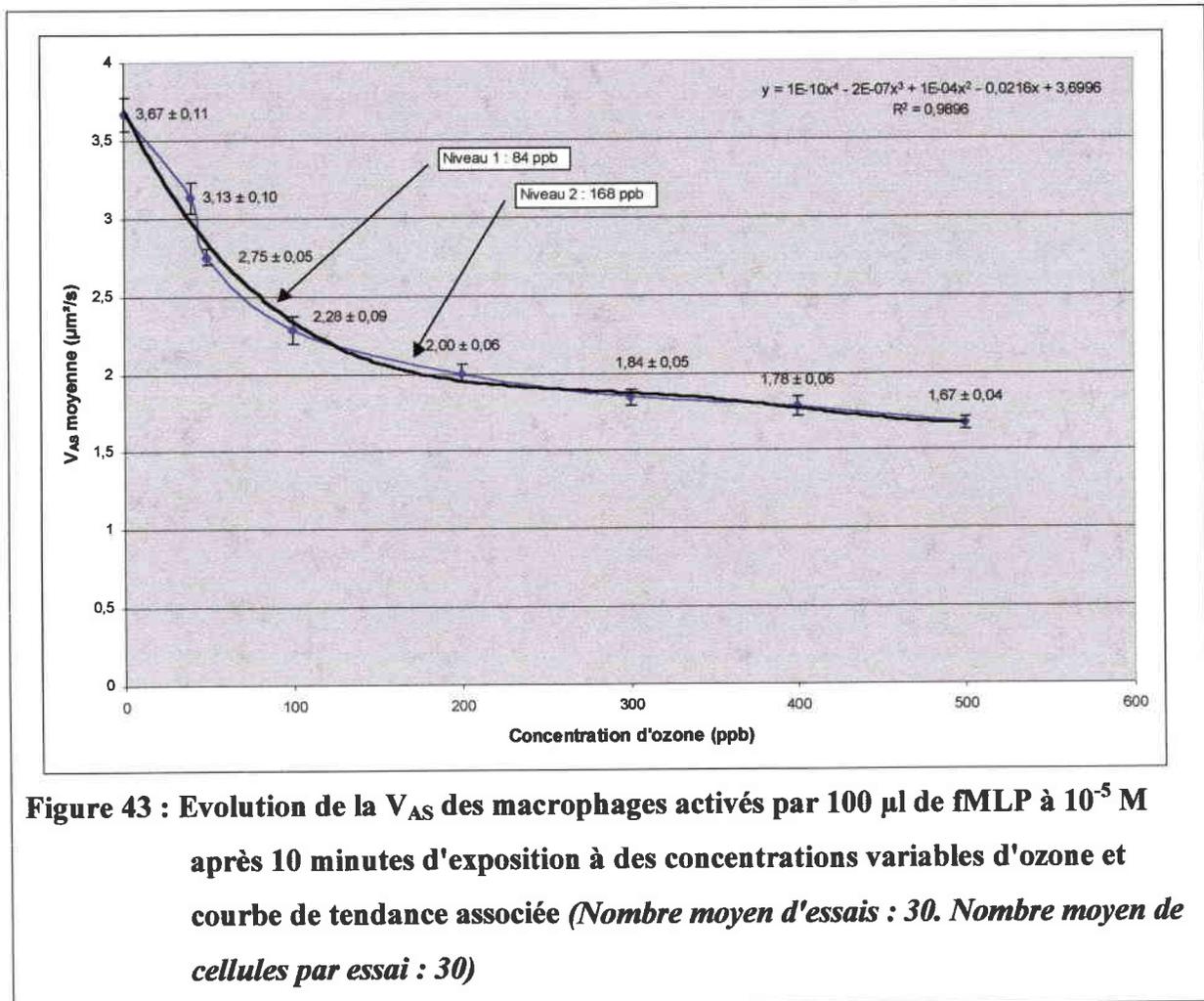
ESSAIS AVEC L'OZONE, LE MONOXYDE D'AZOTE ET UN MELANGE O₃ / NO_x

Le prototype de laboratoire réalisé, la détermination de la qualité de l'air par mesure de la mobilité cellulaire peut être effectuée. De même que pour le bioessai, les premiers essais seront réalisés avec de l'ozone. Le monoxyde d'azote, qui intervient dans le mélange NO_x des pollutions de type automobile, lui succèdera. Les pollutions par des gaz simples sont cependant rares en conditions naturelles. Afin de se rapprocher de ces dernières, un mélange ozone – NO_x, caractéristique des épisodes de pollutions estivales, sera utilisé.

D'autre part, le degré de pollution globale de l'air est déterminé pour fournir un élément de décision quant à la mise en œuvre des moyens d'alerte de la population. Cette décision doit être, dans la configuration actuelle du prototype, fondée sur l'analyse d'un échantillon unique, ce qui implique l'élaboration de règles de décision avec un risque d'erreur maîtrisé.

4.3.1 Essais avec l'ozone

De même que pour le montage de laboratoire, l'ozone est le premier polluant atmosphérique utilisé pour déterminer les capacités analytiques du prototype.



La Figure 43 décrit les variations de V_{AS} en fonction de concentrations variables d'ozone pour 10 minutes d'exposition, les cellules étant toujours stimulées par 100 µl de fMLP à 10⁻⁵ M.

Le graphe obtenu montre une relation dose – effet entre l'altération des capacités de déplacement de la cellule et le degré de pollution de l'air. Les variations de V_{AS} peuvent ainsi être mises en évidence entre 40 ppb et 500 ppb.

La V_{AS} des macrophages soumis à 0,5 ppm est environ deux fois plus élevée pour le prototype que le montage de laboratoire. Enfin, les écarts types correspondants sont plus faibles. Ceci conduit à penser que le mode de dépôt du fMLP par le biais d'un automate

permet de créer un gradient de diffusion plus homogène entraînant une amélioration de la mobilité cellulaire et la répétabilité de la mesure. D'autre part, les modifications apportées à la procédure de traitement d'image permettent de mieux prendre en compte le déplacement cellulaire et donc d'augmenter la sensibilité de détection.

Le comportement des macrophages en présence d'ozone peut être décrit par une relation polynomiale d'ordre 4 pour des concentrations variant entre 0 et 500 ppb. Le modèle obtenu est alors :

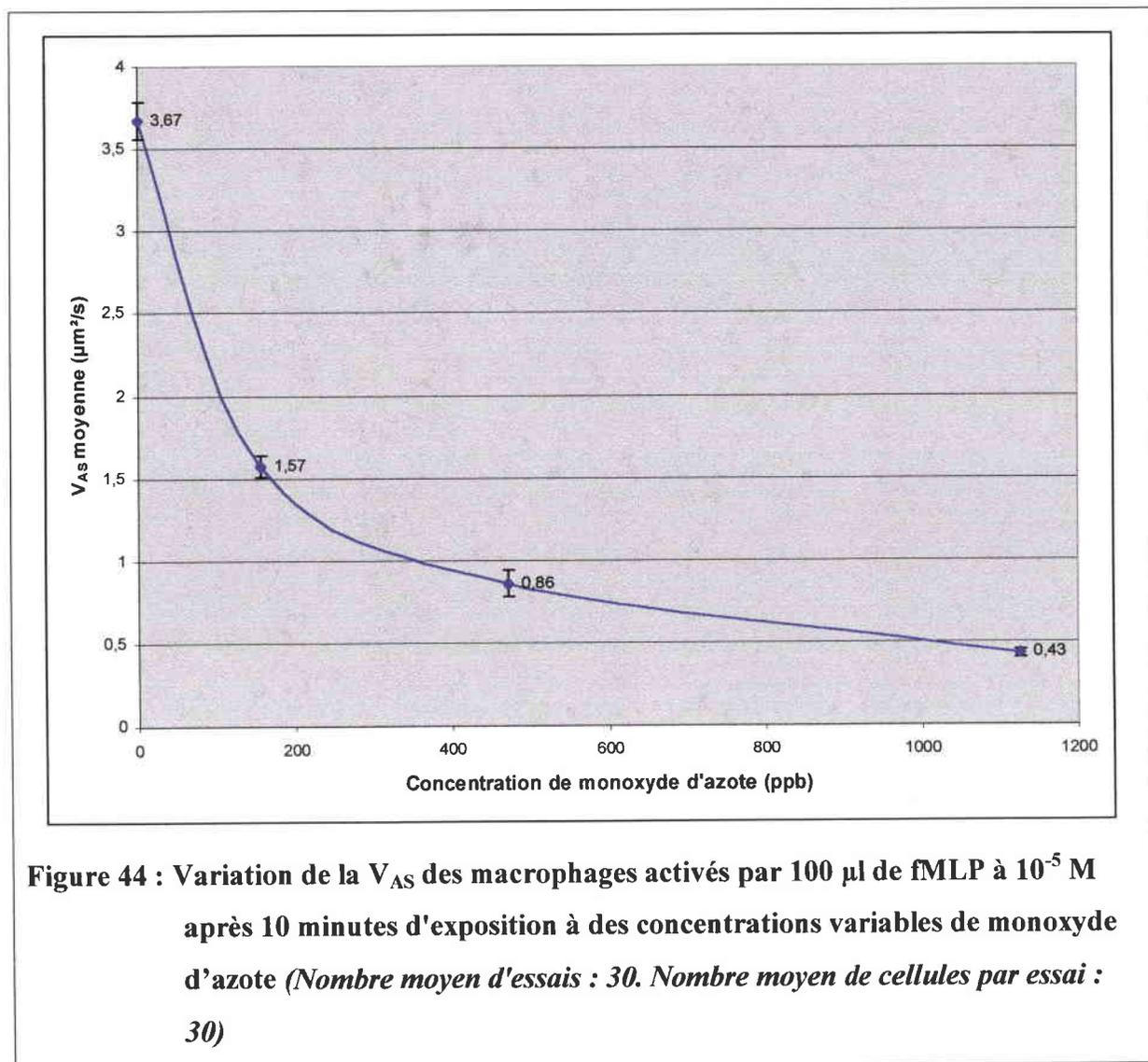
$$V_{AS} = 10^{-10} [O_3]^4 - 2.10^{-7} [O_3]^3 + 10^{-4} [O_3]^2 - 2,16.10^{-2} [O_3] + 3,69996$$

Enfin, les seuils de détection atteints sont proches des seuils d'alerte prévus à l'heure actuelle par la législation. En effet, le niveau de vigilance pour l'ozone est fixé à $180 \mu\text{g} / \text{m}^3$, soit 84 ppb, et le seuil d'information et de recommandations pour les populations est à $360 \mu\text{g} / \text{m}^3$, soit 168 ppb. Le prototype permet donc de répondre aux niveaux de pollution atmosphérique prévus par la législation en matière de pollutions ozonées.

Le prototype permet donc de déterminer la pollution de l'air par de l'ozone pour des concentrations comprises entre 40 ppb et 500 ppb.

4.3.2 Essai avec le monoxyde d'azote (NO)

Le second polluant atmosphérique mis en œuvre est le monoxyde d'azote.



La Figure 44 montre les variations de V_{AS} en fonction de concentrations variables de monoxyde d'azote pour 10 minutes d'exposition, les cellules étant toujours stimulées par 100 μl de fMLP à 10^{-5} M.

Le graphe obtenu montre une relation dose – effet entre l'altération du déplacement cellulaire et le degré de pollution de l'air. Les variations de V_{AS} peuvent ainsi être mises en évidence entre 157 ppb et 1125 ppb. D'autre part, la toxicité du NO est plus importante que

celle de l'ozone, la perte de mobilité étant, pour 157 ppm, environ 25 % plus faible dans le cas d'une exposition au NO.

En ce qui concerne la législation, celle-ci ne prend pas directement en compte le monoxyde d'azote. En effet, en milieu naturel, ce gaz oxydant tend à se recomposer en dioxyde d'azote. Seul le mélange NO / NO₂, appelé NOx, fait l'objet d'une norme fixant une valeur d'alerte à 200 µg / m³, soit 149 ppb en équivalent NO. La valeur la plus faible que nous avons testée est de 157 ppb avec une mobilité plus faible que pour l'ozone.

Le prototype permet de mettre en évidence les pollutions liées au monoxyde d'azote et de répondre aux exigences de la législation en vigueur.

4.3.3 Essai sur un mélange de polluants (O₃ : NO_x)

Après avoir mis en évidence l'influence de polluants atmosphériques isolés sur les macrophages alvéolaires, nous nous sommes intéressés à un mélange caractéristique des périodes de pollution estivales, soit un mélange composé d'ozone (500 ppb apportés avant l'introduction du NO afin de favoriser la formation de NO₂ dans le mélange) et de NO_x (157 ppb, plus faible concentration testée en gaz isolé). La Figure 45 présente la V_{AS} de macrophages stimulés par 100 µl de fMLP à 10⁻⁵ M mis en présence du mélange gazeux précédent et des polluants de départ pris isolément.

