

# Développement de marqueurs de toxicité en lien avec les pathologies pulmonaires induites par la pollution atmosphérique

Août 2025

**L**Ineris est un acteur important dans le domaine de la qualité de l'air ambiant, son activité va de la caractérisation des sources jusqu'aux effets sanitaires (Figure 1). Pour renforcer son dynamisme dans cette thématique, l'accent a été mis, dans le contrat d'objectifs et de performances 2021-2025, sur l'identification et la caractérisation des effets toxicologiques des particules et composés chimiques, et notamment d'un potentiel impact pulmonaire à long terme, se traduisant entre autres choses par le développement de marqueurs de toxicité en lien avec les pathologies pulmonaires induites par la pollution atmosphérique.

La pollution atmosphérique est un mélange complexe de différentes entités chimiques présentes sous forme de gaz, d'aérosols et de particules, très variable sur le plan spatio-temporel. De nombreux travaux de recherche ont mis en évidence un lien de causalité entre l'exposition à la pollution de l'air et la morbidité et mortalité des populations [1]. Il est en effet bien documenté que la pollution de l'air peut-être à l'origine de nombreuses pathologies, en particulier sur le plan cardio-respiratoire soit en les provoquant, soit en les aggravant [2, 3]. Au niveau des pathologies respiratoires induites par la pollution atmosphérique, on peut citer les affections en lien avec le remodelage pulmonaire (emphysème, fibrose), les cancers ou les allergies [2]. L'étude du rôle de la pollution de l'air dans la survenue ou l'aggravation de ces pathologies passe par la mise en place de marqueurs de toxicité, qui sont des mesures biologiques rendant compte de processus (stress oxydant, inflammation...) jouant un rôle dans l'effet délétère recherché. Différentes approches peuvent être mises en place, allant des études expérimentales (*vivo/vitro*) à la modélisation (*in silico*), pouvant être combinées dans des approches définies de type IATA (« Integrated Approaches to Testing and Assessment ») (Figure 2).

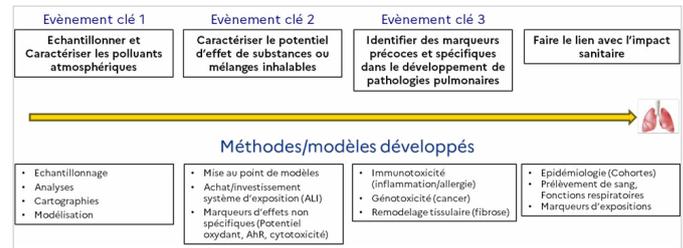


Figure 1 / Compétences développées à l'Ineris dans la qualité de l'air, un continuum allant de la caractérisation physico-chimique des polluants au lien avec l'impact sanitaire

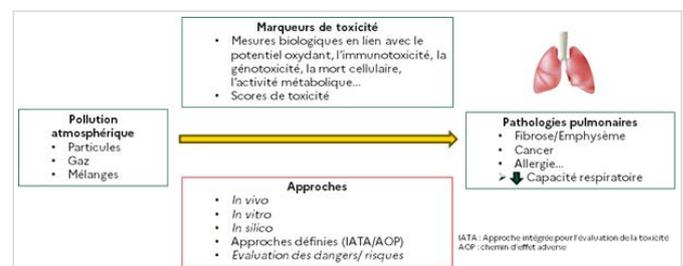


Figure 2 / Approches expérimentales et marqueurs de toxicité pour faire le lien entre pollution atmosphérique et pathologies pulmonaires

La survenue d'une pathologie résulte de cascades d'évènements se produisant au niveau moléculaire, cellulaire, tissulaire, de l'organe... qui sont pour certains bien connus et documentés. Les AOP (« Adverse Outcome Pathways»), conceptualisés à la fin des années 2000 [4], permettent de schématiser certaines étapes clés à différents niveaux d'organisation biologique et leur relation de cause à effet dans le développement d'un effet indésirable (pathologie) (Figure 3).

