

Article original / Original article

Caractérisation physico-chimique et effets cytotoxiques de particules atmosphériques PM_{2,5} de la ville de Dakar (Sénégal)

Physico-chemical characterization and cytotoxic effects of atmospheric particles PM_{2,5} of Dakar city (Senegal)

Denis Dieme^{1,2}, Mathilde Cabral^{1,2*}, Anthony Verdin¹, Mamadou Fall², Sylvain Billet¹, Fabrice Cazier³, Guillaume Garçon¹, Amadou Diouf², Pirouz Shirali¹

¹ Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (UCEIV), Université du Littoral Côte d'Opale (ULCO), 189A avenue Maurice Schumann, 59140 Dunkerque, France

² Laboratoire de Toxicologie et d'Hydrologie (LTH), Université Cheikh Anta Diop, BP 5005 Dakar-Fann, Sénégal

³ Centre Commun de Mesure (CCM), Université du Littoral Côte d'Opale (ULCO), 145 avenue Maurice Schumann, 59140 Dunkerque, France

Résumé – Objectif : La pollution atmosphérique constitue un facteur de risque majeur pour la santé de l'homme. De nombreuses études épidémiologiques ont établi une corrélation entre l'exposition aux particules fines de diamètre aérodynamique inférieur à 2,5 µm (PM_{2,5}) et l'apparition de pathologies respiratoires, notamment de cancers pulmonaires. Notre travail a consisté à collecter des particules sur deux sites (P₁ et P₂) de la ville de Dakar caractérisés par un trafic automobile dense. **Méthode :** La collecte des particules a été effectuée par un impacteur en cascade. Les analyses physico-chimiques effectuées sont : la granulométrie par microscopie électronique à balayage associée à une analyse par rayons X (MEB-EDX) ; la détermination des fractions inorganique par spectrométrie d'émission atomique couplée à un plasma inductif (ICP-AES) ; organiques (hydrocarbures aromatiques polycycliques et composés organiques volatils) par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) ; enfin, ioniques par chromatographie ionique (CI). **Résultats :** L'exposition de cellules A549 à des concentrations croissantes de particules P₁ et P₂ provoque une diminution significative de l'incorporation de la bromodésoxyuridine, de l'activité de la déshydrogénase mitochondriale et une augmentation de l'activité de la lactate déshydrogénase extra-cellulaire. Ces tests ont permis de déterminer les concentrations létales pour P₁ (CL₁₀ = 5,11 µg/cm² et CL₅₀ = 25,56 µg/cm²) et P₂ (CL₁₀ = 5,59 µg/cm² et CL₅₀ = 27,97 µg/cm²). La toxicité la plus importante est observée dans les cellules exposées à la concentration maximale des particules P₁ (48 µg/cm²). **Conclusion :** Ces résultats pourraient s'expliquer par les effets délétères synergiques engendrés par les fractions inorganique et organique, sources d'espèces réactives de l'oxygène potentiellement toxiques.

Mots clés : Particules fines PM_{2,5}, caractérisation physico-chimique, cytotoxicité, cellules A549

Abstract – Objective: Air pollution is a major risk factor for human health. Numerous epidemiological studies have clearly established a correlation between exposure to fine particulate matter (PM_{2,5}) and the occurrence of respiratory diseases, including lung cancer. Our work consisted of collecting particles from the city of Dakar, at two different sites (P₁ and P₂) characterized by heavy automobile traffic. **Method:** The collection of particles was carried out using a cascade impactor. Physico-chemical characterization of the collected PM was conducted using scanning electron microscopy coupled with X-ray diffraction (particle size), inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (inorganic chemicals), gas chromatography coupled with mass spectrometry (PAHs and VOCs), and ionic chromatography (ions). **Results:** Exposure of A549 cells to increasing concentrations of P₁ and P₂ particles causes a significant decrease in the incorporation of bromodeoxyuridine, and in the activity of mitochondrial dehydrogenase, and an increase in the activity of extracellular lactate dehydrogenase. These cytotoxic tests allowed the determination of the lethal concentrations for P₁ (LC₁₀ = 5.11 µg/cm² and LC₅₀ = 25.56 µg/cm²) and P₂ (LC₁₀ = 5.59 µg/cm² and LC₅₀ = 27.97 µg/cm²). **Conclusion:** The most significant toxic effect was observed in cells exposed to the highest concentration of P₁ particles (48 µg/cm²).

* Mathilde Cabral, Mathilde.Cabral@univ-littoral.fr

The results obtained could be explained by the synergistic deleterious effects caused by the inorganic and organic compounds bound to the PM_{2,5}, sources of reactive species of oxygen, and potentially toxic.

Key words: Particulate matter PM_{2,5}, physico-chemical characterization, cytotoxicity, A549 cells

Reçu le 13 octobre 2011, accepté après modifications le 9 novembre 2011

Publication en ligne le 12 décembre 2011

1 Introduction

Les particules en suspension ou PM (*Particulate Matter*) sont responsables de nombreuses maladies respiratoires chez l'homme. Des études épidémiologiques ont corrélié l'exposition aux PM et l'apparition de pathologies telles que l'asthme et la broncho-pneumopathie obstructive, et même les cancers pulmonaires [1, 2]. Ces nombreux effets ont conduit, dans les pays développés, à la mise en place de politiques de réduction des émissions anthropogéniques associées à l'utilisation de technologies modernes. En revanche, dans les pays en développement, notamment en Asie et en Amérique Latine, ces émissions sont en nette augmentation suite à une consommation importante d'énergies fossiles. Des études épidémiologiques menées dans ces deux régions ont mis en évidence l'émergence des pathologies chroniques cardiorespiratoires reconnues sous la dépendance des facteurs de risques environnementaux [3]. Ces problèmes peuvent être extrapolés en Afrique sub-saharienne, où le taux de croissance urbaine est le plus élevé au monde [4], les systèmes de mesures de la qualité de l'air, les données sur la physico-chimie et les effets toxicologiques étant quasi inexistantes [5]. L'OMS a rapporté que près d'un quart des décès survenus en Afrique en 2002 serait attribué à des facteurs de risque liés à l'environnement, dont 40 000 décès liés à la pollution de l'air [6].

En effet, les PM proviennent aussi bien de sources naturelles que de sources anthropiques. Elles constituent un ensemble hétérogène de substances minérales ou organiques dont les caractéristiques granulométriques et la composition chimique varient selon leur origine. En milieu urbain, les PM proviennent majoritairement des activités anthropiques. Le secteur des transports automobiles est l'un des principaux responsables de leur émission dans l'air urbain. En se basant sur l'étude effectuée à Copenhague, le trafic automobile contribuerait à l'émission respective de 13 % de PM_{2,5}, avec des particules de diamètre aérodynamique inférieur à 2,5 µm, et de 32 % de PM₁₀, avec des particules de diamètre aérodynamique inférieur à 10 µm, [7]. De nombreux travaux sur la physico-chimie et les effets toxicologiques des particules en suspension ont rapporté que l'exposition aux particules fines (PM_{2,5}) constitue un facteur de risque pour la santé de l'homme [8, 9]. Du fait de leur faible diamètre, les PM_{2,5} peuvent pénétrer profondément dans les poumons et atteindre les alvéoles, où ils peuvent induire des effets néfastes sur l'épithélium pulmonaire [10]. À cause de leur grande surface de contact, ces particules adsorbent les composés organiques toxiques comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et les composés organiques volatils

(COV) [11]. Dans les alvéoles pulmonaires, les PM_{2,5} stimulent la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui peuvent dériver directement des PM elles-mêmes mais aussi de leur composition chimique, notamment en métaux de transitions [12]. Diouf *et al.* [13] ont montré une corrélation entre la densité du trafic automobile à Dakar et l'augmentation des affections broncho-pulmonaires chez les enfants.