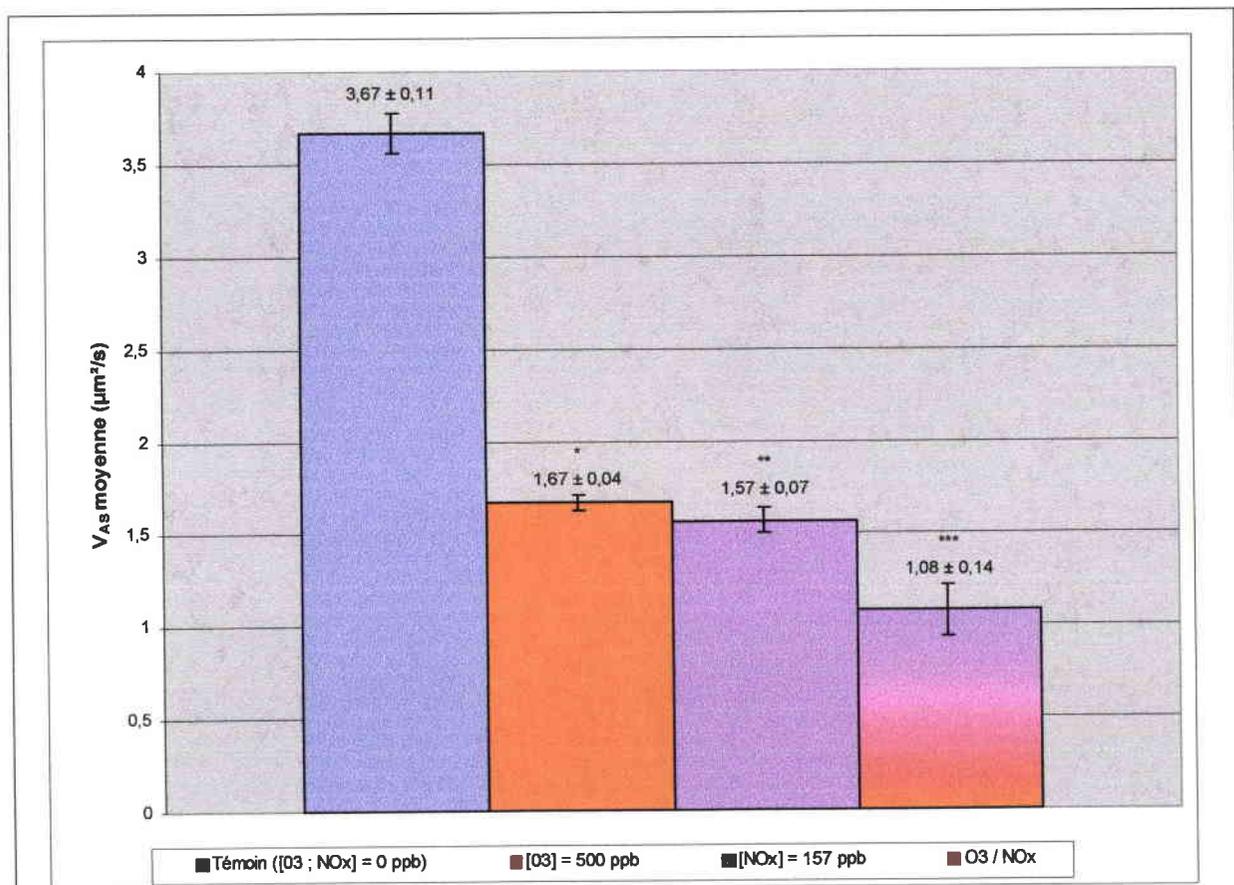


Figure 45 : V_{AS} des macrophages activés par 100 µl de fMLP à 10⁻⁵ M après 10 minutes d'exposition à de l'ozone, du NO et un mélange O₃ : NO_x, comparée à une série témoin (Nombre moyen d'essais : 30. Nombre moyen de cellules par essai : 30. *, ** et * : différences statistiquement significatives avec les autres expositions ; Test de Tukey ; p < 0,05))**

Le mélange gazeux $O_3 : NO : NO_2$ est toxique pour les cellules diminuant leur V_{AS} d'environ 70 %. D'autre part, le mélange des polluants a plus d'effet que les polluants isolés.

Le prototype permet de caractériser la présence de mélanges oxydants et d'évaluer l'effet des périodes de pollution estivales.

4.3.4 Utilisation du prototype pour juger de la qualité de l'air à partir d'un

échantillon unique

Nous avons montré précédemment que la mesure de la mobilité des macrophages permettait de déterminer la pollution globale de l'air. Cependant, pour que le prototype soit directement exploitable dans sa configuration actuelle, il était aussi nécessaire de considérer qu'un jugement est porté sur la qualité de l'air à partir d'un échantillon unique qu'il convient de comparer aux valeurs témoins ou valeurs limites.

4.3.4.1 Population de référence

Pour déterminer si l'air est pollué et adopter la conduite appropriée (avertissement de la Préfecture, des médias, ...). Il convient donc de savoir si la mesure effectuée traduit une différence réelle entre la mobilité « air pur » et celle de l'échantillon ou si elle est due uniquement au hasard de l'échantillonnage. D'un point de vue statistique, ceci revient à savoir si l'échantillon mesuré appartient à la population représentée par les témoins « air pur » ou s'il provient d'une population différente. Dans ce dernier cas, il faudra déterminer si un, au moins, des seuils d'alerte est dépassé.

Il est donc nécessaire de connaître les caractéristiques de la population de « référence ». La population de référence correspond au Niveau « 0 » de pollution est la série de témoins « Air pur » présentée Figure 43 qui présente un nombre d'essai suffisant au besoins statistiques (Nombre moyen d'essais : 30). La V_{AS} moyenne de cette population est de $3,67 \mu m^2 / s$ avec un écart type de $0,11 \mu m^2 / s$. Le test d'ajustement de Shapiro-Wilk ($p < 0,05$) permet de vérifier que la distribution suit la loi normale.

4.3.4.2 Détermination des règles de décision

Un prélèvement d'air sera considéré comme non pollué s'il appartient à la population du Niveau « 0 » donc si sa V_{AS} est égale à la V_{AS} de la population du Niveau « 0 ». L'hypothèse préférentielle à tester est alors :

$$H_0 : V_{AS \text{ échantillon}} = V_{AS \text{ moyenne Niveau « 0 »}} = 3,67 \mu\text{m}^2 / \text{s}$$

L'hypothèse alternative contre laquelle H_0 est testée, est que l'air est effectivement pollué. Autrement dit, dans ce cas, la V_{AS} de l'échantillon est strictement inférieure à celle de la population du Niveau « 0 », soit :

$$H_1 : V_{AS \text{ échantillon}} < V_{AS \text{ moyenne Niveau « 0 »}}$$

Si l'hypothèse H_0 est vraie, donc si l'air n'est pas pollué, un échantillon a une probabilité de 5 % de dépasser un seuil ' $S_{\text{Niveau « 0 »}}$ ' fixé par :

$$S_{\text{Niveau « 0 »}} = V_{AS \text{ moyenne Niveau « 0 »}} - u_{0,95} \cdot \sigma_{\text{Niveau « 0 »}}$$

avec : - $V_{AS \text{ moyenne Niveau « 0 »}} = 3,67 \mu\text{m}^2 / \text{s}$

- $u_{0,95} = 1,645$ (variable réduite de Gauss pour un risque unilatéral à droite de 5 %)

- $\sigma_{\text{Niveau « 0 »}} = 0,11 \mu\text{m}^2 / \text{s}$

D'où : $S_{\text{Niveau « 0 »}} = 3,49 \mu\text{m}^2 / \text{s}$

Si la V_{AS} d'un prélèvement est inférieure à $3,49 \mu\text{m}^2 / \text{s}$, l'air est donc pollué avec un risque d'erreur de 5 %.

D'autre part, les seuils d'alerte fixés par la législation correspondent, dans le cas de l'ozone, à 84 ppb ($180 \mu\text{g} / \text{m}^3$ sur 1 heure) pour le Niveau « 1 » (Vigilance) et à 168 ppb ($360 \mu\text{g} / \text{m}^3$ sur 1 heure) pour le Niveau « 2 » (Information et recommandations). Ces concentrations de polluants peuvent se traduire par des V_{AS} égales à environ $2,48 \mu\text{m}^2 / \text{s}$ pour le Niveau « 1 » et $2,02 \mu\text{m}^2 / \text{s}$ pour le Niveau « 2 » (Détermination des V_{AS} par calcul à partir du modèle établi au chapitre 4.3.1).

Nous retiendrons, pour l'ozone, que :

- Si la $V_{AS} > 3,49 \mu\text{m}^2 / \text{s}$, l'air n'est pas pollué
- Si la $V_{AS} < 3,49 \mu\text{m}^2 / \text{s}$, l'air est pollué (risque d'erreur 5 %)
- Si la $V_{AS} < 2,48 \mu\text{m}^2 / \text{s}$, le Niveau d'alerte « 1 » est atteint
- Si la $V_{AS} < 2,02 \mu\text{m}^2 / \text{s}$, le Niveau d'alerte « 2 » est atteint

CONCLUSIONS
et
PERSPECTIVES

5 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'objectif de ce travail était, dans un premier temps, de montrer la faisabilité d'un biocapteur basé sur la mesure de la mobilité des macrophages alvéolaires par analyse d'images.

Dans ce but , un programme adapté de reconnaissance d'images a été créé afin de mesurer la mobilité de « macrophages like cells » appartenant à la lignée cellulaire THP-1. Celle-ci est déterminée par une reconnaissance préalable des cellules puis par mesure de la variation de la surface couverte lors de leur déplacement appelée V_{AS} ou vitesse d'accroissement de surface exprimée en $\mu\text{m}^2 / \text{s}$. D'autre part, un système d'exposition spécifique a été développé. Après avoir vérifié l'influence de la préparation des cellules pour le bioessai, l'activation des macrophages par les LPS (lipopolysaccharides) et le fMLP (formyl Méthionine Leucine Phénylalanine) a permis de retenir ce dernier en tant qu'activateur de la mobilité cellulaire. En effet, le fMLP seul a permis d'obtenir une relation dose – réponse et un déplacement significatif sur la durée d'analyse. La V_{AS} mesurée pour la concentration de 10^{-5} M de fMLP après exposition à un flux d'air non pollué durant 10 minutes est alors de $3,74 \pm 0,99 \mu\text{m}^2 / \text{s}$. Enfin, l'exposition des macrophages activés (100 μl de fMLP à 10^{-5} M) à 0,5 ppm d'ozone pendant 10 minutes a conduit à une perte de mobilité d'un facteur égal à environ 4. La V_{AS} est alors de $0,87 \pm 0,39 \mu\text{m}^2 / \text{s}$.

Les résultats obtenus grâce au bioessai ont permis de réaliser un prototype du biocapteur atmosphérique. Ce dernier devant fonctionner en continu, il était nécessaire de produire des cellules en continu. Dans cette optique, la mise en culture de THP-1 en bioréacteur a été retenue. La réalisation de cultures discontinues successives a alors permis de déterminer la vitesse spécifique de croissance de la souche ($\mu_{\text{apparent max.}} = 0,0153 \text{ h}^{-1}$). Le passage en culture continue a fixé les paramètres de culture, à savoir la température (37°C), la vitesse d'agitation (40 tours / minutes), le pH (7,5), l'oxygénation du milieu (60 %), et le taux de dilution ($0,0153 \text{ h}^{-1}$) pour un ensemencement de $2,5 \cdot 10^5$ cellules / ml dans 750 ml de milieu de culture. Enfin, après avoir adapté le logiciel d'analyse d'image aux besoins d'un procédé autonome et après avoir intégré la gestion des automates, la calibration du prototype par l'ozone et le monoxyde d'azote a été effectuée. Les concentrations comprises entre 40 ppb et 500 ppb ont ainsi pu être mises en évidence par les modifications de mobilité consécutives à l'exposition. La variation de V_{AS} pour des cellules exposées à l'ozone peut alors être modélisée par l'équation polynomiale suivante :

$$V_{AS} = 10^{-10} [\text{O}_3]^4 - 2 \cdot 10^{-7} [\text{O}_3]^3 + 10^{-4} [\text{O}_3]^2 - 2,16 \cdot 10^{-2} [\text{O}_3] + 3,69996$$

En ce qui concerne le monoxyde d'azote, des concentrations comprises entre 157 ppb et 1125 ppb ont altéré la mobilité cellulaire de façon significative. Après avoir calibré le prototype pour deux gaz simples, un mélange caractéristique des pollutions estivales a été utilisé. Composés d'ozone et de NOx, il a provoqué une diminution de mobilité d'environ 70 %.

Le prototype permet donc de mettre en évidence les pollutions liées au monoxyde d'azote et à l'ozone en répondant aux exigences de la législation en vigueur.

Après avoir vérifié l'influence de l'ozone sur la mobilité, les répercussions physiologiques de ce polluant ont été abordées afin de mieux caractériser l'agression cellulaire. A la concentration de 0,5 ppm, l'ozone est cytotoxique avec une TL50 atteinte pour 28 minutes d'exposition. D'autre part, le calcium intracellulaire augmente ainsi après 5 minutes d'exposition puis plus lentement à partir de la 25^{ème} minute. Ces variations pourraient être corrélées à la libération de molécules de défense comme le peroxyde d'hydrogène ou le monoxyde d'azote. L'exposition de macrophages à 0,5 ppm d'ozone conduirait alors à une perte de mobilité et à l'activation des systèmes de protection de la cellule. Toutefois, la concentration d'ozone employée dépasse les concentrations atmosphériques rencontrées lors des épisodes usuels de pollution.

L'ensemble de ces résultats *permet d'envisager l'implantation du prototype au sein de réseaux de mesure de la qualité de l'air*. Il serait alors possible d'établir des corrélations entre les différents systèmes mis en œuvre. Il est toutefois nécessaire de réduire encore les phases de maintenance du prototype en diminuant notamment la fréquence de nettoyage de la cellule de mesure. L'utilisation du matériel biologique permettra alors :

- de **mesurer l'effet biologique des polluants**
- de **prendre en considération les synergies** possibles entre polluants
- de **mesurer l'effet de l'atmosphère dans sa globalité** en incluant les polluants non mesurés par les appareils physico-chimiques

Un indice de pollution atmosphérique globale basé sur les effets biologiques des gaz pourrait alors être élaboré avec la mise en place de nouveaux seuils d'alerte des populations. D'autre part, l'étude d'autres compartiments de l'environnement pourrait être envisagée avec la mise en œuvre du bioessai puis d'un biocapteur.

Enfin, il serait souhaitable de compléter ces développements par une étude épidémiologique afin de tenter d'établir des corrélations entre les variations de mobilité cellulaire au sein du biocapteur, les modifications physiologiques des phagocytes et la santé humaine. L'impact de la qualité de l'air sur le système immunitaire pourrait alors être appréhendé différemment.