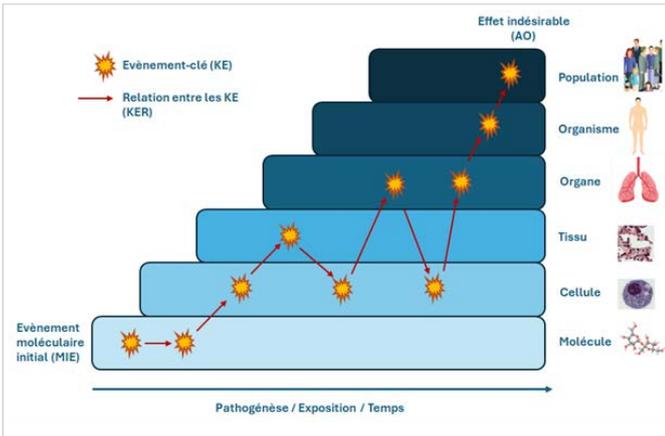


Figure 3 / Le concept d'AOP (Adverse Outcome Pathways), de l'évènement moléculaire initiateur à l'effet indésirable (pathologie) (adapté de [5])

Au sein d'un AOP, chaque étape clé dans le développement d'une pathologie (par ex. induction d'un stress oxydant cellulaire), peut être caractérisée par la mesure d'un ou plusieurs marqueurs de toxicité (par ex. la mesure d'espèces réactives de l'oxygène intracellulaire). Les étapes clés sont liées entre elles dans une relation de cause à effet, ce qui fait des AOP des outils idéaux pour l'identification de marqueurs de toxicité (=biomarqueurs d'effets) potentiellement intéressants à investiguer.

Plus on se situe au début de la cascade d'évènements, plus la spécificité et le potentiel prédictif des marqueurs d'effets quant à la survenue de la pathologie va être faible. Ainsi, par exemple, l'inflammation ou le stress oxydant sont des événements clés (processus) communs à de nombreuses pathologies (marqueurs associés : mort cellulaire, mesure de cytokines pro-inflammatoires ou espèces réactives de l'oxygène) qui indiquent un stress ou une réaction de défense de l'organisme suite à l'inhalation de polluants, mais ils ne prédisent en aucun cas la survenue d'un effet indésirable de type pathologie pulmonaire. D'ailleurs, ce sont des processus réversibles et c'est le maintien dans le temps du processus (en cas d'exposition répétée ou de bio-persistence) qui augmente les risques de développer la pathologie.

A contrario, plus on est proche de l'effet indésirable, plus le biomarqueur d'effet mesuré est spécifique et prédictif de la mise en place de la pathologie considérée. Par exemple, un dépôt de collagène au niveau pulmonaire est évocateur d'une fibrose pulmonaire (Figure 4).

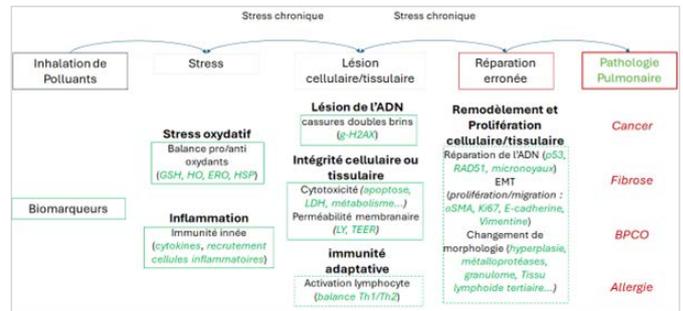


Figure 4 / Évènements clés (et marqueurs de toxicité associés) dans le processus de développement de pathologies pulmonaires après inhalation de polluants