Dans cette étude, les particules de diamètre aérodynamique inférieur à 2,5 µm (PM_{2,5}) sont collectées sur deux sites urbains (Fann et Faidherbe) de la ville Dakar différant par le type de véhicules qui y circulent. À Fann (P₁) la majorité du trafic automobile est effectué par les véhicules de transport en commun («cars rapides»), alors qu'à Faidherbe (P₂), ces cars rapides sont absents et le trafic est essentiellement assuré par les véhicules particuliers. Notre travail a consisté à déterminer la composition chimique et la cytotoxicité des PM_{2,5} de Dakar. Une caractérisation physico-chimique des particules sera d'abord effectuée (distribution granulométrique, composition chimique en éléments inorganiques et organiques), puis une évaluation de la cytotoxicité globale des PM_{2,5} sur des cellules épithéliales pulmonaires, la lignée A549.

2 Matériels et méthodes

2.1 Site et méthode de prélèvement des PM

Les prélèvements ont été effectués à Dakar (N 14° 63' et 14° 37' ; W 17° 45 et 17° 27) qui est la capitale du Sénégal. Dakar se situe sur une presqu'île en écosystème de savane sèche, présentant une superficie de 550 km². L'agglomération de Dakar concentre une population de près 2,6 millions d'habitants et 80 % des industries nationales.

Le trafic automobile est particulièrement dense et vétuste (70 % des véhicules ont plus de 10 ans). La majorité des trajets motorisés (86 %) est assurée par des véhicules de transport en commun, ou cars rapides, qui pour la plupart utilisent du carburant diesel (90 %) [14].

La collecte des PM a été effectuée à l'aide d'un impacteur en cascade de type Staplex[®], modèle 236. Cette technique de prélèvement, utilisant un ensemble de plaques munies de fentes calibrées, permet une collecte sélective des aérosols en fonction de leur diamètre aérodynamique. Cet impacteur a un débit d'aspiration de 80 m³/h et comporte initialement six étages.

Deux sites caractérisés par un trafic automobile dense, ont été choisis : Fann (P₁), où la majorité du trafic est représentée par les véhicules de transport en commun nommés cars rapides,

et Faidherbe (P₂), qui se caractérise par l'absence de cars rapides et un trafic majoritairement assuré par les véhicules particuliers.

La pompe est placée sur un support de 1,50 mètre environ de hauteur, à environ 2,50 mètres de la voie. Les prélèvements ont été effectués uniquement la journée avec un temps de prélèvement de 8 heures par jour, pendant 5 jours à Fann et 4 jours à Faidherbe. Les particules collectées sur chaque site ont été homogénéisées puis conservées à 4 °C.

2.2 Caractéristiques physico-chimiques des PM

2.2.1 Détermination de la granulométrie

La granulométrie de l'échantillon a été déterminée par l'analyse individuelle de 876 particules pour P₁ et de 880 particules pour P₂ au microscope électronique à balayage associé à une analyse par rayons X (MEB-EDX) [11].

2.2.2 Détermination de la composition chimique

Pour les éléments inorganiques, la procédure analytique consiste d'abord en une digestion des particules dans un mélange d'acides HNO₃/HClO₄/HF (4/1/1 v/v/v) pendant une durée de 3 heures. L'analyse des éléments est effectuée par spectrométrie d'émission atomique couplée à un plasma inductif (ICP-AES) [11].

La composition ionique de l'aérosol est déterminée après extraction des ions. Les ions étant fortement solubles dans l'eau, ils sont extraits en ajoutant une prise d'essai de 29,5 mg pour P₁ et 24,4 mg pour P₂ d'échantillon de particules dans des béchers contenant 23 mL et 18 mL d'eau ultra-pure, respectivement pour P₁ et P₂. L'ensemble est ensuite placé dans un bac à ultrasons pendant 30 minutes. Le lixiviat est filtré sur filtre millipore (0,45 µm diamètre). Le filtrat ainsi obtenu est utilisé pour l'analyse des ions par chromatographie ionique de modèle Dionex[®] DX 100 pour les anions, et de modèle Dionex[®] ICS 900 pour les cations. L'éluant est composé de NaHCO₃ (0,5 mM) et Na₂CO₃ (4,5 mM) pour les anions, et de CH₃SO₃H (20 mM) comme éluant des cations [11].

La composition en éléments organiques est déterminée après une extraction au soxhlet à l'aide du dichlorométhane. Cette extraction repose sur le principe de la percolation d'un solvant organique à travers un échantillon solide contenu dans une cartouche poreuse, entraînant ainsi les composés dissous. Les composés organiques sont détectés à l'aide d'une chromatographie en phase gazeuse de type VARIAN de Modèle CP 3800, couplée à un spectromètre de masse (Modèle 1200 QUADRUPOLE MS/MS) [11].

2.3 Matériel biologique et étude de la cytotoxicité

2.3.1 Culture de cellules A549

Le matériel biologique est constitué de pneumocytes de type II, la lignée A549, initialement obtenue à partir d'un explant de tissu alvéolaire carcinomateux d'un patient de 58 ans

[15]. Ces cellules ont la propriété de se multiplier et d'être maintenues en survie grâce à un repiquage hebdomadaire, leur temps de dédoublement théorique étant de 24 heures.

En fonction des paramètres d'étude considérés, la lignée de cellules A549 estensemencée dans des boîtes de Pétri, des microplaques de culture à 96 puits, ou encore des flacons de culture de 75 cm² (Corning ; Fisher Scientific Labosi SAS) contenant du milieu essentiel minimum (MEM) avec des sels de Earle et sans L-glutamine (In Vitrogen Life Technologies ; Cergy Pontoise, France). Ce dernier est supplémenté à 1 % (v/v) avec une solution de L-glutamine, à 1 % (v/v) avec une solution d'antibiotiques (pénicilline – streptomycine), et à 5 % (v/v) avec du Sérum de veau foetal (Life Technologies). Les cultures de cellules sont incubées à 37 °C sous une atmosphère contrôlée de 5 % CO₂ et saturée en humidité.

2.3.2 Étude de la cytotoxicité globale

La cytotoxicité globale des particules a été déterminée sur cette lignée grâce à 4 méthodes complémentaires : l'incorporation de la 5-Bromo-2'-désoxyUridine (BrdU), l'activité de la déshydrogénase mitochondriale (DHm), l'activité de la lactico-déshydrogénase extra-cellulaire (LDH) et l'efficacité de clonage.

Les particules ont été mises en suspension dans du milieu MEM supplémenté de manière à obtenir une solution mère permettant d'exposer les cultures de cellules à une gamme de concentration calculée sur la base d'études précédentes menées sur une lignée de cellules embryonnaires humaines : lignée L132 [16]. Cinq concentrations sont ainsi testées : 3 ; 6 ; 12 ; 24 et 48 µg/cm². Chaque test de cytotoxicité fait l'objet d'une observation en microscopie optique à l'aide d'un microscope inversé (Olympus CKX41 ; Olympus France SAS) muni d'une glissière de contraste de phase précentrée (IXS2-SL ; Clara Vision). Une acquisition d'images est réalisée à l'aide d'une caméra numérique couleur (Scion CFW-1310C ; ClaraVision) et du logiciel Perfect Image (ClaraVision).