LISTE

BIBLIOGRAPHIQUE

6 LISTE BIBLIOGRAPHIQUE

- 1 **Abbas A. K., Lichtman A. H. and Pober J. S., 1994**
Cellular and molecular immunology., Edition n°2, Phyladelphia , W.B. Saunder Co., 457 pages.
- 2 **Abou C.,1998**
Des lichens fixent l'uranium, *Biofutur*, 177, 13.
- 3 **Abrink M., Gobl A. E., Huang R., Nilsson K. and Hellman L.,1994**
Human cell lines U-937, THP-1 and Mono Mac 6 represent relatively immature cells of the monocyte-macrophage cell lineage, *Leukemia*, 8(9), 1579-1584.
- 4 **Absolom D. R.,1986**
Basic methods for the study of phagocytosis, *Method. Enzymol.*, 132, 95-180.
- 5 **Adamson I. Y. R., Prieditis H. and Vincent R.,1999**
Pulmonary toxicity of an atmospheric particulate sample is due to the soluble fraction, *Toxicol. Appl. Phamacol.*, 157(1), 43-50.
- 6 **ADEME, 1997**
La qualité de l'air en France 1994 - 1995 : zones urbaines, industrielles, rurales., Paris , ADEME, 150 pages.
- 7 **ADEME and INRET, 1995**
La pollution automobile et ses effets sur la santé : interrogations et propositions., Paris , ADEME, 45 pages.
- 8 **Aerts C., Tonnel A. B., Dutriez N. and Voisin C.,1979**
Sensibilité *in vitro* des macrophages alvéolaires aux composants gazeux de la fumée de tabac, *INSERM*, 84, 177-186.
- 9 **Aerts C. and Voisin C.,1981**
In vitro toxicity of oxygen and oxygen-paraquat association on alveolar macrophages surviving in gaz phase, *Bull. Europ. Physiopath. Resp.*, 17(suppl.), 145-151.
- 10 **Albert B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Watson J. D., 1994**
Molecular biology of the cell., Edition n°3, New York & London , Garland, 1294 pages.
- 11 **Allan R. B. and Wilkinson P. C.,1978**
A visual analysis of chemotactic and chemokinetic locomotion of human neutrophil leucocytes, *Exp. Cell. Res.*, 111, 191-203.

- 12 **Allisson A. C., Harington J. S. and Birbeck M.,1966**
An examination of the cytotoxic effects of silica on macrophages, *J. Exp. Med.*, **124**, 141-161.
- 13 **Anderson C. L., Looney R. J., Culp D. J., Ryan D. H., Fleit H. B., Utell M. J., Frampton M. W., Manganiello P. D. and Guyre P. M.,1990**
Alveolar and peritoneal macrophages bear three distinct classes of Fc receptors for IgG, *J. Immunol.*, **145(1)**, 196-201.
- 14 **Anonyme, 1993**
Allergie respiratoire, asthme , Environnement, Paris , Conseil supérieur d'hygiène publique.
- 15 **Anonyme, 1995**
Measurements of immission effects : measurements and evaluation of phytotoxic effects of ambient air pollutants (immission) with lichens mapping for assessment of air quality in : *VDI Handbuch Reinhaltung des Luft.* , Berlin, Verein Deutscher Ingenieure, 1995, 1-24.
- 16 **Anonyme, 1996**
Kit de détection por l'ozone et dossier pédagogique., World Wide Fund for Nature, 40 pages.
- 17 **Anonyme, 1997**
Pollution atmosphérique urbaine et santé urbaine, Paris , ARCO Chimie France.
- 18 **Aranyi C., Gardner D. E. and Huisingh J. L.,1981**
Evaluation of potential inhalation hazard of particulate silicious compounds by in vitro rabbit alveolar macrophage tests - Application to industrial particulates containing hazardous impurities, *ASTM STP*, **732**, 48-61.
- 19 **Arquès P., 1998**
La pollution de l'air : causes, conséquences, solutions., Aix-en-Provence , Edisud, 206 pages.
- 20 **Arsalane K., Gosset P., Vanhee D., Voisin C., Hamid Q., Tonnel A. B. and Wallaert B.,1995**
Ozone stimulates synthesis of inflammatory cytokines by alveolar macrophages *in vitro*, *Am. J. Cell. Mol. Biol.*, **13**, 60-68.
- 21 **Asta J., 1996**
Les lichens bioindicateurs de la pollution atmosphérique : exemples de cas étudiés en milieux perturbés dans les Alpes in : *L'écotoxicologie du compartiment aérien.* , Rouen, France, Instaprint SA, 1996, 191-196.
- 22 **Bach J.-F. and Lesavre P., 1993**
Immunologie., Edition n°3, Paris , Flammarion Cie, 378 pages.
- 23 **Baeuerle P. A., Rupec R. A. and Pahl H. L.,1996**
Reactive oxygen intermediates as second messengers of general pathogen response, *Pathol. Biol.*, **44(1)**, 29-35.

- 24 **Baqui A. A., Meiller T. F., Chon J. J., Turng B. F. and Falkler W. A. J.,1998**
Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor amplification of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha production in THP-1 human monocytic cells stimulated with lipopolysaccharide of oral microorganisms, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **5(3)**, 341-347.
- 25 **Barnes P. J.,1995**
Air pollution and asthma : molecular mechanism, *Mol. Med. Today*, **1(3)**, 149-155.
- 26 **Barthod C., Bonneau M. and Muller M., 1987**
Le dépérissement des forêts en Europe tempérée in : *Universalia 87.* , Paris, 1987
- 27 **Becker M. and Levy G. D.,1982**
Le dépérissement du chêne en forêt de Tronçais : les causes écologiques, *Ann. Sci. Forest.*, **39(4)**, 439-444.
- 28 **Becker M. and Levy G. D.,1988**
A propos du dépérissement des forêts : climat, sylviculture et vitalité de la sapinière vosgienne, *Rev. Forest. Fr.*, **40(5)**, 345-357.
- 29 **Becker S., Madden M. C., Newman S. L., Devlin R. B. and Koren H. S.,1991**
Modulation of human alveolar macrophage properties by ozone expure *in vitro*, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **110(3)**, 403-415.
- 30 **Becker S., Soukup J. M., Gilmour M. I. and Devlin R. B.,1996**
Stimulation of human and rat alveolar macrophages by urban air particulates : effects on oxidant radical generation and cytokine production, *Toxicol. Appl. Phamacol.*, **141**, 637-648.
- 31 **Beckett P. J., Boileau L. J., Padovan D. and Richardson D. H.,1982**
Lichens and mosses as monitors of industrial activity associated with uranium mining in northern Ontario (Canada), *Environ. Pollut.*, **4(B)**, 91-107.
- 32 **Belandria G. and Asta J.,1987**
Les lichens bioaccumulateurs : régression de la pollution fluorée dans la vallée de Roumanche (Isère, France), *Bull. Ecol.*, **18(3)**, 117.
- 33 **Belandria G., Asta J. and Garrec J. P.,1986**
Diminutions of fluorine contents in lichens due to regression of pollution in alpine valley (Maurienne, Savoie, France), *Rev. Ecol. Alp.*, **1**, 45-58.
- 34 **Berg T., Royset O. and Steinnes E.,1994**
Moss (*Hylocomium splendens*) used as biomonitor of atmospheric trace element deposition : estimation of uptake efficiencies, *Atmos. Environ.*, **29(3)**, 353-360.
- 35 **Bernstein D. I., Patterson R. and Zeiss C. R.,1982**
Clinical and immunologic evaluation of trimellic anhydride - and phtalic anhydride - exposed workers using a questionnaire with comparative analysis of enzyme-linked immunosorbent and radioimmunoassay studies, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **69(March)**, 311-318.

- 36 **Bertalanffy F. D.,1964**
Respiratory tissue : structure, hytophysiology, cytodynamics (I. Review and basic cytomorphology), *Int. Rev. Cytol.*, **16**, 233-328.
- 37 **Bhalla D. K.,1996**
Alteration of alveolar macrophage chemotaxis, cell adhesion, and cell adhesion molecule following ozone exposure of rats, *J. Cell. Physiol.*, **169**(3), 429-438.
- 38 **Blakley B. R. and Archer D. L.,1981**
The effect of lead acetate on the immune response in mice, *Toxicol. Appl. Phamacol.*, **52**, 245-254.
- 39 **Bolton D. C., Tarkington B. K., Zee Y. C. and Osebold J. W.,1982**
An *in vitro* system for studying the effects of ozone on mammalian cell cultures and viruses, *Environ. Res.*, **27**, 466-475.
- 40 **Bonneau M. and Landmann G.,1988**
De quoi la forêt est-elle malade ?, *La Recherche*, **205**(19), 1543-1553.
- 41 **Bonte J., 1995**
Les effets des polluants sur la végétation, Pau , CEDERE., 1-36
- 42 **Boren H. G.,1967**
Pathobiology of air pollutants, *Environ. Res.*, **1**, 178-197.
- 43 **Bouthillier L., Vincent R., Goegan P., Adamson I. Y. R., Bjarnason S., Stewart M., Guenette J., Potvin M. and Kumarathasan P.,1998**
Acute effects of inhaled urban particles and ozone - Lung morphology, macrophage activity, and plasma endothelin-1, *Am. J. Pathol.*, **153**(6), 1873-1884.
- 44 **Bouvarel P.,1984**
Le dépérissement des forêts attribué aux dépôts atmosphériques acides, *Rev. Forest. Fr.*, **36**(3), 173-180.
- 45 **Brain J. D.,1992**
Mechanisms, measurement, and signifiacnce of lung macrophage function, *Environ. Health Persp.*, **97**, 5-10.
- 46 **Briend-Sutren M. M., Le Maho S., Rommain M. and R L. C.,1990**
Glycosidase activities in alveolar macrophages from guinea pigs stimulated with *Klebsiella pneumoniae*, *Agent Actions*, **31**(3-4), 308-312.
- 47 **Brown D. H. and Beckett R. P.,1983**
Differential sensitivity of lichens to heavy metals, *Ann Bota*, **52**, 51-57.
- 48 **Brown D. H. and Brumelis G.,1996**
A biomonitoring method using the cellular distribution of metals in moss, *Sci. Total Environ.*, **187**, 153-161.

- 49 **Brown E. J., Newell A. M. and Gresham H. D.,1987**
Molecular regulation of phagocyte function : evidence of involvement of a guanosine triphosphate-binding protein in opsonin-mediated phagocytosis by monocytes, *J. Immunol.*, **11**(December), 3777-3782.
- 50 **Brunnquell F., Liébert P., Le Vaillant S. and Poïvet D.,1996**
Santé, les diesels en accusation, *Sci. Avenir*, **591**(Mai), 38-41.
- 51 **Bruns M. and Li F.,1994**
Concentration sur le terrain des composés organiques toxiques présents dans l'air, *Supelco*, **14**(2), 10-11.
- 52 **Burnett R. T., Smith-Doiron M., Stieb D., Cakmak S. and Brook J. R.,1999**
Effects of particulate and gaseous air pollution on cardiorespiratory hospitalizations, *Arch. Environ. Health*, **54**(2), 130-139.
- 53 **Bytnerowicz A., Manning W. J., Grosjean D., Chmielewski W., Dmuchowski W., Grodzinska K. and Godzik B.,1993**
Detecting ozone and demonstrating its phytotoxicity in forested areas of Poland - A pilot study, *Environ. Pollut.*, **80**(3), 301-305.
- 54 **Camefort H., 1977**
Morphologie des végétaux vasculaires : cytologie, anatomie, adaptations., Edition n°3, Paris , Doin Editeurs, 431 pages.
- 55 **Canning B., J, Hmieski R. R., Spannhake E. W. and Jakab G. J.,1991**
Ozone reduces murine alveolar and peritoneal macrophage phagocytosis : the rôle of prostanoids, *Am. J. Physiol.*, **261**(5), 227-282.
- 56 **Castillo F. and Greppin H.,1986**
Balance between anionic and cationic extracellular peroxidase activities of *Sedum album* leaves after ozone exposure. Analysis by high-performance liquid chromatography, *Plant Physiol.*, **68**, 201-208.
- 57 **Chang L. Y., Stockstill B. L., Menache M. G., Mercer R. R. and Crapo J. D.,1995**
Consequences of prolonged inhalation of ozone on F344/N rats : collaborative studies. Part VIII : morphometric analysis of structural alterations in alveolar regions, *Res. Rep. Health. Eff. Inst.*, **65**(Mar Pt 8-9), 3-39.
- 58 **Charnick S. B. and Lauffenburger D. A.,1990**
Mathematical analysis of cell-target encounter rates in three dimensions. Effect of chemotaxis, *Biophys. J.*, **57**(5), 1009-1023.
- 59 **Chiment F. F., Alsher R. and Hughes P. R.,1986**
Glutathione as an indicator of SO₂- induced stress in soybean root, *Environ. Exp. Bot.*, **26**, 147-152.
- 60 **Chiron M., Quenel P. and Zmirou D.,1997**
La pollution d'origine automobile et la santé publique, *Pollution Atmosphérique*, **153**, 41-55.

- 61 **Christman C. A. and Schwartz L. W.,1980**
Enhanced phagocytosis by alveolar macrophages induced by short-term ozone insult, *Environ. Res.*, **28**, 241-250.
- 62 **Cislaghi C. and Nimis P. L.,1997**
Lichens, air pollution and lung cancer, *Nature*, **387**, 463-464.
- 63 **Coffin D. L. and Gardner D. E.,1972**
Interaction of biological agents and chemical air pollutants, *Ann. Occup. Hyg.*, **15**, 219-234.
- 64 **Coffin D. L., Gardner D. E., Holzman R. S. and Wolock F. J.,1968**
Influence of ozone on pulmonary cells, *Arch. Environ. Health*, **16**(May), 633-636.
- 65 **Creutzenberg O., Bellman B., Klingebiel R., Heinrich U. and Muhle H.,1995**
Phagocytosis and chemotaxis of rat alveolar macrophages after a combined or separate exposure to ozone and carbon black, *Exp. Toxicol. Pathol.*, **47**, 202-206.
- 66 **Les bioindicateurs de la qualité de l'air** (6 novembre 1997 ; Rouen, France)
Bioindication et bioaccumulation lichénique sur l'autoroute du nord, Rouen, France, Les Ingénieurs Ecologues, 1997, 59-67
- 67 **Davies D. W., Walsh L. C., Hiteshew M. E., Menache M. G., Miller F. J. and Grose E. C.,1987**
Evaluating the toxicity of urban patterns of oxydant gases. I. An automated chronic gaseous animal inhalation exposure facility, *J. Toxicol. Env. Health*, **21**, 89-97.
- 68 **De Bakker A. J.,1989**
Effects of ammonia emission on epiphytic lichen vegetation, *Acta Bot. Neerl.*, **38**, 377-342.
- 69 **De Bruin M. and Hackenitz E.,1986**
Trace element concentrations in epiphytic lichens and bark substrate, *Environ. Pollut.*, **11**(B), 153-163.
- 70 **De Kermikri I.,1995**
L'appareil respiratoire a rude épreuve, *La Recherche*, **279**(26), 886-887.
- 71 **De Vries J., Hempenius R. A., Rietjens I. M., Alink G. M., Seemayer N. H., Heussen G. A. and Hadnagy W.,1994**
Ozone-induced lung toxicity : mediated by ozonide ?, *Toxicol. Lett.*, **72**(1-3), 243-246.
- 72 **Dearman R. J., Basketter D. A. and Limber I.,1992**
Variable effects of chemical allergens on serum IgE concentration in mice. Preliminary evaluation of a novel approach to the identification of respiratory sensitizers, *J. Appl. Toxicol.*, **12**(5), 317-323.
- 73 **Delannoy A. S., Hober D., De Bouzidi A. and Wattre P.,1997**
A macrophage - like cell model - for testing anti-CMV drugs, *Pathol. Biol.*, **45**(5), 341-394.