Récemment, l'Ineris a exploré la possibilité d'utiliser des nouvelles approches méthodologiques, dont les AOP, afin d'explorer la survenue d'effets loco-régionaux (telle que la fibrose pulmonaire) à la suite d'une exposition par inhalation (<https://www.ineris.fr/fr/nouvelles-approches-methodologiques-nam-prise-compte-effets-locaux-evaluation-dangers-inhalation>). Cette approche numérique (*in silico*), couplée à des données de toxicité obtenues par des expérimentations *in vitro* ou *in silico* ciblant des événements moléculaires initiateurs (Molecular Initiating Event, MIE) ainsi que des étapes clés (Key Event, KE) de l'AOP, pourrait permettre d'identifier les substances susceptibles d'induire une fibrose pulmonaire. Elle nécessite toutefois d'être raffinée pour augmenter sa pertinence.

Ces dernières années, plusieurs projets expérimentaux de l'Institut ont porté sur la mise en place et l'utilisation de marqueurs de toxicité dans deux contextes différents mais complémentaires :

1. Pour la caractérisation du potentiel d'effet de substances ou mélanges inhalables (étape 2 de la Figure 1),
2. Pour évaluer le risque de développer une pathologie pulmonaire après inhalation de polluants (étape 3 de la Figure 1).

Ces projets sont décrits ci-après.

## Développement de marqueurs de toxicité pour la caractérisation du potentiel d'effet de substances ou mélanges inhalables

Dans ce contexte, l'utilisation de marqueurs de toxicité permet de caractériser et de comparer/classer différents prélèvements atmosphériques du point de vue de leur capacité à induire un stress sur l'organisme. L'objectif sous-jacent est de fournir des informations sur les sites à surveiller/dépolluer en priorité. Il ne s'agit pas de prédire un effet avéré sur la santé. Dans ce cas précis, il est donc plus pertinent d'utiliser des marqueurs de

toxicité communs à de nombreuses pathologies (ex. marqueurs d'inflammation ou de stress oxydant), c'est-à-dire représentatifs d'événements précoces dans le développement des pathologies plutôt que de cibler une spécificité/prédictivité.

C'est la démarche suivie dans le projet ToxInTransport (2019-2022, ADEME-Impact). L'objectif était d'évaluer l'apport des méthodes de caractérisation de la toxicité des particules issues de micro-environnements ferroviaires, en complément de méthodes de caractérisation physico-chimiques, pour classer différents environnements ferroviaires en fonction de leur capacité à induire un potentiel stress biologique. Les marqueurs de toxicité recherchés étaient en lien avec la mort cellulaire (cytotoxicité), l'inflammation (dosage de cytokines) et le stress oxydant (mesure d'espèces réactives de l'oxygène dans les cellules). Deux campagnes de prélèvements ont ainsi été menées en gare ferroviaire souterraine ou dans une rame de RER (Figure 5).



Figure 5 / Méthodologie suivie pour les campagnes de prélèvements dans le projet ToxInTransport

Les analyses chimiques ont permis de quantifier certains polluants présents dans les prélèvements atmosphériques (ceux recherchés) et les tests de toxicité *in vitro*, menés sur des cellules pulmonaires, ont apporté des éléments complémentaires concernant un potentiel stress cellulaire, en considérant l'effet global du mélange de polluants (effet cocktail). Les résultats des marqueurs de toxicité sont particulièrement informatifs, et apportent une dimension supplémentaire dans le cas où les concentrations en polluants des échantillons prélevés dans les différents environnements sont plus ou moins importantes en fonction de la famille de polluants (par ex ; peu de métaux et beaucoup de HAP versus beaucoup de métaux et peu de HAP). En effet, il est difficile, sur la base des seules analyses chimiques, de dire quel échantillon est le plus problématique. Dans ce cas précis, il a été montré que c'était l'échantillon chargé en HAP et peu chargé en métaux qui avait induit le plus de mortalité cellulaire. Ce projet a également permis de montrer que, dans nos conditions expérimentales, la mesure des espèces oxygénées réactives (ROS) intracellulaires a permis de discriminer des micro-environnements très proches au plan spatio-temporel, possiblement en lien avec la présence de métaux (Figure 6). Cette mesure biologique a permis également de définir la concentration en métaux induisant un stress sur les cellules.