Détermination de l'incorporation de la 5-Bromo-2'-désoxyUridine (BrdU)

L'incorporation de la BrdU (5-bromo-2'-désoxyUridine) lors de la phase de réplication de l'ADN est un reflet de l'activité mitotique et renseigne donc sur la prolifération cellulaire. Les cellules ont été cultivées en présence de BrdU dans une microplaque de culture à 96 puits, placée dans un incubateur (*T* = 37 °C ; CO₂ = 5 % et saturé d'humidité). La cinétique observée (24, 48 et 72 heures) a conduit à utiliser 3 microplaquesensemencées avec 2 × 10⁴ cellules/200 µL/puits. Pour chacune des microplaques, 8 puits ont été exposés aux différentes concentrations testées (3 ; 6 ; 12 ; 24 et 48 µg/cm²), 16 puits ne contenant que du MEM supplémenté ont été considérés comme des témoins négatifs, et enfin 8 puits contenant du Triton X100 (2 % v/v) servent de témoins positifs. Ce test de cytotoxicité a été réalisé grâce à l'utilisation du kit « *Cell proliferation ELISA BrdU* (colorimetric) » (Roche Applied Science ; Allemagne).

Son principe consiste en l'immunodétection par fixation d'un anticorps Anti-BrdU conjugué à une peroxydase sur la BrdU incorporée à l'ADN des cellules exposées. La conversion de la tétraméthylbenzidine par la peroxydase est quantifiée par mesure au spectrophotomètre à 370 nm (λ référence = 490 nm) grâce à un lecteur de microplaques (MRX ; Dynatech laboratories ; France).

Détermination de l'activité de la déshydrogénase mitochondriale (DHm)

La prolifération cellulaire est corrélée à l'activité de la DHm (déshydrogénase mitochondriale). Les cellules sont cultivées dans une microplaque de culture à 96 puits. La cinétique observée (24, 48 et 72 heures) a conduit à utiliser 3 microplaques ensemencées dans les mêmes conditions que celles appliquées pour le test BrdU. Une augmentation du nombre de cellules viables entraîne une augmentation de l'activité globale des déshydrogénases mitochondriales dans l'échantillon. L'augmentation de l'activité de cette enzyme entraîne une augmentation de la quantité de formazan formé qui est directement proportionnelle au nombre de cellules métaboliquement actives. L'activité de la DHm est étudiée grâce au test de cytotoxicité WST-1 (Roche Applied Science ; Allemagne), qui consiste à étudier la transformation par clivage d'un sel de tétrazolium, le 1,3-disulfonate de 4-[3-(4-iodophényle)-2-(4-nitrophényle)-2H-5-tétrazolio]-benzène, en composé formazan coloré par mesure au spectrophotomètre à 450 nm (λ référence = 630 nm) grâce à un lecteur de microplaques (MRX ; Dynatech laboratories ; France).

Dosage de la lactate déshydrogénase (LDH) extra-cellulaire

La LDH (lactate déshydrogénase) est une enzyme cytoplasmique. Une augmentation de la concentration de cette enzyme dans le milieu extra-cellulaire indique une augmentation de cellules qui présentent une perméabilité membranaire. La détermination de l'activité de la LDH extra-cellulaire est réalisée sur les surnageants de culture prélevés lors de l'étude de l'activité de la DHm, grâce au « *Cytotoxicity detection kit* (LDH) » (Roche Applied Science ; Allemagne). La LDH oxyde le lactate en pyruvate, ce qui a pour effet de réduire le NAD^+ en NADH , H^+ qui se régénère en réduisant un sel de tétrazolium jaune en composé Formazan rouge, détecté par mesure au spectrophotomètre à 490 nm (λ référence = 630 nm) grâce à un lecteur de microplaques MRX.

Efficacité de clonage

Des cellules en phase exponentielle de croissance ($n = 250$) ont été cultivées dans des boîtes de Pétri (60×15 mm ; Corning ; Fisher Scientific Labosi SAS) contenant du MEM complet, supplémenté à 10 % avec du SVF [17]. Huit boîtes, choisies au hasard, ont été exposées à chacune des cinq concentrations testées (3 ; 6 ; 12 ; 24 et 48 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Seize boîtes n'étant

incubées qu'avec du MEM supplémenté ont constitué les témoins. Les cellules ont été placées pendant 9 jours dans un incubateur ($T = 37^\circ\text{C}$; $\text{CO}_2 = 5\%$ et saturé d'humidité). Les clones ont été fixés, colorés avec du violet cristal, puis comptés sous loupe binoculaire. Le calcul des pourcentages de viabilité par comparaison avec les boîtes témoins a permis de déterminer les concentrations létales à 10 % (CL_{10}) et à 50 % (CL_{50}).

2.4 Analyses statistiques

Les variables aléatoires quantitatives continues considérées, à savoir le nombre de clones, l'incorporation de la BrdU, l'activité de la DHm et l'activité de la LDH, ont été décrites par leurs moyennes et écarts-types. Les valeurs de variables aléatoires de chaque groupe (contrôles négatifs, contrôles positifs, concentrations croissantes de l'aérosol) ont été comparées à celle du groupe témoin grâce au test non paramétrique U de Mann Whitney. Le risque d'erreur de première espèce (α) consenti était 0,05. Le traitement des données a été réalisé avec le logiciel d'analyses statistiques « SPSS 12.0 for Windows », version 12.0.1, novembre 2003 (SPSS France, Paris, France).

3 Résultats

3.1 Résultats de la physico-chimie

La masse totale des particules prélevées correspond à 145 mg à Fann (P_1) et 242 mg à Faidherbe (P_2) pour 5 jours et 4 jours respectivement sur les deux sites. Ceci correspond en moyenne à des concentrations journalières respectives de 45,31 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ à Fann et 94,45 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ à Faidherbe. Les observations au microscope électronique à balayage (figure 1) réalisées sur les particules P_1 et P_2 montrent des différences structurales entre les particules d'origine naturelle à surface rugueuse (B et C) et anthropique à surface lisse (A).

L'analyse de la granulométrie de l'échantillon de particules étudiées montre aussi que les fréquences relatives et cumulées (figure 2) des PM_{10} , $\text{PM}_{2,5}$, PM_5 sont respectivement égales à 17 %, 40 % et 77 % pour P_1 et 15 %, 53 % et 83 % pour P_2 .

Les résultats de l'analyse en ICP-AES des prélèvements P_1 et P_2 (tableau I) ont montré une présence de nombreux éléments inorganiques avec majoritairement des éléments comme le Ca, Al, Na, Fe, Mg, Ti inégalement répartis. En effet, les teneurs de certains éléments comme le Ca, Al, Mg et K sont plus élevées à Faidherbe, alors que pour d'autres, comme le Na, Fe et Cr, elles sont plus importantes à Fann.

L'analyse par chromatographie ionique des PM a permis d'identifier certains ions dits majeurs (tableau II). Les teneurs obtenues sur les deux sites sont plus importantes pour les cations que pour les anions, à l'exception du F^- qui présente des teneurs importantes respectivement de 29,2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ et 33,8 $\mu\text{g}/\text{mg}$ pour Fann et Faidherbe. Le ratio Cl^-/Na^+ obtenu est respectivement de 0,2 et 0,3 pour Fann et Faidherbe.