- 74 **Delaunois A., Gustin P., Nemmar A. and Ansay M.,1995**
Effets toxiques de l'ozone atmosphérique sur le système respiratoire : brève revue des connaissances actuelles, *Ann. Med. Vet.*, **104**, 31-36.
- 75 **Demers L. M. and Kuhn D. C.,1994**
Influence of mineral dusts on metabolism of arachadonic acid by alveolar macrophage, *Environ. Health Persp.*, **102(Suppl 10)**, 97-100.
- 76 **Denayer F.-O., 1995**
Caractérisation des sols pollués en Pb, Zn, et Cd dans la région Nord-Pas-de-Calais par les communautés bryophytiques, Metz, 47 pages
- 77 **Deruelle S.,1978**
Etude comparée de la sensibilité de trois méthodes d'estimation de la pollution atmosphérique, en utilisant les lichens comme indicateurs biologiques, dans la région de Nantes (Yvelines), *Rev. Bryol. Lychénol.*, **44(4)**, 429-441.
- 78 **Deruelle S.,1984**
L'utilisation des lichens pour la détection et l'estimation de la pollution par le plomb, *Bull. Ecol.*, **15(1)**, 1-6.
- 79 **Deruelle S.,1992**
Accumulation du plomb par les lichens, *Bull. Soc. Bot. Fr.*, **139(1)**, 99-109.
- 80 **Deruelle S. and Lallemand R., 1983**
Les lichens témoins de la pollution., Edition n°1, Paris , Vuibert Editeur, 108 pages.
- 81 **Devlin R. B., Horstman D. P., Gerrity T. R., Becker S. and Madden M. C.,1999**
Inflammatory response in humans exposed to 2.0 ppm nitrogen dioxide, *Inhal. Toxicol.*, **11(2)**, 89-109.
- 82 **Devlin R. B., McDonnel W. F., Mann R., Becker S., House D. E., Schreinemachers D. and Koren H. S.,1991**
Exposure of humans to ambient levels of ozone for 6.6 hours causes cellular and biochemical changes in the lung, *Am. J. Cell. Biol.*, **4**, 72-81.
- 83 **Devlin R. B., McKinnon K. P., Noah T., Becker S. and Koren H. S.,1994**
Ozone-induced release of cytokines and fibronectin by alveolar macrophages and airway epithelial cells, *Am. J. Physiol.*, **226(6 Pt 1)**, 612-619.
- 84 **Dobson F., 1992**
Lichens : an illustrated guide., Edition n°3, London , Richmond Publishing, 410 pages.
- 85 **Dormans J. A., Rombout P. J. and Van Loveren H.,1990**
Surface morphology and morphometry of rat alveolar macrophages after ozone exposure, *J. Toxicol. Env. Health*, **31(1)**, 53-70.
- 86 **Dowell A. R., Durham N. C., Lohrbauer L. A., Hurst D. and Lee S. D.,1970**
Rabbit alveolar macrophage damage caused by in vivo ozone inhalation, *Arch. Environ. Health*, **21**, 121-127.

- 87 **Driscoll K. E. and Vollmuth T. A.,1987**
Acute and subchronic ozone inhalation in the rabbit : response of alveolar macrophages, *J. Toxicol. Env. Health*, **21**(1-2), 27-43.
- 88 **Dron D. and Cohen de Lara M., 1995**
Pour une politique soutenable des transports, La documentation française., 327
- 89 **Dugas B., Mossalayi M. D., Damais C. and Kolb J.-P.,1995**
Nitric oxide production by human monocytes : evidence for a role of CD23, *Immunol. Today*, **16**(12), 574-580.
- 90 **Dumont S., 1989**
Culture et activation de macrophages humains en cellules cytotoxiques pour les tumeurs, en vue de transfert adoptif, Strasbourg, 153 pages
- 91 **Echaubard M., 1996**
Impact des polluants atmosphériques sur la faune et la diversité des populations *in* : L'écotoxicologie du compartiment aérien. , Rouen, France, Instaprint SA, 1996, 211-233.
- 92 **EEA, 1994**
Rapport CORINAIR 94, European Environmental Agency., 1-115
- 93 **Sixth ozone world congress (Washington, D C)**
Effects of atmospheric oxydants on phophatidylcholine liposomes, Washington, D C, International Ozone Association, 1983, 38-40
- 94 **Elstner E. F., Wagner E. F. and Schutz W.,1988**
Activated oxygen in green plants in relation to stress situation, *Curr. Top. Plant. Biochem. Physiol.*, **7**, 159-187.
- 95 **Falkenberg U., Lombard Y., Giaimis J., Poindron P. and Falkenberg F. W.,1992**
Phenotypic characterization of three long-term-cultured murine resident macrophage lines, *Res. Immunol.*, **143**, 25-32.
- 96 **Feder W. A.,1978**
Plants as bioassay system for monitoring atmospheric pollutants, *Environ. Health Persp.*, **27**, 139-147.
- 97 **Fiechter A. and Gmünder F. K., 1989**
Metabolic control of glucose degradation in yeast and tumor cells *in* : Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology. , Springer Verlag, 1989, 2-35.
- 98 **Fisher E. S. and Lauffenburger D. A.,1990**
Analysis of the effects of immune cell motility and chemotaxis on target elimination dynamics, *Math. Biosci.*, **98**(1), 73-102.
- 99 **Folinsbee L. J.,1992**
Human health effects of air pollution, *Environ. Health Persp.*, **100**, 45-56.

- 100 **Friedman M., Madden M. C., Samet J. M. and Koren H. S.,1992**
Effects of ozone exposure on lipid metabolism in human alveolar macrophages, *Environ. Health Persp.*, **97**, 95-101.
- 101 **Friedrich E. and Golsteyn R. M.,1998**
La cellule : entre adhérence et mouvement, *Biofutur*, **184**(December), 32-36.
- 102 **Fukushima T., Sekizawa K., Jin Y., Yamaya M., Sasaki H. and Takishima T.,1993**
Effects of beta-adrenergic receptor activation on alveolar macrophage cytoplasmic motility., *Am. J. Physiol.*, **265**(1 Pt 1), 67-72.
- 103 **Ganz T.,1993**
Macrophage function, *New Horizon*, **1**(1), 23-27.
- 104 **Gardner D. E.,1984**
Alteration in macrophage functions by environmental chemicals, *Environ. Health Persp.*, **55**, 343-358.
- 105 **Gardner D. E., Pfitzer E. A., Christian R. T. and Coffin D. L.,1971**
Loss of protective factor for alveolar macrophages when exposed to ozone, *Arch. Intern. Med.*, **127**(June), 1078-1084.
- 106 **Garrec J.-P.,1993**
Evolution de la pollution atmosphérique en France. De la pollution locale à la pollution globale, *Ann. Geo.*, **572**, 359-365.
- 107 **Les bioindicateurs de la qualité de l'air** (6 novembre 1997 ; Rouen, France)
L'approche de la qualité de l'air dans les pays en voie de développement, Rouen, France, Les Ingénieurs Ecologues, 1997, 91-99
- 108 **Pollution à l'échelle régionale et locale** (Cachan, France)
La bioindication végétale de la pollution atmosphérique : évolution actuelle et son utilisation, Cachan, France, 1993, 1-3
- 109 **Garrec J.-P. and Livertoux M.-H.,1997**
Bioindication végétale de l'ozone dans l'agglomération nancéenne durant l'été 1996, *Pollution Atmosphérique*, **156**, 78-87.
- 110 **Garrec J.-P. and Radnai F., 1996**
Economical study and mapping of air pollution by plant bioindicator, Nancy , Institut National de Recherche Agronomique., 1-12
- 111 **Garty J., KLoog N., Wolfson R., Cohen Y., Karnielli A. and Avni A.,1997**
The influence of air pollution on the concentration of mineral elements, on the spectral reflectance response and on the production of stress-ethylene in lichen *Ramalina duriaei*, *New Phytol.*, **137**, 587-597.

- 112 **Gaveriaux J.-P., 1996**
Les lichens et la bioindication de la qualité de l'air, *Bull. Soc. Bot. Nord Fr.*, **49**, 5-52.
- 113 **Georgen J.-L., 1992**
Culture continues d'hybridômes : études cinétiques et modélisation de l'influence de paramètres physico-chimiques sur la croissance, le décès et le métabolisme des cellules, Nancy, 210 pages
- 114 **Gery A., 1997**
Qualité des fumées d'incinération de déchets évaluée par mesure de la cytotoxicité sur cellules de type macrophagique, Metz, 108 pages
- 115 **10th world clean air congress : emissions and control** (may 28 - june 2 ; Espoo, Finland)
Utilisation d'un test biologique pour la surveillance des fumées d'incinération des déchets, Espoo, Finland, IUAPPA - FAPPS, 1995, 1-3
- 116 **Gery A., Martel H. and Walaert B., 1995**
Incineration des déchets : un test biologique pour évaluer la qualité des fumées, *TSM*, **5**, 431-434.
- 117 **Giaimis J., Lombard Y., Fonteneau P., Muller C. D., Rachel L., Makaya-Kumba M., Lazdins J. and Poindron P., 1993**
Both mannose and beta-glucan receptors are involved in phagocytosis of unopsonized, heat-killed *Saccharomyces cerevisiae* by murine macrophages, *J. Leukoc. Biol.*, **54**, 564-571.
- 118 **Giaimis J., Lombard Y., Makaya-Kumba M., Fontenneau P. and Poindron P., 1992**
A new and simple method for studying the binding and ingestion steps in the phagocytosis of yeasts, *J. Immunol. Methods*, **154**, 185-193.
- 119 **Giaimis J., Lombard Y., Poindron P. and Muller C. D., 1994**
Flow cytometry distinction between adherent and phagocytized yeast particles, *Cytometry*, **17**, 173-178.
- 120 **Gilmour M. I., Hmieleski R. R., Stafford E. A. and Jakab G. J., 1991**
Suppression and recovery of the alveolar macrophage phagocytic system during continuous exposure to 0,5 ppm ozone, *Exp. Lung Res.*, **17(3)**, 547-558.
- 121 **Gilmour M. I., Park P., Doerfler D. and Selgrade M. K., 1993**
Factors that influence the suppression of pulmonary antibacterial defenses in mice exposed to ozone, *Exp. Lung Res.*, **19(3)**, 299-314.
- 122 **Gilmour M. I., Park P. and Selgrade M. K., 1993**
Ozone-enhanced pulmonary infection with *Streptococcus zooepidemicus* in mice. The role of alveolar macrophage function and capsular virulence factors, *Am. Rev. Respir. Dis.*, **147(3)**, 753-760.

- 123 **Gilmour M. I. and Selgrade M. K.,1993**
A comparison of pulmonary defenses against Streptococcal infection in rats and mice following O₃ exposure : differences in disease susceptibility and neutrophil recruitment, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **123**, 211-218.
- 124 **Giovani C., Nimis P. L., Bolognini G., Padovani R. and Usco A.,1994**
Bryophytes as indicators of radiocesium deposition in northeastern Italy, *Sci. Total Environ.*, **157(1-3)**, 35-43.
- 125 **Glasgow J. E., Farrel B. E., Fisher E. S., Lauffenburger D. A. and Daniele R. P.,1989**
The motile response of alveolar macrophages. An experimental study using single-cell and cell population approaches, *Am. Rev. Respir. Dis.*, **139(2)**, 321-329.
- 126 **Gordon S., Fraser I., Nath D., Hughes D., Clarke S. and Dunn W.,1992**
Macrophages in tissues and *in vitro*, *Curr. Opin. Immunol.*, **4**, 25-32.
- 127 **Gradon L. and Podgorski A.,1995**
Displacement of alveolar macrophages in air space of human lung, *Med. Biol. Eng. Comput.*, **33(4)**, 575-581.
- 128 **Graedel T. and Crutzen P.,1996**
L'état de l'atmosphère, *Pour la Science*, **12(Hors Série Juin)**, 84-90.
- 129 **Grasso M. F., Clocchiatti R., Carrot F., Deschamps C. and Vurro F.,1999**
Lichens as bioindicators in volcanic areas : Mt Etna and Vulcano Island (Italy), *Environ. Geol.*, **37(3)**, 207-217.
- 130 **Grinet J. P. and Kedziora L., 1998**
Fonction épuratoire muco-cilliaire., Ch. de Denain, 20 pages.
- 131 **Gross P., De Treville R. T., Tolker T. B., Kaschak M. and Babyak M. A.,1969**
The pulmonary macrophage, *Arch. Environ. Health*, **18**, 174-185.
- 132 **Gruler H. and Bültmann B. D.,1983**
Analysis cell movement, *Blood Cells*, **10**, 61-77.
- 133 **Gryniewicz G., Poenie M. and Tsien R. Y.,1985**
A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties, *J. Biol. Chem.*, **260(6)**, 3440-3450.
- 134 **Hartman R. S., Lau K., Chou W. and Coates T. D.,1994**
The fundamental motor of the human neutrophil is not random : evidence for local non-markov movment in neutrophils, *Biophys. J.*, **67(December 1994)**, 2535-2545.
- 135 **Hawksworth D. L. and Rose F.,1970**
Qualitative scale for estimating sulfur dioxyde air pollution in England and Wales using epiphytic lichens, *Nature*, **227(5254)**, 145-148.