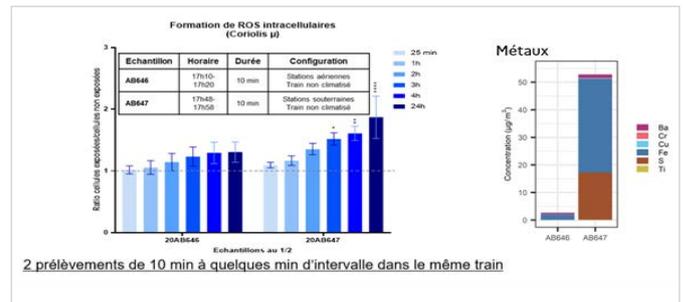


Figure 6 / Mesure des espèces réactives de l'oxygène intracellulaires et teneurs en métaux de deux prélèvements en rame espacés de quelques minutes, l'un en station aérienne et l'autre en station souterraine

L'intérêt d'associer différents marqueurs de toxicité a été mise en évidence dans le cadre du projet SOTOX (2021-2024, astreinte qualité de l'air), qui a pour objectif la comparaison et la compréhension du potentiel toxique des sources majeures contribuant aux épisodes de pollution particulaire de l'air ambiant (Figure 7).

Les premiers résultats du projet ont fait l'objet d'une note consultable ici [Résultats préliminaires du projet SOTOX sur la comparaison et compréhension de la toxicité des sources majeures contribuant aux épisodes de pollution aux particules | Ineris](#)

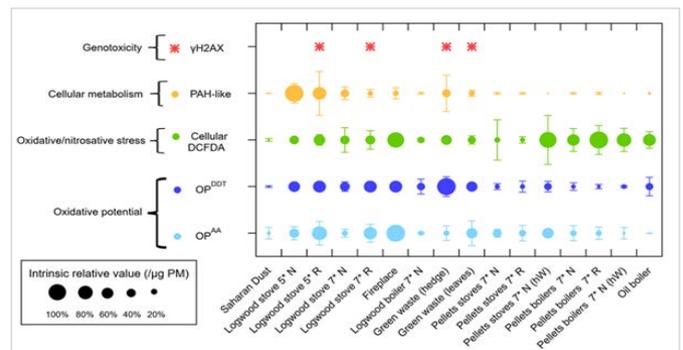


Figure 7 / Mise en évidence de différentes sources de pollution de l'air selon les indicateurs de toxicité

Combiner plusieurs marqueurs de toxicité est donc complémentaire et absolument nécessaire pour avoir une vision globale du potentiel toxique des particules.

La nouvelle directive européenne pour la qualité de l'air ([Directive - UE - 2024/2881 - FR - EUR-Lex](#)) recommande par ailleurs de suivre le potentiel oxydant acellulaire (PO) pour faciliter la compréhension scientifique des effets sur la santé des particules. Des travaux sont toutefois à mener pour aboutir à des protocoles standardisés utilisables par l'ensemble des pays membres. C'est le travail initié dans le cadre du projet RI-Urbans (<https://riurbans.eu/>) et des activités du LCSQA (laboratoire central sur la qualité de l'air) dans lesquels l'Ineris est impliqué.

En conclusion, dans un contexte de caractérisation/comparaison de différents prélèvements/échantillons réalisés

dans des environnements différents, le développement (au sens mise en œuvre) de marqueurs de toxicité en lien avec les pathologies pulmonaires peut apporter des éléments complémentaires à l'analyse physico-chimique en fournissant une réponse sur l'impact potentiel global sur le vivant des échantillons prélevés (prise en compte de l'effet cocktail) et en faisant le lien entre les effets biologiques observés et la présence de certains polluants. Ceci permet *in fine* de « classer » les prélèvements au plan toxicologique et ainsi mieux cibler les (micro)environnements à surveiller/dépolluer en priorité.