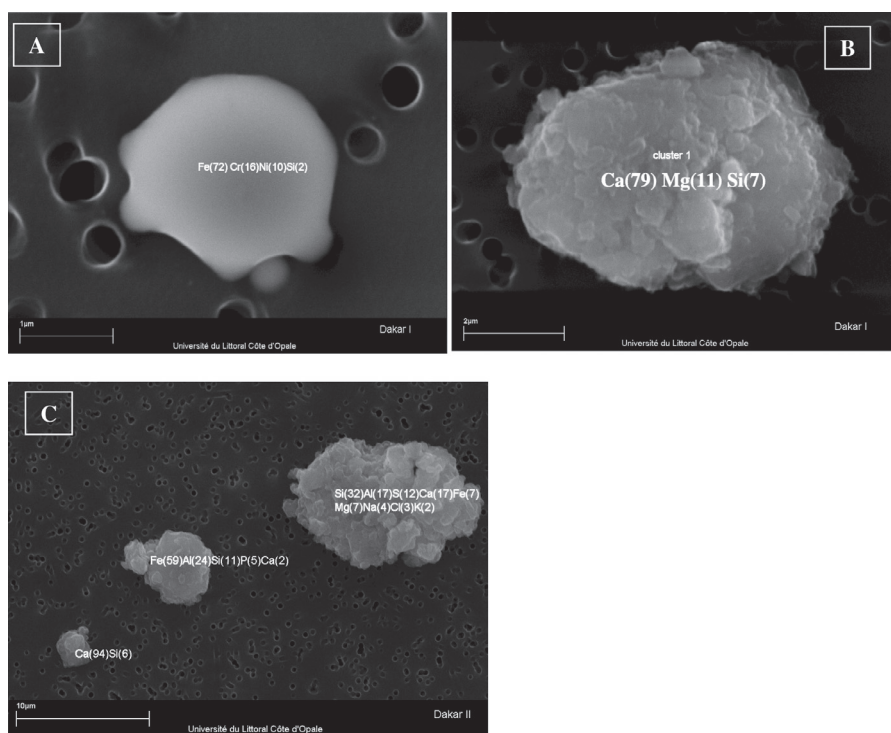


Fig. 1. Observation en microscopie électronique à balayage de particules P₁ (A et B) et P₂ (C).

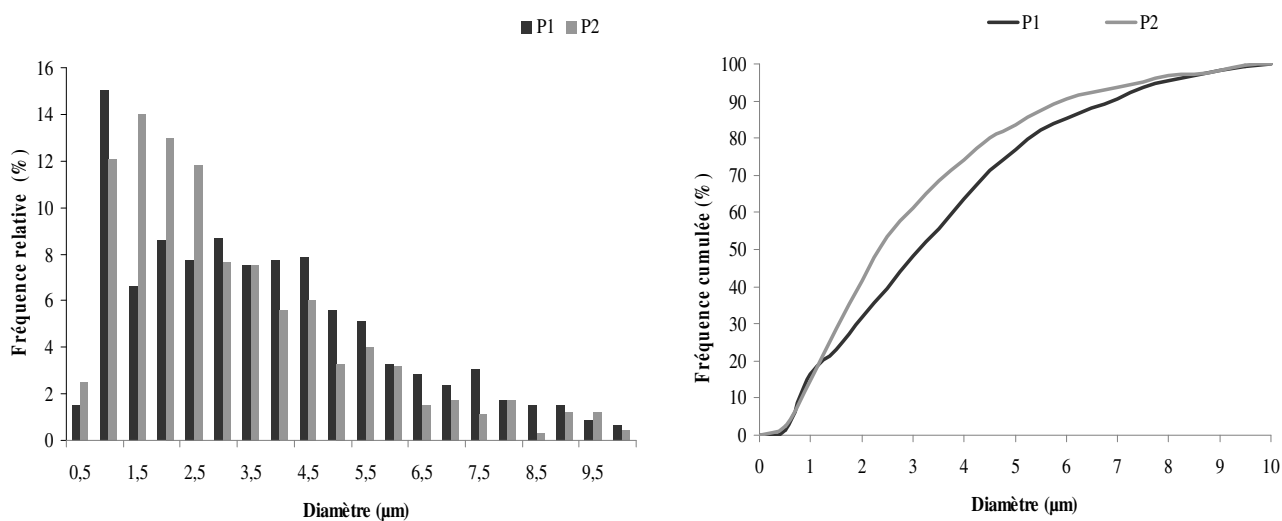


Fig. 2. Distribution granulométrique, exprimée en fréquences relatives et en fréquence cumulée des particules P₁ et P₂ prélevées à Dakar.

Les résultats présentés dans le tableau III montrent les concentrations en HAP et en composés organiques désorbés (paraffines) dans les deux prélèvements P₁ et P₂. Il apparaît que les teneurs totales en HAP obtenues sont en moyenne 8 fois plus élevées pour P₁ (414,68 μg/g) que pour P₂ (49,62 μg/g). Les teneurs totales en paraffines suivent la même tendance avec des concentrations plus importantes pour les particules P₁ (258,71 μg/g) que pour P₂ (51,61 μg/g).

3.2 Résultats de la cytotoxicité

La figure 3 montre l'incorporation de la BrdU par les A549 incubées en présence de concentrations croissantes de particules P₁ et P₂ pendant 24, 48 et 72 h. On note une diminution significative de l'incorporation de la BrdU pour les cellules exposées aux concentrations 24 et 48 μg/cm² de P₁ et P₂ et ce indépendamment du temps d'incubation.

Tableau I. Composition des particules en éléments inorganiques.

Composés inorganiques	Teneurs en pourcentage (%) de masse	
	Fann (P ₁)	Faidherbe (P ₂)
Ca	6,91	7,43
Al	5,45	6,00
Na	4,36	3,76
Fe	4,01	3,84
Mg	1,01	1,31
K	0,78	1,06
Ti	0,37	0,27
Cr	0,15	0,14
Mn	0,06	0,06
Zn	0,04	0,06
Ni	0,03	0,03
Cu	0,02	0,02
Pb	0,01	0,03
V	0,01	0,01
Cd	< LD	< LD
Co	< LD	< LD

< LD : limite de détection

La figure 4 montre que la diminution significative de l'activité de la DHm est non seulement fonction de la concentration mais aussi fonction du temps d'incubation (24 h, 48 h, 72 h) pour les cellules exposées aux concentrations 12, 24 et 48 µg/cm² de P₁ et aux concentrations 24 et 48 µg/cm² de P₂.

L'activité de la LDH extra-cellulaire a augmenté de façon significative en fonction de la concentration, indépendamment du temps d'exposition des cellules A549 aux particules P₁. En revanche, dans les cellules exposées aux particules P₂, la LDH augmente significativement en fonction de la concentration et du temps (figure 5).

La méthode de l'efficacité de clonage a montré une mortalité significative des cellules A549 exposées aux concentrations de particules supérieures ou égales à 12 µg/cm² (*p* < 0,05) pour P₁ et 24 µg/cm² (*p* < 0,05) pour P₂ (figure 6). Cette méthode a permis de déterminer les concentrations létales 10 % et 50 % des particules P₁ (CL₁₀ = 5,11 µg/cm² et CL₅₀ = 25,56 µg/cm²) et P₂ (CL₁₀ = 5,59 µg/cm² et CL₅₀ = 27,97 µg/cm²).