- 136 **Hawksworth D. L. and Rose F., 1976**
Lichen as pollution monitors., Edition n°1, London , Edward Arnold Publishers, 60 pages.
- 137 **Hocking W. G. and Golde D. W.,1979**
 The pulmonary-alveolar macrophage (First of two parts), *New Engl. J. Med.*, **301(11)**, 580-587.
- 138 **Hocking W. G. and Golde M. D.,1979**
 The pulmonary-alveolar macrophage (Second of two parts), *New Engl. J. Med.*, **301(12)**, 639-645.
- 139 **L'écotoxicologie du compartiment aérien (Tours, France)**
Evaluation de la pollution atmosphérique industrielle et urbaine à partir des données météorologiques de routine, Tours, France, Instaprint SA, 1996, 103-112
- 140 **Hoffard W. H., Marx D. H. and Brown H. D., 1995**
The health of southern forests, USDA Forest Service., 1-36
- 141 **Holian A., Kelley K., Raymond F. and Hamilton J.,1994**
 Mechanisms associated with human alveolar macrophage stimulation by particulates, *Environ. Health Persp.*, **102(Suppl. 10)**, 69-74.
- 142 **Holian A. and Scheule R. K.,1990**
 Alveolar macrophage biology, *Hosp. Parct.*, **15(December)**, 53-62.
- 143 **Holt G. R.,1996**
 Effects of air pollution on the upper aerodigestive tract, *Otolaryngol. Head Neck Surg.*, **114**, 201-204.
- 144 **Holtzhütter H. G., Wiesner R., Rathman J., Stösser R. and Kühn H.,1997**
 A kinetic model for the interaction of nitric oxide with mammalian lipoxygenase, *Europ. J. Biochem.*, **245**, 608-616.
- 145 **House R. V., Lauer L. D., Murray M. J., Ward E. C. and Dean J. H.,1985**
 Immunological studies in B6C3F1 mice following exposure to ethylene glycol monoethyl ether and its principal metabolite methoxyacetic acid, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **77**, 358-362.
- 146 **Howard J.,1997**
 Molecular motors : structural adaptations to cellular functions, *Nature*, **389**, 561-567.
- 147 **Howe W., Venables K. M., Topping M. D., Dally M. B., Hawkings R., Law S. and Newman Taylor A. J.,1983**
 Tetrachlorophthalic anhydride asthma : evidence for specific IgE antibody, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **71(N°1 - Part 1)**, 5-11.
- 148 **Hoyal C. R., Gozal E., Zhou H., Foldenauer K. and Forman H. J.,1996**
 Modulation of the rat alveolar macrophage respiratory burst by hydroperoxides is calcium dependant, *Arch. Biochem. Biophys.*, **326(1)**, 166-171.

- 149 **Huebert D. B., L'Hirondelle S. J. and Addison P. A.,1985**
The effects of sulfur dioxide on net CO₂ assimilation in the lichen *Evernia mesomorpha* Nyl.,
New Phytol., **100**, 643-651.
- 150 **Hynninen V.,1986**
Monitoring of airborne metal pollution with moss bags near an industrial source at Harjavalta,
Southwest Finland, *Ann. Bot. Fenn.*, **23**, 83-90.
- 151 **Irons R. D. and Neptun D. A.,1980**
Effects of the principal hydroxy - metabolites of benzene on microtubule polymerisation,
Arch. Toxicol., **45**, 297-305.
- 152 **Jakab G. J., Spannhake E. W., Canning B. J., Kleeberger S. R. and Gilmour M. L.,1995**
The effects of ozone on immune function, *Environ. Health Persp.*, **103**(Suppl. 2), 77-89.
- 153 **Jarry J.,1995**
Evaluation du risque santé, accidents industriels : quelles valeurs limites d'exposition, *Ref. INERIS*, **14**(November), 15-16.
- 154 **Johansson A., Lundborg M., Skold C., Lundahl J., Tornling G., Eklund A. and Camner P.,1997**
Functional, morphological, and phenotypical differences between rat alveolar and interstitial
macrophages, *Am. J. Cell. Biol.*, **16**(5), 582-588.
- 155 **La pollution atmosphérique dans les villes (25 avril 1997 ; Dijon)**
Synthèse sur les émissions de véhicules, Dijon, ISBE, 1997, 44-52
- 156 **Jovanic S., Carrot F., Deschamps C., Deschamps N. and Vukotic P.,1995**
A study of the air pollution in the surroundings of an aluminium smelter, using epiphytic
lichens, *J. Trace Microprobe*, **13**(4), 463-471.
- 157 **Jullien D.,1995**
Mesure et analyse : un passage obligé, *Ref. INERIS*, **14**(November), 1-4.
- 158 **Keller T.,1974**
The use of peroxydase activity for monitoring and mapping air pollution areas, *J. Pathol.*, **4**,
11-19.
- 159 **Keskinen H., Tupasela O., Tiikkainen U. and Nordman H.,1988**
Experiences of specific IgE in asthma due to diisocyanates, *Clin. Allergy*, **18**, 597-604.
- 160 **Kimura A. and Goldstein E.,1981**
Effect of ozone on concentrations of lysozyme in phagocytizing alveolar macrophages, *J.*
Infect. Dis., **143**(2), 247-251.
- 161 **Klan M. J., Adams D. O. and Lewis J. G.,1990**
Effects of exposure to benzene in vitro on murine mononuclear phagocyte system, *Toxicol.*
Appl. Pharmacol., **103**, 198-205.

- 162 **Knorst M. M., Kienast K., Gross S., Fries B., Müller-Quernheim J. and Ferlinz R.,1995**
Chemotactic response of human alveolar macrophages and blood monocytes elicited by exposure to sulfur dioxide, *Res. Exp. Med.*, **196**, 127-135.
- 163 **Knowles R. G.,1997**
Nitric oxide biochemistry, *Biochem. Soc. T.*, **25(3)**, 895-901.
- 164 **Kobzik L., Godleski J. J., Biondi A., O'Hara C. J. and Todd R. F.,1985**
Immunohistologic analysis of a human pulmonary alveolar macrophage antigen, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **37(2)**, 213-219.
- 165 **Koike E., Kobayashi T., Nelson D. J., McWilliam A. S. and Holt P. G.,1998**
Effect of ozone exposure on alveolar macrophage mediated immunosuppressive activity in rats, *Toxicol. Sci.*, **41(2)**, 217-223.
- 166 **Korzeniewski C. and Callewaert D. M.,1983**
An enzyme-release assay for natural cytotoxicity, *J. Immunol. Methods*, **64(3)**, 313-320.
- 167 **Krakauer T.,1985**
Biochemical characterization of interleukin-1 from a human monocytic cell line, *Journal of Leukoc Biol*, **37(5)**, 511-518.
- 168 **Kreyling W. G., Dirscherl P., Ferron G. A., Heilmann P., Josten M., Miaskowski U., Neuner M., Reitmeir P., Ruprecht L., Schumann G., Takenaka S., Ziesenis A. and Heyder J.,1999**
Health effects of sulfur-related environmental air pollution. III Nonspecific respiratory defences capacities, *Inhal. Toxicol.*, **11(5)**, 391-422.
- 169 **Air pollution control (Montreal)**
Establishing relationships between ambient ozone exposure dynamics and visible foliar injury response of tobacco cultivar, Montreal, IUAPPA, 1992, 1-12
- 170 **Kurano N., Leist C., Mesi F., Kurano S. and Fiechter A.,1990**
Growth behavior of CHO in a compact loop bioreactor : 2. Effects of medium components and waste products, *J. Biotechnol.*, **15**, 113-128.
- 171 **Lacase-Masmonteil T.,1992**
Les monoxydes (NO) synthases, *Med. Sci.*, **8(8)**, 843-845.
- 172 **Lacroix G. and Lambre C.,1998**
Ozone and the immune system, *Rev. Mal. Respir.*, **15(6)**, 699-711.
- 173 **Lambré C. R.,1995**
Les mécanismes biologiques : une retour aux sources biologiques de la toxicologie, *Ref. INERIS*, **14(November)**, 5-8.

- 174 **Landmann G., 1995**
Impact de la pollution atmosphérique diffuse sur la végétation forestière : les enseignements d'une décennie de recherches françaises in : L'écotoxicologie du compartiment aérien. , Rouen, France, Instraprint SA, 1995, 127-135.
- 175 **Laskin D. L., Pendino K. J., Punjabi C. J., Del Valle M. R. and Laskin J. D., 1994**
Pulmonary and hepatic effects of inhaled ozone in rats, *Environ. Health Persp.*, **102**(Suppl. 10), 61-64.
- 176 **Last J. A. and Kaisu T., 1980**
Mucus glycoprotein secretion by tracheal explants : effects of pollutants, *Environ. Health Persp.*, **35**, 131-138.
- 177 **Last J. A., Sun W. M. and Witschi H., 1994**
Ozone, NO and NO₂ : oxydant air pollutants and more, *Environ. Health Persp.*, **102**(Suppl. 10), 179-184.
- 178 **Lauffenburger D., 1983**
Measurement of phenomenological parameters for leukocyte motility and chemotaxis, *Agent Actions*, **12**, 24-53.
- 179 **Leblanc F. and De Sloover J., 1970**
Relations between industrialisation and distribution and growth of epiphytic lichen in Montreal, *Can. J. Bot.*, **48**, 1485-1496.
- 180 **Leclerc B., 1996**
L'état de l'atmosphère, *Pour la Science*, **12**(HS), 128-129.
- 181 **Lee F. J. and Bennett J. H., 1985**
Superoxyde dismutase : a possible protective enzyme against ozone injury in snap beans (*Phaseolus vulgaris* L.), *Plant Physiol.*, **69**, 1444-1449.
- 182 **Lehnert B. E., 1992**
Pulmonary and thoracic macrophage subpopulations and clearance of particles from the lung, *Environ. Health Persp.*, **97**, 17-46.
- 183 **Lippmann M., 1989**
Health effects of ozone : a critical review, *JAPCA*, **39**(5), 672-695.
- 184 **Lippo H., Poikolainen J. and Kubin E., 1995**
The use of moss, lichen and pine bark in the nationwide monitoring of atmospheric heavy metal deposition in Finland, *Water Air Soil Poll.*, **85**(4), 2241-2246.
- 185 **Lodenius M. and Tulisato E., 1984**
Environmental mercury contamination around a chlor-alkali plant, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **32**, 439-444.
- 186 **Loi n°96-1236 (1er Janvier 1997)**
France , Journal Officiel, 1997, 11-19.

- 187 **Loing E., 1994**
Test biologique de qualité des fumées d'incinération : choix et validation de protocoles d'exposition et d'analyses, Metz, France, 74 pages
- 188 **Lombard A., 1998**
 Surveiller l'air des grandes villes, *Environ. Mag.*, **1571**(October), 66.
- 189 **Lombard Y., Giaimis J., Makaya-Kumba M., Fonteneau P. and Poindron P., 1994**
 A new method for studying the binding and ingestion of zymosan particles by macrophages, *J. Immunol. Methods*, **174**, 155-165.
- 190 **Loose L. D., Silkworth J. B. and Warrington D., 1978**
 Cadmium-induced cytotoxicity, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **20**, 282.
- 191 **Loppi S., 1996**
 Lichens as bioindicators of air quality in Arezzo (Central Italy), *Ecologia Mediterranea*, **22**(1/2), 11-16.
- 192 **Lorenzini G. A., 1994**
 A miniaturized kit for ozone monitoring, *Appl. Biochem. Biotech.*, **48**, 1-4.
- 193 **Lorenzini G. A., 1995**
 An analysis of the distribution of surface ozone in Tuscany (Central Italy) with use of a new miniaturized bioassay with ozone sensitive tobacco seedlings, *Environ. Monit. Assess.*, **34**, 59-72.
- 194 **Lorenzini G. A., Nali C. and Biagioni M., 1995**
 Long range transport of photochemical ozone over the Tyrrhenian sea demonstrate by a new miniaturised bioassay with ozone sensitive tobacco seedlings, *Sci. Total Environ.*, **166**(1-3), 193-199.
- 195 **Maccia C. A., Bernstein I. L., Emmett E. A. and Brooks S. M., 1976**
In vitro demonstration of specific IgE in phtalic anhydre hypersensitivity, *Am. Rev. Respir. Dis.*, **113**, 701-704.
- 196 **MacMicking J., Xie Q.-W. and Nathan C., 1997**
 Nitric oxide and macrophage function, *Annu. Rev. Immunol.*, **15**, 323-350.
- 197 **Mage D. and Zali O., 1992**
Véhicules à moteur et pollution atmosphérique : impact sur la santé publique et mesures d'assainissement, OMS.
- 198 **Male D. K., 1994**
Immunologie : aide-mémoire illustré., Edition n°3, Bruxelles (Belgium) , De Boeck-Wesmael SA, 128 pages.
- 199 **Manninen S. and Huttunen S., 1995**
 Scots pine needles as bioindicators of sulfur deposition, *Can. J. Forest. Res.*, **25**(10), 1559-1569.

- 200 **Production of biologicals from animal cells in culture**
Potential and pitfalls using LDH release for evaluation of animal cell death kinetics,
 Butterworths, 1990, 1-5
- 201 **Martial A., 1991**
Etude du comportement d'hybridômes en réacteurs dans un milieu défini : effets des suppléments (acides aminés, insuline, lipides) en cultures discontinues et continues,
 Nancy (France), 339 pages
- 202 **Masse R., 1997**
 Inhaled toxicants from air pollution : mechanisms of action from experimental and human evidence, *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*, **181(3)**, 447-188.
- 203 **Maurice J., 1993**
Jugement statistique sur échantillon en chimie., Edition n°1, Paris , Europe Média Duplication SA, 406 pages.
- 204 **McAllen S. J., Chiu S. P., Phalen R. F. and Rasmussen R. E., 1981**
 Effect of *in vitro* ozone exposure on *in vitro* pulmonary alveolar macrophage mobility, *J. Toxicol. Env. Health*, **7**, 373-381.
- 205 **McElroy W. D., 1963**
 The chemistry of light emission, *Adv. Enzymol.*, **25**, 119.
- 206 **Mege J. L., Bongrand P. and Gougerot-Pocidallo M. A., 1990**
 Fonctions des cellules phagocytaires *in : Méthode en enzymologie.* , Paris, MEDSI McGraw Hill Publishing Compagny, 1990, Ch 13.
- 207 **Melhorn H., Seufert G., Schmidt A. and Kunert K. J., 1986**
 Effects of SO₂ and O₃ on production of antioxydants in conifers, *Plant Physiol.*, **82**, 336-338.
- 208 **Les bioindicateurs de la qualité de l'air** (6 november 1997 ; Rouen, France)
Biosurveillance des retombées atmosphériques d'hydrocarbures aromatiques polycycliques et de dioxynes / furanes par des bryophytes terrestres et des choux à feuilles frisées,
 Rouen, France, Les Ingénieurs Ecologues, 1997, 37-45
- 209 **Miller K., Hudspith B. N. and Meredith C., 1992**
 Secretary and accessory cell functions of the alveolar macrophage, *Environ. Health Persp.*, **97**, 85-89.
- 210 **Millon G., Deschamps-Latscha B. and Bach J. F., 1985**
 Les cellules phagocytaires *in : Immunologie.* , (Edition n°3) , Paris, Flammarion, 1985,.
- 211 **Mizutani Y. and Bonavida B., 1993**
 Overcoming CDDP resistance of human ovarian tumor cells by combinaison treatment with CDDP and TNF alpha, *Cancer*, **72**, 809-818.