## Mise en place de marqueurs de toxicité pour évaluer le risque de développer une pathologie pulmonaire après inhalation de polluants

Cette problématique est tout particulièrement au cœur du projet « fragments de clivage », mené en partenariat avec l'Inserm (2017-2025). Il s'agit d'apporter des réponses sur la dangerosité potentielle des fragments de clivage d'actinolite. Ces derniers sont formés lors d'une contrainte mécanique et peuvent présenter une morphologie de fibres avec la même composition physico-chimique que l'actinolite-amiante (Figure 8). Il s'agit donc de déterminer si ces fragments de clivage, bien qu'issus d'une roche non-asbestiforme, peuvent induire des effets similaires à cette dernière après inhalation (fibrose et cancer).

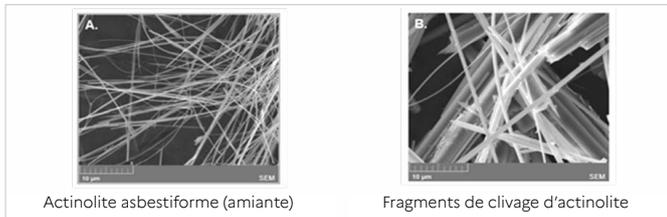


Figure 8 / Morphologie des fibres d'actinolites-amiante (gauche) et des fragments de clivage d'actinolite non asbestiforme (droite)

Pour ce faire, une étude comparative de la toxicité de fragments de clivage d'actinolite et de fibres d'amiante-actinolite a été menée *in vivo* chez le rat. La méthodologie est la suivante :

1. Rechercher des informations sur le mode d'action des fibres inhalées sur le poumon
2. Identifier des biomarqueurs d'intérêt et si nécessaire, développer les méthodes en interne pour les détecter (développement de marqueurs de toxicité *a priori*)
3. Exposer *in vivo* à l'amiante (témoin positif), aux fragments d'actinolite ou au véhicule (témoin négatif)
4. Rechercher si les marqueurs d'effets précédemment sélectionnés s'expriment au niveau du

témoin positif et si oui, comparer à la réponse des animaux exposés aux fragments de clivage

5. Sur les différents groupes, réaliser une analyse non ciblée au niveau des gènes pour identifier d'autres voies de signalisation potentielles qui *in fine*, pourrait conduire au développement d'autres marqueurs toujours en lien avec les pathologies pulmonaires (développement de marqueurs de toxicité *a posteriori*)

Sur la base des connaissances du mode d'action des fibres d'amiante, le schéma suivant a été proposé pour illustrer les événements clés conduisant de l'interaction des fibres avec le poumon aux pathologies de type cancer et fibrose (Figure 9).

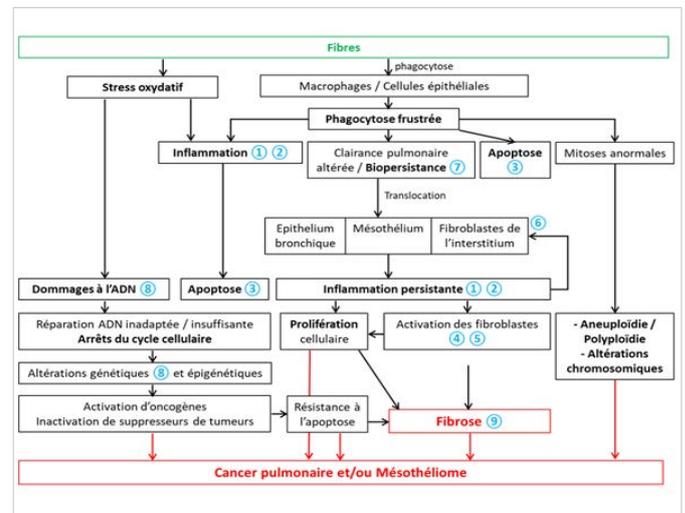


Figure 9 / Processus de développement de la fibrose et du cancer (mésothéliome) induit par les fibres d'amiante