4 Discussion

Les particules urbaines ont un impact majeur sur la qualité de l'air et la santé des populations, notamment les particules dites fines (PM_{2,5}) et ultrafines (PM₁), majoritairement émises en milieu urbain par les véhicules [7]. Depuis une dizaine d'années, les preuves d'une relation causale entre les variations,

Tableau II. Concentrations des ions solubles obtenus dans les PM après analyse par chromatographie ionique.

Espèces ioniques	Concentrations (µg/mg)	
	Fann (P ₁)	Faidherbe (P ₂)
Na ⁺	50,2	37,8
NH ₄ ⁺	31,8	37,4
K ⁺	29,6	23,5
Mg ²⁺	29,6	23,5
Ca ²⁺	29,2	33,8
F ⁻	29,2	33,8
Cl ⁻	11,5	10,7
NO ₃ ⁻	3,5	3,0
SO ₄ ²⁻	2,1	2,7

Tableau III. Composition des particules en HAP et en composés organiques désorbés (paraffines).

	Fann P ₁	Faidherbe P ₂
HAP (µg.g ⁻¹)		
Chrysene	94,96	3,02
Benzo(a) anthracene	88,25	1,80
Benzo(k) fluoranthene	81,65	4,93
Benzo(b) fluoranthene	70,58	2,86
Benzo(a)pyrene	37,56	< LD
Indeno (1,2,3 cd)pyrene	13,20	8,47
Benzo (ghi) perylene	10,35	9,70
Pyrene	6,42	10,34
Fluoranthene	5,64	< LD
Dibenzo (ah) anthracene	5,38	< LD
Naphtalene	0,70	1,07
Phenanthrene	< LD	4,46
Anthracene	< LD	2,96
Total HAP	414,68	49,62
Paraffines (µg.g ⁻¹)		
Docosane (C22)	81,24	10,86
Heneicosane (C21)	73,66	13,96
Eicosane (C20)	48,70	8,79
Nonadecane (C19)	24,47	5,07
Tricosane (C23)	12,93	< LD
Octadecane (C18)	8,24	2,56
Heptadecane (C17)	8,10	8,72
Hexadecane (C16)	1,37	1,65
Total paraffines	258,71	51,61

LD : limite de détection

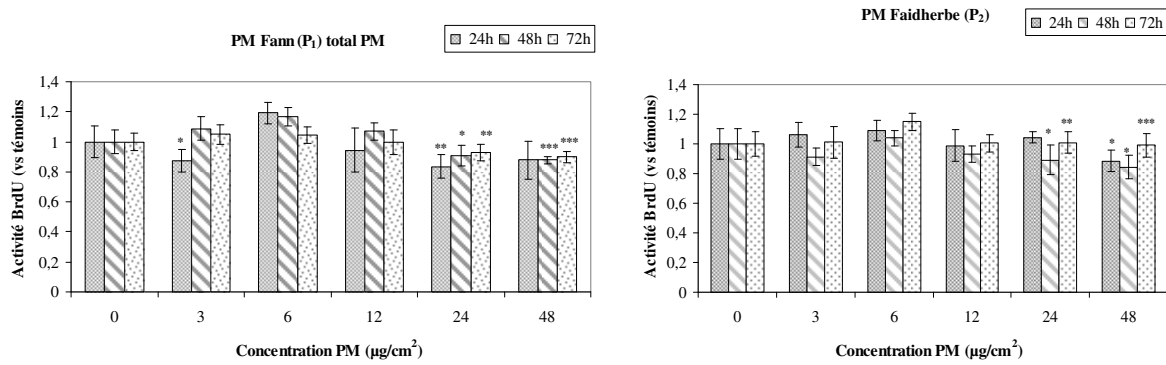


Fig. 3. Incorporation de la Bromo-2'-désoxyUridine (BrdU) dans les cellules A549 exposées à des concentrations croissantes de particules de Fann (P1) et Faidherbe (P2) après 24, 48 et 72 heures (Test *U* de Mann Whitney ; vs témoins ; * : 0,01 < *p* < 0,05 ; ** : 0,001 < *p* < 0,01 ; *** : *p* < 0,001).

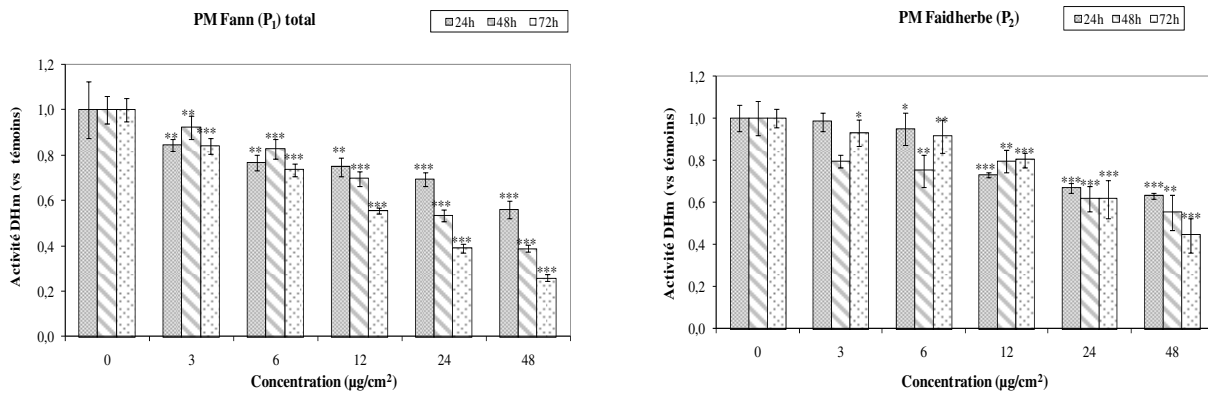


Fig. 4. Activité de la déshydrogénase mitochondriale (DHm) dans les cellules A549 exposées à des concentrations croissantes de particules de Fann (P1) et Faidherbe (P2) après 24, 48 et 72 heures (Test *U* de Mann Whitney ; vs témoins ; * : 0,01 < *p* < 0,05 ; ** : 0,001 < *p* < 0,01 ; *** : *p* < 0,001).

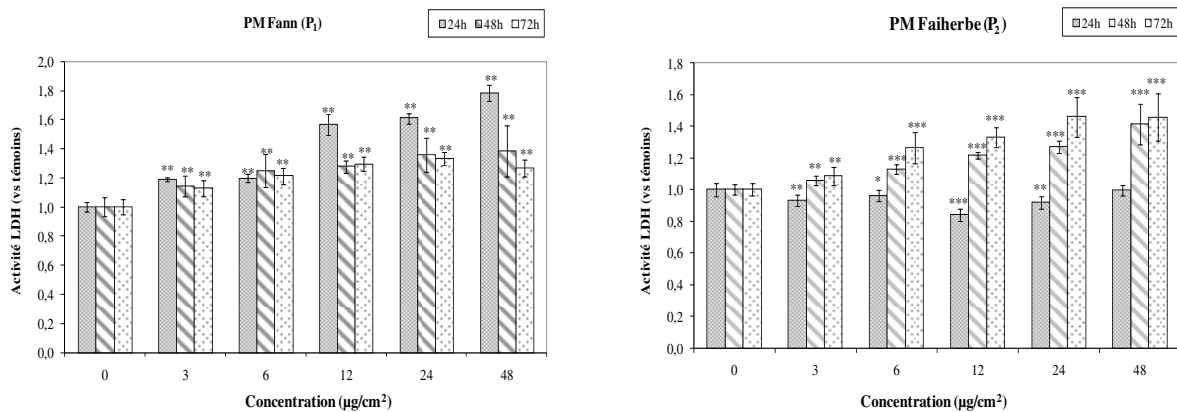


Fig. 5. Activité de la Lactico-déshydrogénase extra-cellulaire dans les cellules A549 exposées à des concentrations croissantes de particules de Fann (P1) et Faidherbe (P2) après 24, 48 et 72 heures (Test *U* de Mann Whitney ; vs témoins ; * : 0,01 < *p* < 0,05 ; ** : 0,001 < *p* < 0,01 ; *** : *p* < 0,001).