- 212 **Mochitate K., Ishida K., Ohsumi T. and Miura T.,1992**
Long-term effects of ozone and nitrogen dioxide on the metabolism and population of alveolar macrophages, *J. Toxicol. Env. Health*, **35**, 247-260.
- 213 **Mohanty J. G., Jaffe J. S., Schulman E. S. and Raible D. G.,1997**
A highly sensitive fluorescent micro-assay of H₂O₂ release from activated human leukocytes using a dihydroxyphenoxazine derivative, *J. Immunol.*, **202**, 133-141.
- 214 **Moller D. R., Gallagher J. S., Bernstein D. I., Wilcox T. G., Burroughs H. E. and Bernstein I. L.,1985**
Detection of IgE-mediated respiratory sensitization in workers exposed to hexahydrophthalic anhydride, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **75**(6), 663-672.
- 215 **Moller W., Barth W., Pohlit W., Rust M., Siekmeir R., Stahlofen W. and Heyder J.,1996**
Smoking impairs alveolar macrophage activation after inert dust exposure, *Toxicol. Lett.*, **88**(1-3), 131-137.
- 216 **Les bioindicateurs de la qualité de l'air** (6 novembre 1997 ; Rouen, France)
Cartographie de la qualité de l'air de l'agglomération rouennaise à partir de l'observation de lichens, Rouen, France, Les Ingénieurs Ecologues, 1997, 27-34
- 217 **Murphy J. K., Hoyal C. R. and Livingstone F. R.,1995**
Modulation of the alveolar macrophage respiratory burst by hyperoxydes, *Free Radical Bio. Med.*, **18**(1), 37-45.
- 218 **Murr C., Baier-Bitterlich G., Fuchs D., Werner E. R., Esterbauer H., Pfeleiderer W. and Watcher H.,1996**
Effects of neopterin-derivates on H₂O₂-induced luminol chemiluminescence : mechanistic aspects, *Free Radical Bio. Med.*, **21**(4), 449-456.
- 219 **Mustafa M. G.,1990**
Biochemical basis of ozone, *Free Radical Bio. Med.*, **9**, 245-265.
- 220 **Nadaud S. and Soubrier F.,1996**
Molecular biology and molecular genetics of nitric oxide synthase genes, *Clin. Exp. Hypertens.*, **18**(2), 113-143.
- 221 **Nathan C. F.,1987**
Secretory products of macrophages, *J. Clin. Invest.*, **79**, 319-326.
- 222 **Navarri-Izzo F. and Izzo R.,1994**
Induction of enzyme activities and antioxidant production in barley plants as a result of SO₂ fumigation, *Plant Sci.*, **96**, 31-40.
- 223 **Newton-Nash D. K., Tonellato P., Swiersz M. and Abramoff P.,1990**
Assessment of chemokinetic behavior of inflammatory lung macrophages in a linear under-agarose assay, *J. Leukoc. Biol.*, **48**, 297-305.

- 224 **Niwa M., Kaiwai Y., Nakamura N. and Futaki S.,1997**
The structure of the promoter region for the rat inducible nitric oxide synthase gene, *Life Sci.*, **5**, 45-49.
- 225 **Nylander W.,1866**
Les lichens du jardin du Luxembourg, *Bull. Soc. Bot. Fr.*, **13**, 364-372.
- 226 **Oberson-Geneste D.,1995**
Ozone : une approche toxicologique, *Ref. INERIS*, **14**(November), p 7.
- 227 **Osswald W. K., Kraus R., Hippelli S., Benz B., Volpert R. and Elstner E. F.,1992**
Comparison of enzymatic activities of dehydroascorbic acid reductase, Glutathione reductase, catalase, peroxidase and superoxide dismutase of healthy and damaged spruce needle (*Pinea abies* (L.) Karst), *J. Plant. Physiol.*, **139**, 742-748.
- 228 **Ouchi N., Kihara S., Yamashita S., Higashiyama S., Nakagawa T., Shimomura I., Funahashi T., Kamada-Takemura K., Kawata S., Taniguchi N. and Matsuzawa Y.,1997**
Role of membrane-anchored heparin-binding epidermal growth factor and CD9 on macrophages, *Biochem. J.*, **15**(December), 923-928.
- 229 **Ozenda P. and Clauzade G., 1970**
Les lichens : étude biologique et flore illustrée., Edition n°1, Paris , Masson, 801 pages.
- 230 **Papais S., Fontan J., Lasserre-Bigorry A. and Pont V.,1998**
Analysis of photochemical pollution in France in 1996, *Pollution Atmosphérique*, **159**, 82-93.
- 231 **Pearson A. C. and Bhalla D. K.,1997**
Effects of ozone on macrophage adhesion *in vitro* and epithelial and inflammatory responses *in vivo* - The role of cytokines, *J. Toxicol. Env. Health*, **50**(2), 143-157.
- 232 **Pendino K. J., Gardner C. R., Laskin J. D. and Laskin D. L.,1993**
Induction of functionally active platelet-activating factor receptors in rat alveolar macrophages, *Journal of Biology and Chemistry*, **268**(26), 19165-19168.
- 233 **Pendino K. J., Shuler R. L., Laskin J. D. and Laskin D. L.,1994**
Enhanced production of interleukin-1, tumor necrosis factor-alpha, and fibronectin by rat lung phagocytes following inhalation of a pulmonary irritant, *Am. J. Cell. Mol. Biol.*, **11**(3), 279-286.
- 234 **Penuelas J., Ribas A., Gimeno B. S. and Filella I.,1999**
Dependance of ozone biomonitoring on meteorological conditions of different sites in Catalonia (NE Spain), *Environ. Monit. Assess.*, **56**(2), 221-224.
- 235 **Perez-Arellano J. L., Alcazar-Montero M. C. and Jimenez-Lopez A.,1990**
Alveolar macrophage : origin, kinetics and relationship with cells of the alveolo-interstitial region, *Allergol. Immunopath.*, **18**(3), 175-183.

- 236 **Petersen J. F., McIntire L. V. and Papoutsakis E. T.,1990**
Shear sensitivity of hybridoma cells in batch, fed-batch and continuous culture, *Biotechnol. Prog.*, **6**, 114-120.
- 237 **Philips H. J., 1973**
Dye exclusion test for cell viability in : *Tissue culture. Methods and applications.* , New York, 1973, 406-408.
- 238 **Pick E. and Keisari Y.,1980**
A simple colorimetric method for measurement of hydrogen peroxyde produced by cells in culture, *J. Immunol. Methods*, **38**, 161-170.
- 239 **Pinton H., 1991**
Cultures perfusées d'hybridômes dans un réacteur agité avec recyclage externe des cellules : mise au point, cinétique et performances, Nancy, France, 274 pages
- 240 **Poissant L. and Koprivnjak J.-F.,1996**
Concentrations de quelques composés organiques semi-volatils dans l'air et la précipitation en milieu rural (Villeroy, Québec) et leur dynamique environnementale, *Vecteur Environnement*
- 241 **Polzer G., Lind I., Mosbach M., Schmidt A. and Seitel A.,1994**
Combined influence of quartz dust, ozone and NO₂ on chemotactic mobility, release of chemotactic factors and other cytokines by macrophages in vitro, *Toxicol. Lett.*, **72(1-3)**, 35-43.
- 242 **Popescu M., Blanchard J.-M. and Carré J., 1998**
Analyse et traitement physicochimique des rejets atmosphériques industriels : émissions, fumées odeurs et poussières., Paris , Lavoisier, 854 pages.
- 243 **Prasad S. B., Rao V. S., Mannix R. C. and Phalen R. F.,1988**
Effect of pollutant atmospheres on surface receptors of pulmonary macrophages, *J. Toxicol. Env. Health*, **24(3)**, 385-402.
- 244 **Prokhorova S., Patel N. and Laskin D. L.,1998**
Regulation of alveolar macrophage and type II cell DNA synthesis : effects of ozone inhalation, *Am. J. Physiol.*, **19(6)**, L1200-L1207.
- 245 **Qinghong L. and Brakenhielm S.,1995**
A statistical approach to decompose ecological variation, *Water Air Soil Poll.*, **85**, 1587-1592.
- 246 **Quesnel P., Le Goaster C., Cassadou S., Eilstein D., Filleul L., Pascal L., Pouvost H., Saviuc P., Zeghnoun A., Le Tertre A., Medina S. and Jouan M.,1997**
Surveillance des effets sur la santé de la pollution atmosphérique en milieu urbain : étude de faisabilité dans 9 villes françaises. Objectifs et principes, *Pollution Atmosphérique*, **156**, 88-95.

- 247 **Quevauviller P., Herzig R. and Muntau H.,1996**
 Certified reference material of lichen (CRM 482) for the quality control of trace element biomonitoring, *Sci. Total Environ.*, **187(2)**, 143-152.
- 248 **Racher A. J., Looby D. and Griffiths J. B.,1990**
 The use of LDH release to assess changes in culture viability, *Cytotechnol.*, **3**, 301-307.
- 249 **Raddassi K., Berthon B., Petit J. F. and Lemaire G.,1994**
 Role of calcium in the activation of mouse peritoneal macrophage : induction of NO synthase by calcium ionophores and thapsigargin, *Cell. Immunol.*, **153**, 443-455.
- 250 **Reitzer L. J., Wice B. M. and Kennel D.,1979**
 Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells, *J. Biol. Chem.*, **254**, 2669-2676.
- 251 **Reynolds H. Y.,1989**
 The pulmonary hist defenses : state of the art, *CHEST*, **95(3)**, 223-230.
- 252 **Ribas A., Filella I., Gimeno B. S. and Penuelas J.,1998**
 Evaluation of tobacco cultivars as bioindicators and biomonitors of ozone phytotoxic levels in Catalonia, *Water Air Soil Poll.*, **107(1-4)**, 347-365.
- 253 **Rithidech K., Hotchkiss J. A., Griffith J. A., Henderson R. F. and Brooks A. L.,1990**
 Chromosome damage in rat pulmonary alveolar macrophages following ozone inhalation, *Muta. Res.*, **241(1)**, 67-73.
- 254 **Roitt I., Brostoff J. and Male D., 1997**
Immunologie., Edition n°4, Paris , De Boeck Université, 405 pages.
- 255 **Rosen G. M., Pou S., Ramos C. L., Cohen M. S. and Britigan B. E.,1995**
 Free radicals and phagocytic cells, *FASEB J.*, **9**, 200-209.
- 256 **Rosenthal G. L. and Snyder C. A.,1987**
 Inhaled benzene reduces aspects of cells - mediated tumor surveillance in mice, *Appl. Toxicol.*, **88**, 35-43.
- 257 **Ross H. B.,1987**
 On the use of mosses (*Hylocomium splendens* and *Pleurozium schreberi*) for estimating atmospheric trace metal deposition, *Water Air Soil Poll.*, **50**, 63-76.
- 258 **Rossi F., Bellavite P., Berton G., Grzeskowiak M. and Papini E.,1985**
 Mechanism of production of toxic oxygen radicals by granulocytes and macrophages and their function in the inflammatory process, *Path. Res. Pract.*, **180**, 136-142.
- 259 **Rubbo H., Radi R., Trujillo M., Telleri R., Kalyanaraman B., Barnes S., Kirk M. and Freeman B. A.,1994**
 Nitric oxide regulation of superoxyde and peroxynitrite-dependent lipid peroxydation, *J. Biol. Chem.*, **269(42)**, 26066-26075.

- 260 **Rühlin A., Rasmussen L., Pilegaard K., Mäkinen A. and Steinnes E., 1987**
Survey of atmospheric heavy metal deposition in the Nordic countries in 1985., Göteborg ,
 Graphic Systems A B, 44 pages.
- 261 **Schlesinger R. B., 1987**
 Effects of intermittent inhalation exposure to mixed atmospheres of NO₂ and H₂SO₄ on
 rabbit alveolar macrophage, *J. Toxicol. Env. Health*, **22**(3), 301-312.
- 262 **Schlesinger R. B., 1987**
 Intermittent inhalation of nitrogen dioxide : effects on rabbit alveolar macrophages, *J.*
Toxicol. Env. Health, **21**(1-2), 127-139.
- 263 **Schlesinger R. B., 1989**
 Comparative toxicity of ambient air pollutants : some aspects related to lung defense,
Environ. Health Persp., **81**(May), 123-128.
- 264 **Les bioindicateurs de la qualité de l'air** (6 novembre 1997 ; Rouen, France)
 "Biomonitoring actif" utilisant les lichens en Allemagne, Rouen, France, Les Ingénieurs
 Ecologues, 1997, 47-57
- 265 **Schwartz L. W. and Christman C. A., 1979**
 Alveolar macrophage migration. Influence of lung lining material and acute lung insult, *Am.*
Rev. Respir. Dis., **120**, 429-439.
- 266 **Seaton A., MacNee W., Donaldson K. and Godden D., 1995**
 Particulate air pollution and acute health effects, *Lancet*, **345**(July), 176-178.
- 267 **Seljelid R. and Budsund L. T., 1993**
 The biology of macrophages : II Inflammation and tumors, *Eur. J. Haematol.*, **52**, 1-12.
- 268 **Shellito J., Esparza C. and Armstrong C., 1987**
 Maintenance of the normal rat alveolar macrophage cell population. The role of the monocyte
 influx and alveolar macrophage proliferation *in situ*, *Am. Rev. Respir. Dis.*, **135**(1),
 78-82.
- 269 **Signoret J., 1999**
Contribution des bioindicateurs et des biomarqueurs lichéniques à l'élaboration d'un
diagnostic de la qualité de l'air en Lorraine nord, Metz, 101 pages
- 270 **Simon L. M., Robin E. D., Phillips J. R., Acevedo J., Axline S. G. and Theodore**
J., 1977
 Enzymatic basis for bioenergetic differences of alveolar versus peritoneal macrophages and
 enzyme regulation by molecular O₂, *J. Clin. Invest.*, **59**, 443-448.
- 271 **Skelly J. M., Davis D. D., Merrill W., Cameron C. A., Brown H. D., Drummond**
D. B. and Dochinger L. S., 1987
Diagnosing injury to eastern forest trees : a manual for identifying damage caused by air
pollution, pathogens, insects and abiotic stresses, Pennsylvania State University., 122