Les marqueurs recherchés *a priori* sont les suivants (le n° se réfère à l'étape identifiée en Figure 9) :

- ① Cellules inflammatoires pulmonaires
- ② Cytokines IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$
- ③ Mort cellulaire par apoptose
- ④ TGF- $\beta$
- ⑤ Collagène
- ⑥ Lésions tissulaires dans les poumons
- ⑦ Recherche de fibres dans les poumons
- ⑧ Marqueur de dommages à l'ADN
- ⑨ Visualisation de fibrose dans le tissu pulmonaire

Il a été montré que certains de ces marqueurs de toxicité se retrouvent chez les rats exposés à l'amiante et dans une moindre mesure aux fragments de clivage. La recherche des voies de signalisation dérégulées pour le développement de futurs marqueurs de toxicité (recherche *a posteriori*) a également montré que l'amiante, et dans une moindre mesure les fragments de clivage, dérégulent de nombreuses voies de signalisation impliquées dans les AOP cancers et/ou fibrose.

Le développement de ces différents biomarqueurs montre que les fragments de clivage ont des effets similaires à l'amiante bien que moins prononcés. Cela questionne sur le potentiel carcinogène des fragments de clivage, ce qui implique des retombées potentielles en santé-travail et santé-environnement. Néanmoins, il est important de souligner que le potentiel carcinogène des fragments ne sera confirmé qu'au travers de la réalisation d'une étude de cancérogénèse, qui s'impose compte-tenu des résultats obtenus avec les marqueurs de toxicité.

Au travers de ses projets actuels, l'Ineris poursuit le développement et la mise en place de marqueurs de toxicité. Ainsi, en partenariat avec l'IRBA (Institut de Recherche Biomédicale des Armées), une méthode semi-automatisée a été développée pour quantifier un marqueur de lésions à l'ADN (= marqueur pré-cancéreux) sur cellules pulmonaires et coupes de poumons [6].

## Conclusion-Perspectives

Le développement de marqueurs de toxicité en lien avec des mécanismes entrant en jeu dans le développement de pathologies pulmonaires induites par la pollution atmosphérique permet d'apporter des réponses sur le potentiel toxique d'échantillons ou de substances inhalables. L'utilisation de marqueurs précoces et non spécifiques permet une comparaison et un classement relatif d'environnement différents selon leur potentiel toxique,

sans forcément établir un lien direct vers une pathologie. Le potentiel pathologique est évalué en utilisant des marqueurs de toxicité spécifiques et en lien avec des événements clés proches et directement reliés à l'effet indésirable considéré.

- / Carvalho, H., Air pollution-related deaths in Europe - time for action. *J Glob Health*, 2019. 9(2): p. 020308.
- / Bălă, G.P., et al., Air pollution exposure-the (in)visible risk factor for respiratory diseases. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2021. 28(16): p. 19615-19628.
- / Lee, B.J., B. Kim, and K. Lee, Air pollution exposure and cardiovascular disease. *Toxicol Res*, 2014. 30(2): p. 71-5.
- / Ankley, G.T., et al., Adverse outcome pathways: a conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. *Environ Toxicol Chem*, 2010. 29(3): p. 730-41.
- / Gerloff, K., et al., The Adverse Outcome Pathway approach in nanotoxicology. *Comput Toxicol*, 2017. 1: p. 3-11.
- / Cherrière, M., et al., Rapid assessment of pulmonary genotoxicity induced by pollutant mixtures in vitro at the air-liquid interface using a semi-automated methodology. *Toxicol Lett*, 2024. 399(2): p. S76.