à court terme, des niveaux de pollution atmosphérique et l'incidence de diverses manifestations morbides, voire un excès de mortalité, ont été établies par plusieurs études épidémiologiques [18, 19]. Cependant, il est difficile d'interpréter les résultats de ces études épidémiologiques en l'absence d'une caractérisation

physico-chimique dépendante de l'origine des particules et des mécanismes physiopathologiques sous-jacents responsables des effets délétères encore peu connus. Néanmoins, les nombreuses études effectuées dans les pays développés ont permis de mettre en place des mesures pour l'amélioration de la qualité

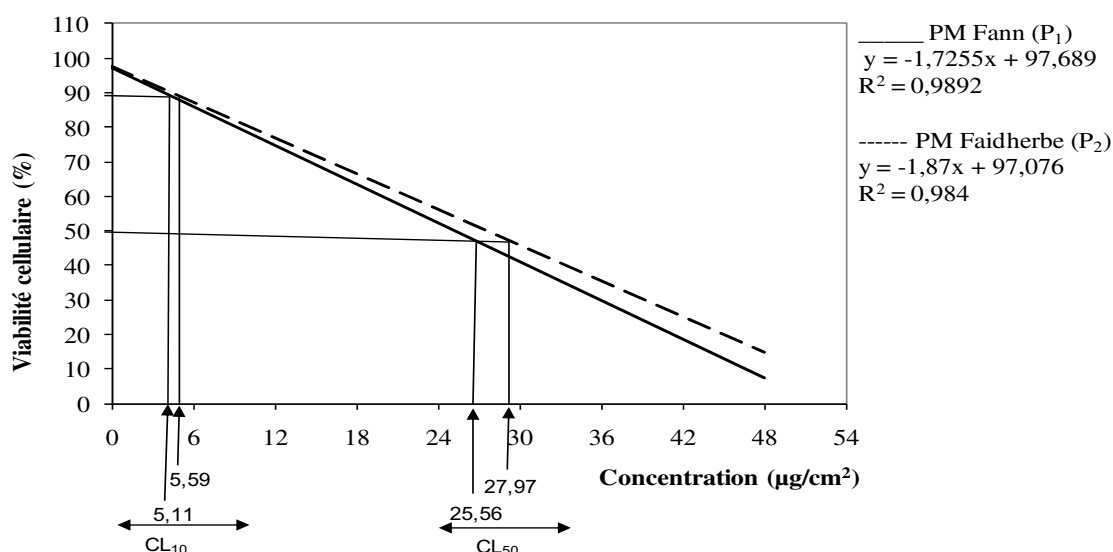


Fig. 6. Taux de survie des cellules A549 exposées aux particules P1 de Fann et P2 de Faïdherbe pendant 9 jours. Détermination des concentrations létales à 10 % et à 50 %.

de l'air ; ce qui n'est pas le cas en Afrique subsaharienne où les données sur la pollution sont quasi inexistantes [3].

Notre travail a donc consisté à réaliser une caractérisation physico-chimique de prélèvements de particules en zone urbaine dans la ville de Dakar, et à déterminer leur cytotoxicité globale à partir de quatre tests complémentaires : incorporation de la BrdU, activité de la DHm, activité de la LDH extracellulaire et efficacité de clonage.

Les particules ont été collectées à l'aide d'un impacteur en cascade à haut débit sur deux sites urbains : Fann (prélèvements P₁) et Faïdherbe (prélèvements P₂), caractérisés par un trafic automobile important.

Les concentrations journalières de PM_{2,5} obtenues (45,31 µg/m³ à Fann et 94,45 µg/m³ à Faïdherbe) sont largement supérieures à la valeur standard de la qualité de l'air ambiant (NAAQS) (15 µg/m³) de l'agence américaine pour l'environnement (US EPA) et à la valeur guide de l'OMS (10 µg/m³), indiquant que la ville de Dakar présente une pollution importante. L'analyse granulométrique (figure 2) a permis d'obtenir les fréquences cumulées des PM₁, PM_{2,5} et PM₅ respectivement égales à 17 %, 39 % et 77 % pour les particules prélevées à Fann (P₁) et 15 %, 53,5 % et 83,4 % pour les particules prélevées à Faïdherbe (P₂). Ces résultats montrent que les PM_{2,5} sont plus importantes à Fann qu'à Faïdherbe. De nombreuses études ont montré que les PM_{2,5}, du fait de leur faible diamètre, peuvent pénétrer jusqu'aux alvéoles pulmonaires où elles peuvent exercer des effets délétères [20, 21]. La caractérisation chimique des particules a révélé la présence de divers éléments inorganiques (tableau I). Les résultats sont globalement homogènes sur les deux sites avec majoritairement des éléments comme le Ca, Al, Na, Fe, Mg, K, Ti, Cr. Certains éléments proviendraient de sources naturelles (Ca, Na, Mg...), alors que d'autres auraient plutôt une origine anthropique (Al, Fe, Cr, Zn, Pb...). L'analyse

par chromatographie ionique a montré la présence d'ions majeurs Cl⁻, Na⁺, Mg²⁺, K⁺, SO₄²⁻ et NO₃⁻ dans les prélèvements P₁ et P₂ (tableau II). Parmi ces ions, certains sont reconnus pour leur origine naturelle (Cl⁻, Na⁺, Mg²⁺, K⁺), alors que d'autres comme le SO₄²⁻ et NO₃⁻ sont plutôt reconnus pour leur origine anthropique, notamment par l'utilisation de l'énergie fossile, donc du trafic automobile [22]. Le ratio molaire Cl⁻/Na⁺ est un bon indicateur de la contribution marine [23]. Les valeurs obtenues 0,2 et 0,3 respectivement pour Fann et Faïdherbe indiquent une déficience en chlore dans la formation du sel marin. Ceci pourrait se justifier par le fait que le Cl⁻ est utilisé lors des réactions rapides du NaCl avec les acides sulfurique et nitrique lorsque l'humidité relative est comprise entre 50–100 %, contribuant ainsi à la production du HCl gazeux [24]. En effet, l'humidité relative moyenne de cette période est de 79 % [25].

L'analyse des particules par GC-MS montre que les prélèvements effectués à Fann (P₁) sont plus riches en HAP et en paraffines que ceux de Faïdherbe (P₂) (tableau III). Les teneurs en HAP sont 8 fois plus importantes dans les prélèvements P₁ que dans P₂, quant à celles des paraffines, elles sont 5 fois plus importantes pour P₁ que pour P₂. Les fortes concentrations en composés organiques sur les particules P₁ prélevées à Fann pourraient s'expliquer par la présence des véhicules « cars rapides » sur ce site. En effet, ces véhicules sont vétustes ; 70 % d'entre eux ont plus de 10 ans, et 90 % consomment encore du carburant diesel [14]. Des études antérieures ont montré que ces véhicules contribuent grandement au rejet des composés organiques dans l'air en milieu urbain [7, 26].