- 272 **Skornik W. A. and Brain J. D.,1990**
Effect of sulfur dioxide on pulmonary macrophage endocytosis at rest and during exercise, *Am. Rev. Respir. Dis.*, **124(3)**, 655-659.
- 273 **Spilberg I., Mehta J., Daughaday C. and Simchowicz L.,1981**
Determination of a specific receptor for formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine on the pulmonary alveolar macrophage and its relationship to chemotaxis and superoxide production, *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, **97**, 602-609.
- 274 **Steinberg J. J., Janet M. D., Gleeson L. and Gil D.,1990**
The pathology of ozone-induced damage, *Arch. Environ. Health*, **45(2)**, 80-87.
- 275 **Steinnes E.,1995**
A critical evaluation of the use of naturally growing moss to monitor the deposition of atmospheric metals, *Sci. Total Environ.*, **160(161)**, 243-249.
- 276 **Steinnes E., Rühling A., Lippo H. and Mäkinen A.,1997**
Reference material for large scale metal deposition surveys, *Accred. Qual. Assur.*, **2**, 243-249.
- 277 **Steubing L. and Jager J., 1982**
Monitoring of air pollutants by plants : methods and problems., Edition n°1, The Hague, 163 pages.
- 278 **Stikle D. F., Lauffenburger D. A. and Daniele R. P.,1985**
The motile response of lung macrophages : theoretical and experimental approaches using the linear under-agarose assay, *J. Leukoc. Biol.*, **38(3)**, 383-401.
- 279 **Stites D. P., Stobo J. D. and Wells J. V., 1987**
Basic and clinical immunology., Edition n°6, East Nortwalk , Prentice-Hall International Inc., 734 pages.
- 280 **Stossel T.,1994**
Comment les cellules se déplacent, *Pour la Science*, **205(November)**, 62-70.
- 281 **Stossel T.,1998**
Le déplacement des cellules, *Pour la Science*, **19(Hors Série - April)**, 32-33.
- 282 **Tanaka K., Kondo N. and Sugahaza K.,1982**
Accumulation of hydrogenoperoxyde in chloroplasts of SO₂ fumigated spinach leaves, *Plant Cell Physiol.*, **23**, 999-1007.
- 283 **Tanser A. R., Bourke M. P. and Blandford A. G.,1973**
Isocyanate asthma :respiratory symptoms caused by diphenyl-methane di-isocyanate, *Thorax*, **28**, 596-600.
- 284 **Tarkington B. K., Duvall T. R. and Last J. A.,1994**
Ozone exposure of cultured cells and tissues, *Method. Enzymol.*, **234**, 257-265.

- 285 **Terzidis-Trabelsli H., Lefèvre J. P., Bignon J. and Lambré C. R.,1992**
Decreased sialidase activity in alveolar macrophages of guinea pigs exposed to coal mine dust, *Environ. Health Persp.*, **97**, 103-107.
- 286 **Thomas W.,1986**
Representativity of mosses as biomonitor organisms for the accumulation of environmental chemicals in plants and soils, *Ecotox. Environ. Safe.*, **11**, 339-346.
- 287 **Tominaga T., Suzuki M., Saeki H., Matsuno S., Tachibana T. and Kudo T.,1998**
Establishment of an activated macrophage cell line, A-THP-1 and its properties, *Tohoku J. Exp. Med.*, **186**(2), 99-119.
- 288 **Toncelli M. L. and Lorenzini G.,1999**
Comparative evaluation of biomonitoring techniques of tropospheric ozone, *Environ. Monit. Assess.*, **55**(3), 445-458.
- 289 **Torunn B., Royset O. and Steinnes E.,1994**
Moss (*Hylocomium splendens*) used as biomonitor of atmospheric trace element desposition : estimation of uptake efficiencies, *Atmos. Environ.*, **29**(3), 353-360.
- 290 **Tourmann J. L., Hinz K. P., Spengler B. and Kaufmann R.,1995**
Microprobing airborne particulate matter : environmental and toxicological relevance, *Microbean Analysis*, **4**, 321-328.
- 291 **Tourmann J. L. and Kaufmann R.,1992**
Towards a toxicology of particulate airborne matter, *Analisis Magazine*, **20**(3), 40-43.
- 292 **Trass H.,1973**
Lichen sensitivity to air pollution and index of poleotolerance (I.P.), *Fol. Crypt. Est.*, **3**, 19-22.
- 293 **Tsuchiya S., Kobayashi Y., Goto Y., Okumura H., Nakae S., Kono T. and Tada K.,1982**
Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester, *Cancer Res.*, **42**, 1530-1536.
- 294 **Tsuchiya S., Yamabe M., Yamaguchi Y., Kobayashi Y. and Konno T.,1980**
Establishment and characterisation of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1), *Int. J. Cancer*, **26**, 171-176.
- 295 **Tyler G.,1990**
Bryophytes and heavy metals : a litterature review, *Bot. J. Linnean Soc.*, **104**, 231-253.
- 296 **Valentine R.,1985**
An in vitro system for exposure of lung cells to gazes : effects of ozone on rat macrophages, *J. Toxicol. Env. Health*, **16**, 115-126.
- 297 **Van der Wal W. A., Van Bree L., Marra M. and Rombout P. J.,1994**
Attenuation of acute lung injury by ozone inhalation - the effect of low level pre-exposure, *Toxicol. Lett.*, **72**(1-3), 291-298.

- 298 **Colloque phytosociologiques XV - Phytosociologie et conservation de la nature**
(Strasbourg)
La lichénologie dans l'évolution de la qualité du milieu, Strasbourg, 1987, 233-250
- 299 **Van Halluwyn C. and Lerond M., 1993**
Guide des lichens., Edition n°1, Paris, Lechevalier, 344 pages.
- 300 **Les bioindicateurs de la qualité de l'air** (6 novembre 1997 ; Rouen, France)
Approche biologique de la qualité de l'air sur l'agglomération lilloise en utilisant des plants de tabac, Rouen, France, Les Ingénieurs Ecologues, 1997, 15-25
- 301 **Van Loon L. C., Greppin H., Penel C. and Gaspar T., 1983**
The significance of changes in peroxidase in diseased plants in : Molecular and physiological aspects of plant peroxidase. , (Edition n°1) , Geneva, University of Geneva, 1983, 405-418.
- 302 **Van Oss C. J., 1986**
Phagocytosis : an overview, *Method. Enzymol.*, 132, 3-15.
- 303 **Vandobben H. F. and Terbraak C. J. F., 1998**
Effects of atmospheric NH₃ on epiphytic lichens in the Netherlands - The pitfalls of biological monitoring, *Atmos. Environ.*, 32(3), 551-557.
- 304 **Vandobben H. F. and Terbraak C. J. F., 1999**
Ranking of epiphytic lichen sensitivity to air pollution using survey data : a comparison of indicator scales, *Lichenologist*, 31(Part 1), 27-39.
- 305 **Vangrounsveld J., Mocquot B., Mench M. and Clijsters H., 1997**
Biomarqueurs du stress oxydant chez les végétaux in : Biomarqueurs en écotoxicologie : aspects fondamentaux. , Paris, Masson, 1997, 165-183.
- 306 **Vessoren P., 1997**
La qualité de l'air en France 1991 - 1996, Paris, Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement., 1-98
- 307 **Voisin C., 1998**
Principe de précaution et risques sanitaires liés à la pollution chimique de l'air, *Pollution Atmosphérique*, 159, 41-44.
- 308 **Voisin C., Aerts C., Jakubczak E., Houdret J. L. and Tonnel A. B., 1977**
Effets du bioxyde d'azote sur les macrophages alvéolaires en survie en phase gazeuse. Un nouveau modèle expérimental pour l'étude in vitro de la cytotoxicité des gaz nocifs, *Bull. Europ. Physiopath. Resp.*, 13, 137-144.
- 309 **Voisin C., Aerts C., Jakubczak E. and Tonnel A. B., 1977**
La culture cellulaire en phase gazeuse. Un nouveau modèle expérimental d'étude in vitro des activités macrophagiques alvéolaires., *Bull. Europ. Physiopath. Resp.*, 13, 69-82.

- 310 **Voisin C., Aerts C., Tonnel A. B. and Dutriez N.,1979**
Action des polluants gazeux de l'atmosphère (NO₂, O₃) sur la défense phagocytaire de l'appareil respiratoire : évaluation in vitro, *Bull. Inter. Tubercul.*, **54**(3-4), 416-419.
- 311 **Voisin C., Aerts C., Tonnel A. B. and Dutriez N.,1979**
Aérocontaminants gazeux et défense phagocytaire de l'appareil respiratoire. Cytotoxicité du NO₂, de l'ozone et de l'acroléine pour les macrophages alvéolaires en phase gazeuse, *Nouvelle Presse Medicale*, **8**, 2089-2094.
- 312 **Von Mühlendahl K. E.,1997**
Ozone toxicity - an environmental dilemma, *Eur. J. Pediatr.*, **156**, 734-735.
- 313 **Waber M., Werner H. and Peichl L.,1994**
Effect related ozone monitoring - Comparison of reaction indicator tobacco Bel-W3 and deposition collector indigo paper, *Chemosphere*, **28**(11), 1905-1912.
- 314 **Walker B. A., Seiler A. J., Owens C. A., Hagenlocker B. E. and Ward P. A.,1991**
Absence of FMLP receptors on rat macrophages, *J. Leukoc. Biol.*, **50**(6), 600-606.
- 315 **Wallaert B., Gosset P. and Tonnel A. B.,1996**
In vitro assessment of environmental toxicology using alveolar cells as target, *Cell Biol. Toxicol.*, **12**, 251-256.
- 316 **Warheit D. B. and Hartsky M. A.,1993**
Role of alveolar macrophage chemotaxis and phagocytosis in pulmonary clearance responses to inhaled particules : comparisons among rodent species, *Micros. Res. Techniq.*, **26**(5), 412-422.
- 317 **Wegener J. W. M., Van Schaik M. J. and Aiking H.,1990**
Active biomonitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons by means of mosses, *Environ. Pollut.*, **76**, 15-18.
- 318 **Weissmann G.,1967**
The role of lysosomes in inflammation and disease, *Ann. Rev. Med.*, **18**, 97-112.
- 319 **Wendzel D. G. and Morgan D. L.,1983**
In vitro inhibition of alveolar macrophage phagocytosis by ozone : absence of a rôle for serum or mode of ozone administration, *Toxicol. Lett.*, **18**(1-2), 57-61.
- 320 **Willenkens H., 1974**
Oxidative stress response in plants : regulation and function of H₂O₂ scavenging enzymes,
University of Ghent
- 321 **Willet W. C., Colditz G. A. and Mueller N. E.,1996**
Strategies for minimising cancer risk, *Sci. Am.*, **10**(*Special issue*), 80-87.
- 322 **Wright E. S., Dziedzic D. and Wheeler C. S.,1990**
Cellular, biochemical and functional effects of ozone : new research and perspective on ozone health effects, *Toxicol. Lett.*, **51**, 125-145.

- 323 **Yu C. P., Chen Y. K. and Morrow P. E.,1989**
An analysis of alveolar macrophage mobility kinetic at dust overloading the lungs, *Fund. Appl. Toxicol.*, **13(3)**, 452-459.
- 324 **Yunis J. J., Band H., Bonneville F. and Yunis E. J.,1989**
Differential expression of MHC class II antigens in myelomonocytic leukemia cell lines, *Blood*, **73(4)**, 931-937.
- 325 **Zamitt-Tabona M., Sherkin M., Kijek K., Chan H. and Chan-Yeung M.,1983**
Asthma caused by diphenylmethane diisocyanate in foundry workers, *Am. Rev. Respir. Dis.*, **128**, 226-230.
- 326 **Zeiss C. R., Kanellakes T. M., Bellone J. D., Levitz D., Pruzansky J. J. and Patterson R.,1980**
Immunoglobulin E - mediated asthma and hypersensitivity pneumonitis with precipitating anti-hapten antibodies due to diphenylmethane diisocyanate (MDI) exposure, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **65**, 346-352.
- 327 **Zelikoff J. T., Frampton M. W., Cohen M. D., Morrow P. E., Sisco M., Tsai Y., Uttel M. J. and Schlesinger R. B.,1997**
Effects of inhaled sulfuric acid aerosols on pulmonary immunocompetance - A comparative study in humans and animals, *Inhal. Toxicol.*, **9(8)**, 731-752.
- 328 **Zelikoff J. T., Kraemer G. L., Vogel M. C. and Schlesinger R. B.,1991**
Immunomodulating effects of ozone on macrophage functions important for tumor surveillance and host defense., *J. Toxicol. Env. Health*, **34(4)**, 449-467.

ANNEXES

7 ANNEXES

7.1 ASSOCIATIONS MEMBRES DU RESEAU DE SURVEILLANCE DE LA QUALITE DE L'AIR EN FRANCE

ASSOCIATION	VILLE(S)	COORDONNEES
<i>AERFOM</i>	Metz - Thionville	03 82 51 46 60
<i>AIRAQ</i>	Bordeaux - Bayonne - Pau	05 56 24 35 30
<i>AIR BREIZH</i>	Rennes - Brest - Lorient	02 99 27 66 77
<i>AIRFOBEP</i>	Martigues	04 42 13 01 20
<i>AIRLOR</i>	Nancy	03 83 44 38 89
<i>AIRMARAIX</i>	Marseille - Aix-en-Provence - Toulon - Avignon	04 91 83 63 90
<i>AIR NORMAND (Alpa)</i>	Le Havre	02 32 74 06 40
<i>AIR NORMAND (Remappa)</i>	Rouen	02 35 07 94 30
<i>AIRPARIF</i>	Paris	01 44 59 47 64
<i>AMPAC</i>	Clermont-Ferrand	04 73 34 91 34
<i>AMPADILR</i>	Montpellier - Nîmes - Perpignan	04 67 15 96 60
<i>AMPASEL</i>	Saint-Étienne	04 77 74 22 46
<i>AREMADEC</i>	Dunkerque - Calais	03 28 23 81 50
<i>AREMA LRT</i>	Lille	03 20 15 84 15
<i>AREMARTOIS</i>	Lens - Béthune	03 21 63 69 01
<i>AREMASSE</i>	Valenciennes - Douai - Maubeuge	03 27 21 05 15
<i>AREQUA</i>	La Rochelle - Poitiers - Angoulême	05 46 44 83 88
<i>ARPAM</i>	Montbéliard	03 81 36 26 15
<i>ARQAL</i>	Limoges	05 55 33 19 69
<i>ASCOPARG</i>	Grenoble	04 76 33 16 69
<i>ASQAB</i>	Besançon	03 81 25 06 60
<i>ARSQA</i>	Reims - Troyes	03 26 77 36 25
<i>ASQAP</i>	Amiens	03 22 33 66 14
<i>ASQUADRA</i>	Valence	04 75 82 46 46
<i>ASPA</i>	Strasbourg - Mulhouse	03 88 19 26 66
<i>ATMOSF'AIR</i>	Chalon-sur-Saône	03 85 90 01 40
<i>COPARLY</i>	Lyon	04 78 93 12 59
<i>ESPAC</i>	Caen	02 31 53 10 10
<i>ESPOL</i>	Carling	03 87 91 70 69
<i>L'AIR DES DEUX SAVOIE</i>	Chambéry - Annecy	04 79 69 05 43
<i>LIG'AIR</i>	Orléans - Tours	02 38 78 09 49
<i>LOIRESTUAIR</i>	Nantes - Saint-Nazaire	02 51 85 80 80
<i>ORAMIP</i>	Toulouse	05 61 15 42 46
<i>ORA</i>	Sainte-Clotilde	02 62 92 41 17
<i>QUALITAIR 06</i>	Nice - Grasse - Cannes - Antibes	04 93 72 70 17
<i>RESUPADI</i>	Dijon	03 80 38 92 31
<i>SUPAIRE</i>	Roussillon	04 74 86 67 80

7.2 COMPOSITION DU RPMI 1640

	Composé	Quantité (mg/l)
Sels inorganiques	Ca(NO ₃) ₂ - 4 H ₂ O	100,00
	KCl	400,00
	MgSO ₄ - 7 H ₂ O	100,00
	NaCl	6000,00
	NaHCO ₃	2000,00
	Na ₂ HPO ₄	800,00
Acides aminés	L-Arginine HCl	200,00
	L-Asparagine (base libre)	50,00
	Acide L-Aspartique	20,00
	L-Cystine	50,00
	Acide L-Glutamique	20,00
	L-Glutamine	300,00
	Glycine	10,00
	L-Histidine (base libre)	15,00
	L-Hydroxyproline	20,00
	L-Isoleucine	50,00
	L-Leucine	50,00
	L-Lisine - HCl	40,00
	L-Méthionine	15,00
	L-Phénylalanine	15,00
	L-Proline	20,00
	L-Sérine	30,00
	L-Thréonine	20,00
	L-Tryptophane	5,00
	L-Tyrosine	20,00
L-Valine	20,00	
Vitamines	D-Biotine	0,20
	Pandothénate de calcium D	0,30
	Chlorure de choline	3,00
	Acide folique	1,00
	i-inositol	35,00
	Nicotinamide	1,00
	Acide para-aminobenzoïque	1,00
	Pyridoxal HCl	1,00
	Riboflavine	0,20
	Thiamine HCl	1,00
	Vitamine B12	0,005
Autres composants	D-Glucose	2000,00
	Glutathion (réduit)	1,00
	Rouge de phénol	5,00

7.3 TABLE DE CORRESPONDANCE ENTRE DENOMINATION SYSTEMATIQUE ET

NOM USUEL

Dénomination taxonomique	Famille	Nom usuel
<i>Asclepias Syriaca</i> L.	Asclépiadacée	Herbe d'esculape
<i>Evernia mesomorpha</i> Nyl.		Lichen fruticuleux
<i>Fraxinus Americana</i> L.	Oléacée	Frêne d'Amérique
<i>Hylocomium splendens</i> Hedw. (B, S & G)	Hypnacée	Bryophyte pleurocarpe ⁹
<i>Liriodendron tulipifera</i> L.	Magnoliacée	Tulipier de Virginie
<i>Nicotina tabacum</i> L.	Solanacée	Tabac
<i>Nicotiana tabacum</i> L. cv Bel B	Solanacée	Tabac résistant à l'ozone
<i>Nicotiana tabacum</i> L. cv Bel W3	Solanacée	Tabac sensible à l'ozone
<i>Prunus serotina</i> Ehrh.	Rosacée	Cerisier tardif
<i>Teloshistes flavicans</i> (Sm.) Norm.		Lichen fruticuleux

⁹ Caractérise un bryophyte dont les gamétanges femelles se différencient latéralement (par rapport au axes) et non en position apicale, ce qui entraîne une position comparable des sporophytes, lesquels s'échelonnent à leur tour, le long des axes.

7.4 STRUCTURE DE L'ATMOSPHERE

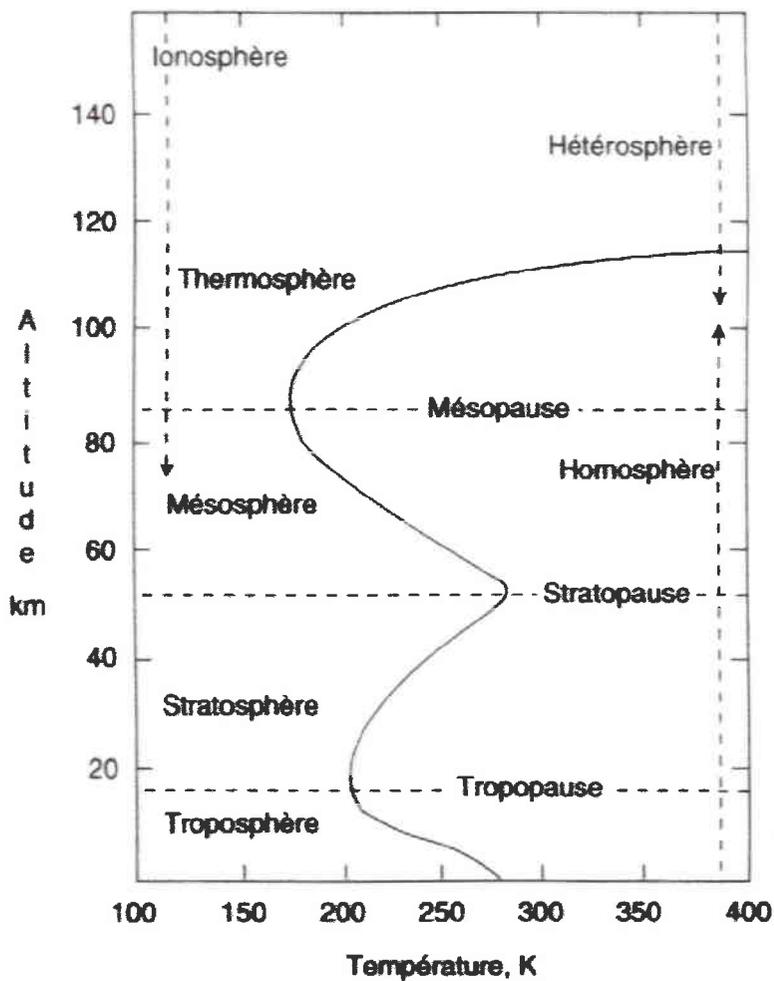


Figure 46 : Structure thermique moyenne de l'atmosphère et couches atmosphériques (Popescu, *et al.*, 1998).

7.5 DEFINITIONS PROPRES A L'ANALYSE D'IMAGES

7.5.1 Elément structurant

Masque binaire utilisé lors des transformations morphologiques qui permet la modification de la valeur d'un pixel en fonction de celle de ses voisins. Ce masque permet de déterminer quels seront les pixels pris en compte pour la transformation.

Dans le cas d'un masque représenté par une matrice 3 x 3 (Figure 47), les 8 pixels voisins du pixel subissant la transformation morphologique seront pris en considération.

1	1	1
1	1	1
1	1	1

Figure 47 : Matrice 3 x 3

7.5.2 Connexité

C'est la recherche des pixels adjacents.

La Figure 48 présente une matrice de 9 pixels. Les pixels adjacents à P_0 sont recherchés. Si la distance qui sépare $P_2 - P_4 - P_5 - P_7$ de P_0 est de D , la distance qui sépare $P_1 - P_3 - P_6 - P_8$ de P_0 est de $2^{1/2} D$. Une connexité de 4 définira alors les 4 pixels les plus proches de P_0 , soit $P_2 - P_4 - P_5 - P_7$. Par contre, une connexité de 8 définira alors les 8 pixels les plus proches de P_0 , soit les pixels P_1 à P_8 .

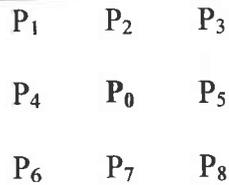


Figure 48 : Matrice de 9 pixels avec P_0 le pixel à traiter et P_1 à P_8 ses voisins.

7.5.3 Erosion [E(I)]

Une érosion est une transformation morphologique telle que :

$$P_0 = 1 \text{ si AND } (P_i) = 1 \text{ sinon } P_0 = 0$$

(Si un P_i au moins est égal à 0)

Avec :

- P_0 le pixel à traiter
- $P_i = P_1 - P_8$ ses voisins dans le cas d'un élément structurant 3 x 3

7.5.4 Dilatation [D(I)]

Une dilatation est une transformation morphologique telle que :

$$P_0 = 1 \text{ si OR } (P_i) = 1 \text{ sinon } P_0 = 0$$

(Si un P_i au moins est égal à 1)

Avec :

- P_0 le pixel à traiter
- $P_i = P_1 - P_8$ ses voisins dans le cas d'un élément structurant 3 x 3

7.5.5 Ouverture [O(I)]

Soit « I » l'image initiale : $O(I) = DE(I)$

7.5.6 Fermeture [F(I)]

Soit « I » l'image initiale : $F(I) = ED(I)$

7.5.7 Ouverture Propre [Op(I)]

Soit « I » l'image initiale : $Op(I) = (I) \text{ inter } FOF(I)$

7.5.8 Fermeture Propre [Fp(I)]

Soit « I » l'image initiale : $Fp(I) = (I) \text{ union } OFO(I)$

7.5.9 Transformation morphologique primaire auto-médiane [Auto-Median(I)]

Soit « I » l'image initiale : $\text{Auto-Median}(I) = Op(I) \text{ inter } Fp(I)$

20001735

DS

Analyse de la mobilité des macrophages pour le développement d'un biocapteur atmosphérique

RESUME

L'action des polluants atmosphériques sur la mobilité et la physiologie des macrophages alvéolaires est mal connue pour les expositions à court terme. Un bioessai basé sur la reconnaissance d'images est utilisé pour mesurer la variation de V_{AS} (vitesse d'accroissement de surface) des cellules en déplacement. Le fMLP (formyl Méthionine Leucine Phénylalanine) a été retenu comme activateur de la mobilité cellulaire, ce dernier donnant une relation dose - réponse et un déplacement significatif sur la durée d'analyse. La V_{AS} de macrophages activés (100 μ l de fMLP à 10^{-5} M) après exposition à 0,5 ppm d'ozone (O_3) pendant 10 minutes a diminué la V_{AS} d'un facteur 4 par rapport à la série témoin. Ces résultats ont permis de réaliser un biocapteur atmosphérique fonctionnant en continu. L'ozone affecte la V_{AS} des macrophages. Cette altération peut être modélisée par une relation polynomiale. En ce qui concerne le monoxyde d'azote (NO), des concentrations comprises entre 157 ppb et 1125 ppb ont altéré la V_{AS} de façon significative. Un mélange composé d' O_3 et de NOx a provoqué une diminution de V_{AS} d'environ 70 %. **Le prototype permet donc de mettre en évidence les pollutions liées au NO et à O_3 dans les limites des normes européennes.** Après avoir vérifié l'influence de O_3 sur la V_{AS} , les répercussions physiologiques de ce polluant ont été abordées dans les conditions du bioessai. La concentration de 0,5 ppm est cytotoxique avec un TL50 atteinte pour 28 mn d'exposition. De plus, cette agression modifie la concentration de calcium intracellulaire traduisant l'activation du métabolisme cellulaire. Celle-ci peut être corrélée à la libération de molécules de défenses (H_2O_2 et NO). **L'exposition de macrophages à 0,5 ppm d'ozone conduit donc à une perte de mobilité et à l'activation des systèmes de protection de la cellule.**

Mots - Clés : macrophages ; THP-1 ; mobilité ; ozone ; NOx ; biocapteur ; bioessai

Analysis of macrophages mobility for the development of an atmospheric biosensor

ABSTRACT

The action of atmospheric pollutants on the mobility and physiology of alveolar macrophages after short-term exposures is not well understood. A bioassay, based on images recognition, is used to measure the variation of R_{IA} (area increasing rate) of cells in movement. fMLP (formyl Methionine Leucine Phenylalanine) was retained as activator of cell mobility, allowing to obtain a dose - answer relation and a significant displacement during the analysis period. R_{IA} of activated macrophages (100 μ l of fMLP ; 10^{-5} M) after a 10 minutes exposure to 0,5 ppm ozone (O_3) decreased from a factor 4 compared to the control samples. These results lead to the realisation of an atmospheric biosensor working online. Ozone modify macrophages' R_{IA} . This impairment can be modelled by a polynomial relation. With regard to nitric oxide (NO), concentrations between 157 ppb and 1125 ppb significantly impaired. A combination of O_3 and NOx induced a decrease in R_{IA} by 70 %. **The prototype makes it possible to highlight pollutions due to NO and O_3 within the limits of the European standards.** After having studied the effects of O_3 on R_{IA} , the physiological repercussions of this pollutant under bioessai conditions were approached. At 0,5 ppm, ozone is cytotoxic reaching a TL50 after 28 mn of exposure. Moreover, this aggression modifies the concentration of intracellular calcium representing the activation of cellular metabolism. This latter can be correlated with the release of defences molecules (H_2O_2 and NO). The exposure of macrophages to 0,5 ozone ppm leads to a loss of mobility and the activation of the cell protection systems.

Key Words : macrophages ; THP-1 ; mobility ; ozone ; biosensor ; bioassay

Discipline : Toxicologie de l'Environnement

IUT de Metz délocalisé à Thionville - Yutz
Département Génie Biologique - Génie de
l'Environnement
Impasse Alfred Kastler
57970 Yutz, France

E.B.S.E.
1 rue des Récollets
57000 Metz, France