Les particules fines adsorbent également à leur surface des composés organiques pouvant ainsi augmenter leur toxicité [27, 28]. Celle-ci a été déterminée en utilisant des tests de cytotoxicité globale (incorporation de la 5-bromo-2'-désoxyuridine (BrdU), l'activité de la déshydrogénase mitochondriale (DHm),

l'activité de la lactico-déshydrogénase extra-cellulaire (LDH) et l'efficacité de clonage) sur des cellules A549. Ainsi l'incorporation de la BrdU a diminué significativement dans les cellules exposées aux particules P₁ et P₂ aux concentrations 24 et 48 µg/cm² (figure 3), indépendamment du temps d'incubation. De même, une diminution de l'activité de la DHm dans les cellules exposées aux particules P₁ et P₂ a été observée. Cette baisse est significative dans les cellules exposées aux concentrations égales ou supérieures à 3 µg/cm² pour les particules P₁ et 6 µg/cm² pour celles de P₂ (figure 4). Cette diminution de la DHm s'effectue également en fonction du temps dans les cellules exposées aux concentrations 24 et 48 µg/cm², notamment pour les cellules exposées aux particules de Fann (P₁) où la circulation est majoritairement faite de voitures de transport en commun. La plus forte baisse est observée dans les cellules exposées à la concentration maximale 48 µg/cm² de particules P₁ après 72 h d'incubation. Ces résultats de la BrdU et de la DHm montrent la capacité des particules P₁ et P₂ à altérer la division cellulaire et le métabolisme mitochondrial.

Ces mêmes particules P₁ et P₂ ont provoqué une augmentation de l'activité de la LDH extra-cellulaire (figure 5) en fonction de la concentration, hausse qui est significative dès la concentration 3 µg/cm², indépendamment du temps d'incubation. Cette augmentation traduit ainsi une perturbation de l'intégrité et/ou de la perméabilité membranaire.

Afin de conforter ces observations, des courbes de survie cellulaire ont été réalisées pour les deux prélèvements, grâce à la méthode de l'efficacité de clonage. Les résultats ont permis de constater une mortalité significative des cellules A549 exposées particules P₁ et P₂ (figure 6). Les concentrations létales 10 % et 50 % des particules P₁ (CL₁₀ = 5,11 µg/cm² et CL₅₀ = 25,56 µg/cm²) et P₂ (CL₁₀ = 5,59 µg/cm² et CL₅₀ = 27,97 µg/cm²) ont pu être déterminées grâce à cette méthode.

L'ensemble de ces résultats met en évidence le mélange complexe et hétérogène d'éléments inorganiques et de composés organiques des particules prélevées à Dakar. Il a été démontré que les métaux de transition tels que le Co, Cu, Fe, Mn, Ni... induisent la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) comme le radical hydroxyle et l'anion superoxyde, après l'inhalation et le dépôt des particules sur les alvéoles pulmonaires [12]. Ces ERO se fixent sur les lipides et les protéines membranaires, et même l'ADN, entraînant leur destruction et pouvant aboutir à la mort cellulaire par apoptose ou nécrose. Les teneurs importantes de métaux de transition dans les prélèvements de Dakar pourraient justifier les résultats observés dans l'étude de la cytotoxicité globale, notamment l'altération de la division cellulaire et du métabolisme mitochondrial, ainsi que la perturbation de l'intégrité et/ou de la perméabilité membranaire.

Il a été décrit que des phénomènes d'addition, de synergie et même d'antagonisme peuvent s'observer dans les effets induits par les différents composés (inorganiques et organiques) présents dans les particules. L'activation métabolique des composés organiques présents à la surface des PM pourrait être influencée par les éléments inorganiques [29]. L'étude réalisée

par l'équipe de Vakharia *et al.* [30] a mis en évidence une augmentation de l'internalisation des HAP lors d'une exposition concomitante avec divers métaux comme As, Hg, Cd, Pb... Au cours de cette phase, interviennent des enzymes, notamment la famille multigénique des Glutathion S-Transférases (GST). Ces enzymes ont pour substrat des composés chimiques contenant un groupement électrophile hautement réactif vis-à-vis des protéines, lipides ou acides nucléiques, et donc potentiellement toxiques pour l'organisme [31]. Notre étude a montré une baisse plus importante de l'activité de la DHm dans les cellules exposées aux particules P₁ aux concentrations 24 et 48 µg/cm² après 48 h et 72 h d'incubation. Donc, en plus de l'effet lié à la présence des éléments inorganiques, les composés organiques, très présents dans les particules prélevées à Fann (P₁), auraient accru leur toxicité. En effet, au cours de leur biotransformation, les composés organiques sont convertis en métabolites actifs. Cette phase d'activation se fait grâce aux cytochromes P-450 localisés principalement, chez l'homme, dans les cellules Clara, les pneumocytes I et II (ex : A549), les cellules endothéliales, les macrophages alvéolaires ainsi que les cellules bronchiales ciliées. Ce processus d'activation des composés organiques, nécessitant plus de temps, expliquerait l'apparition tardive de leurs effets (48 h et 72 h).

5 Conclusion

Notre travail se proposait de déterminer les caractéristiques physico-chimiques des particules prélevées dans la ville de Dakar au Sénégal, et d'évaluer leur cytotoxicité sur les cellules A549.

L'analyse chimique a permis de déterminer divers éléments inorganiques présents dans les deux prélèvements urbains (P₁ et P₂). De nombreux éléments potentiellement toxiques ont été retrouvés comme les métaux de transitions (Fe, Cu, Zn, Co...) reconnus comme générateurs de stress oxydant. De même, des composés organiques ont pu être déterminés dans les particules avec une forte proportion obtenue dans les particules P₁. En effet, ces composés sont adsorbés à la surface des particules, et la présence importante de particules fines dans l'échantillon montre que ces composés peuvent atteindre la surface alvéolaire. Leur biotransformation peut aboutir à la formation de métabolites actifs potentiellement toxiques.

L'étude de la cytotoxicité globale a révélé que les particules de Dakar peuvent entraîner une perturbation de la division cellulaire et du métabolisme mitochondrial, tout comme l'altération de l'intégrité membranaire des cellules A549. Ces tests cytotoxiques ont également permis de déterminer la relation dose/effets par laquelle les CL₁₀ et CL₅₀ des deux prélèvements ont pu être déterminées. Cette étude a mis en évidence l'influence des véhicules de transport en commun (ex : « cars rapides ») dans les effets toxiques des particules.

Afin de compléter ce travail, des études sur les mécanismes physiopathologiques (inflammation, stress oxydant, apoptose...) permettraient de mieux comprendre le rôle de la fraction inorganique et de l'activation métabolique des composés organiques.

Remerciements

Les auteurs remercient l'Agence universitaire de la francophonie (AUF) pour le financement des études doctorales de Monsieur Denis Dieme.

Conflits d'intérêts. Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts.

Références bibliographiques

1. Annesi-Maesano I, Daw W. Air pollution and the lung: epidemiological approach. *Med Sci.* 2006; 22: 589–594.
2. Senlin L, Zhenkun Y, Xiaohui C, Mighong W, Guoying S. The relationship between physicochemical characterization and the potential toxicity of fine particulates (PM_{2.5}) in Shanghai atmosphere. *Atm Environ.* 2008; 42: 7205–7214.
3. Cohen A, Anderson R, Ostro B, Pandey KD, Krzyzanowski M, Künzli N. Urban ambient air pollution. In: Ezzati M, Lopea AD, Rogers A, Murray CJL (Coordinators). *Comparative Quantification of Health Risks: Global and Regional Burden of Disease Attributable to Selected Major Risk Factors.* Geneva: WHO, 2004: 1353–433.
4. United Nations, Department of Economic and Social Affairs (population division). *World Urbanization Prospects: the 2003 Revision.* New York: Population Division of the Department of Economic and Social Affairs of the United Nations Secretary, 2004.
5. Kouassi KS, Billet S, Garçon G, Verdin A, Diouf A, Cazier F, Diaman J, Courcot D, Shirali P. Oxydative damage induced in A549 cells by physically and chemically characterized air particulate matter (PM_{2.5}) collected in Abidjan Côte d'Ivoire. *J Appl Toxicol.* 2010; 30: 310–320.
6. WHO. *Preventing disease through healthy environments: Towards an estimate of environmental burden of disease.* Prüss-Ustén A and Corvalan C, Geneva: World Health Organization, 2006.
7. Palmgren F, Wahlin P, Loft S. *The pollution of air with Particulates in Copenhagen,* Ministry of the Environment, Copenhagen (in Danish) 2003.
8. Osornio-Vargas AR, Bonner JC, Alfaro-Moreno E, Martinez L, García-Cuellar C, Ponce-de-Leon Rosales S, Miranda J, Rosas I. Proinflammatory and cytotoxic effects of Mexico city air pollution particulate size and composition. *Environ Health Perspect.* 2003; 111: 1289–1293.
9. Vinitkumnuen U, Kalayanamitra K, Chewonarin T, Kamens R. Particulate matter, PM₁₀ & PM_{2.5} levels, and airborne mutagenicity in Chiang Mai, Thailand. *Mutat Res.* 2002; 519: 121–131.
10. Garçon G, Dagher Z, Zerimech F, Ledoux F, Courcot D, Aboukais A, Puskaric E, Shirali P. Dunkerque city air pollution particulate matter-induced cytotoxicity, oxidative stress and inflammation in human epithelial lung cells (L132) in culture. *Toxicol In Vitro.* 2006; 20: 519–528.
11. Billet S, Garçon G, Dagher Z, Verdin A, Ledoux F, Cazier F, Courcot D, Aboukais A, Shirali P. Ambient particulate matter (PM_{2.5}): Physicochemical characterization and metabolic activation of the organic fraction in human lung epithelial cells (A549). *Environ Res.* 2007; 105: 212–223.
12. Fubini B, Hubbard A. Reactive oxygen species (ROS) and reaction nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. *Radic Biol Med.* 2003; 34: 1507–1516.
13. Diouf A, Garçon G, Diop Y, Ndiaye B, Thiaw C, Fall M, Kane-Barry O, Bâ D, Haguenoer JM, Shirali P. Environmental lead exposure and its relationship to traffic density among Senegalese children: a cross-sectional study. *Hum Exp Toxicol.* 2006; 25: 637–644.
14. Banque Mondiale. *Initiative sur la qualité de l'air dans les villes de l'Afrique sub-saharienne.* Rapport d'avancement 1998–2002, 2003.
15. Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst.* 1973; 51: 1417–1423.
16. Dagher Z, Garçon G, Gosset P, Ledoux F, Surpateanu G, Courcot D, Aboukais A, Puskaric E, Shirali P. Pro-inflammatory effects of Dunkerque city air pollution particulate matter 2.5 in human epithelial lung cells (L132) in culture. *J Appl Toxicol.* 2005; 25: 166–175.
17. Shirali P, Gosset P, Marez T, Hachimi A, Muller JF, Haguenoer JM. Cytotoxicity evaluation of hematite (Fe₂O₃), benzo(a)pyrene and pyrene and analysis of particles by laser microprobe mass analyser (in vitro). *Cell Biol Toxicol.* 1995; 11: 215.
18. Brunekreef B, Holgate S. Air pollution and health. *Lancet.* 2002; 360: 1233–1242.
19. Pope CA III, Burnett RT, Thurston GD, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Godleski JJ. Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air pollution: epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease. *Circulation.* 2004; 109: 71–77.
20. Harrison RM, Yin J. Particulate matter in the atmosphere: which particle properties are important for its effect on health. *Sci Total Environ.* 2000; 248: 85–101.
21. Oh SM, Kim HR, Park YJ, Lee SY, Chung KH. Organic extracts of urban air pollution particulate matter (PM_{2.5})-induced genotoxicity and oxidative stress in human lung bronchial epithelial cells (BEAS-2B cells). *Mutat Res.* 2011; 723: 142–151.
22. Khoder MI. Atmospheric conversion of sulfur dioxide to particulate sulphate and nitrogen dioxide to particulate nitrate and gaseous nitric acid in an urban area. *Chemosph.* 2002; 49: 675–684.
23. Khan MF, Shirasuna Y, Hirano K, Masunaga S. Characterization of PM_{2.5}, PM_{2.5-10} and PM_{>10} in ambient air, Yokohama, Japan. *Atm Res.* 2010; 96: 159–172.
24. Finlayson-Pitts BJ, Pitts J. *Analytical methods and typical atmospheric concentrations for gases and particles, in chemistry of the upper and lower atmosphere.* San Diego: Academic Press, 2000: 547–656.
25. ANMS: Agence Nationale de la Météorologie du Sénégal, 2008.
26. Cerna M. Mutagenicity monitoring of airborne particulate matter PM₁₀ in the Czech Republic. *Mutat Res.* 1999; 444: 373–386.

27. Mill NL, Tornqvist H, Gonzalez MC, Vink E, Robinson SD, Soderberg S, Boon N, Donaldson K, Sandstrom T, Blomberg A, Newby DE. Ischemic and thrombotic effect of dilute diesel exhaust inhalation in men with coronary heart disease. *New Engl J Med.* 2007; 357 :1075–1082.
28. Shao L, Shi Z, Jones T, Li J, Whittaker A, BeruBe K. Bioreactivity of particulate matter in Beijing air: results from plasmid DNA assay. *Sci Total Environ.* 2006; 367: 261–272.
29. Garçon G, Gosset P, Maunit B, Casset A, Hannotiaux MH, Müller JF, Shirali P. Mécanismes cellulaires de la synergie d'action de polluants atmosphériques (Fe_2O_3 et HPA) dans l'apparition de cancer broncho-pulmonaire. *Rev Fr Lab.* 2003; 349: 59–68.
30. Vakharia D, Liu N, Pause R, Fasco M, Bessette E, Zhang QY, Kaminsky LS. Effect of metals on polycyclic aromatic hydrocarbon induction of CYP1A1 and CYP1A2 in human hepatocyte cultures. *Toxicol Appl Pharm.* 2001; 170: 93–103.
31. Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1995; 30: 445–600.
32. Cohen AJ, Ross Anderson H, Ostro B. The global burden of disease due to outdoor air pollution. *J Toxicol Environ Health A.* 2005; 68: 1301–1307.
33. McNeilly JD, Heal M, Beverland I, Howe A, Gibson M, Hibbs L, MacNee W, Donaldson K. Soluble transition metals cause the pro-inflammatory effects of weldig fumes in vitro. *Toxicol Appl Pharm.* 2004; 196: 95–107.