

**Développement d'un modèle cellulaire prédictif du  
rôle des polluants du milieu intérieur dans la survenue  
et la sévérité des allergies respiratoires**

**Development of a cellular model to predict the role  
of indoor air pollutants in the onset and severity  
of respiratory allergies**

Programme PRIMEQUAL

Rapport final complet

Françoise Pons et Stéphane Le Calvé

Responsable du projet de recherche et coordonnées:

Françoise Pons

Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives

UMR 7199 CNRS - Université de Strasbourg

Faculté de Pharmacie

74 route du Rhin

67400 ILLKIRCH

Date de rédaction : 12/02/2013

Date de dernière modification : 22/07/2013

N° de contrat : Q.1-2100049414

Date du contrat : 17 février 2010

## Résumé court en français

L'air intérieur renferme de nombreux **polluants** qui pourraient favoriser l'installation et la gravité de l'**asthme allergique**. L'objectif de notre projet était de développer un modèle cellulaire permettant de prédire l'impact de polluants atmosphériques sur ces maladies. Pour cela, nous avons conçu un système permettant d'exposer des cellules en culture à des concentrations gazeuses connues, stables et reproductibles en **formaldéhyde** (HCHO) et en **dioxyde d'azote** (NO<sub>2</sub>), deux polluants majeurs de l'air intérieur. Ce système permet des expositions uniques ou répétées, d'une durée de 30 min à 2 h, aux polluants seuls ou à leur mélange, avec une mesure en temps réel et en continu des concentrations en polluants dans l'enceinte d'exposition. Nous avons ensuite étudié l'effet aigu et répété du HCHO et du NO<sub>2</sub>, seuls ou en mélange, mais également associés à des **allergènes d'acariens**, sur une variété de **marqueurs de toxicité** dans différents modèles cellulaires d'**épithélium respiratoire**. Nos résultats ont montré que seules des concentrations très élevées en HCHO ou en NO<sub>2</sub>, ou des expositions répétées à ces polluants sont susceptibles d'altérer l'intégrité et les fonctions de l'épithélium respiratoire. Ces résultats n'excluent pas que le HCHO et le NO<sub>2</sub> jouent un rôle dans la survenue et la sévérité des allergies et de l'asthme, aux concentrations rencontrées en milieu intérieur. En effet, plusieurs axes de recherche peuvent être explorés dans le futur, pour améliorer notre outil d'étude de l'impact de la pollution intérieure sur la santé respiratoire. Les résultats de ce projet ont fait l'objet de 2 publications et de plusieurs communications à des congrès.

## Résumé court en anglais

**Indoor air** contains a large variety of **pollutants** that may favor the onset and severity of **allergic asthma**. The aim of our project was to develop an in vitro cellular model that could be used to predict the impact of air pollutants on the disease. To do so, we designed a device that allows the exposure of cultured cells to targeted, stable and reproducible concentrations of gaseous **formaldehyde** (HCHO) and **nitrogen dioxide** (NO<sub>2</sub>), two major indoor air pollutants. This device allows conducting single or repeated exposures of 30-min to 2-h duration to the two pollutants, alone or as a mixture, with the real-time and continuous monitoring of the pollutant concentrations in the exposure chamber. We then studied the acute and repeated effect of HCHO and NO<sub>2</sub>, alone or as a mixture, in the presence or absence of **house dust mite allergens**, on a variety of **toxicity markers** in different cell models of **airway epithelium**. Our data showed that only very high concentrations of HCHO or NO<sub>2</sub>, or only repeated exposures to these pollutants are able to alter the integrity and functions of the airway epithelium. These data do not rule out a role for HCHO and NO<sub>2</sub> in allergic asthma at pollutant concentrations generally found indoors. Indeed, in the future, several lines of research can be explored to improve our model of study of the impact of indoor air pollution on the respiratory health. Data of this project have led to two publications and several conference communications.

## Note de synthèse en français

L'air intérieur renferme de nombreux polluants non-allergéniques susceptibles de favoriser l'installation, la progression et la gravité des allergies et de l'asthme. Toutefois, les effets de bon nombre de ces composés, sur la réponse à l'allergène, ne sont toujours pas connus. De plus, en milieu intérieur, les pollutions co-existent très souvent. Nos besoins de connaissance concernent donc l'impact de ces polluants pris individuellement, mais également l'impact d'expositions à des mélanges de ces polluants. Les effets des polluants du milieu intérieur sur la sensibilisation et la réponse à l'allergène pourraient résulter d'une action sur l'épithélium respiratoire. L'épithélium est, en effet, la première structure des voies respiratoires avec laquelle les allergènes et les polluants atmosphériques entrent en contact. De plus, cette structure joue un rôle majeur de défense du poumon, en formant une barrière imperméable, en assurant le piégeage et la clairance des toxiques inhalés et en produisant des médiateurs impliqués dans la régulation de l'inflammation et de la réponse immunitaire, ou dans la réparation tissulaire.

Ainsi, l'**objectif général** de notre projet était de développer un modèle cellulaire alternatif à l'expérimentation animale permettant d'évaluer l'impact de polluants du milieu intérieur sur la réponse à l'allergène. Pour cela, **nos objectifs spécifiques** étaient de :

- 1- Concevoir un système permettant d'exposer des cellules en culture à des concentrations connues, stables et reproductibles en polluants gazeux,
- 2- Décrire l'effet aigu et répété de polluants majeurs de l'air intérieur, seuls ou en mélange, mais également associés à des allergènes respiratoires, sur des marqueurs cellulaires et moléculaires liés aux différentes fonctions de défense de l'épithélium respiratoire (fonctions de barrière, clairance, immunorégulation et réparation tissulaire).

Les polluants choisis pour développer ce modèle sont deux polluants gazeux, le formaldéhyde (HCHO) et le dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub>), et un polluant biologique, les endotoxines. Ces 3 polluants ont été classés prioritaire (endotoxines), très prioritaire (NO<sub>2</sub>) ou hautement prioritaire (HCHO) par l'Observatoire de la Qualité de l'Air Intérieur. Les allergènes respiratoires choisis pour mimer la réponse à l'allergène sont les allergènes d'acariens de l'espèce *Dermatophagoides pteronyssinus*. Ces allergènes sont fréquemment retrouvés en milieu intérieur et constituent la première cause d'asthme allergique chez l'enfant et l'adulte.

## Travaux réalisés

Notre travail s'est organisé autour de 2 tâches : 1) la conception d'un système d'exposition de cellules en culture au HCHO et NO<sub>2</sub> gazeux, et 2) l'évaluation de l'impact de l'exposition au HCHO et NO<sub>2</sub>, seuls ou en mélange, et associés ou non à des endotoxines ou des allergènes d'acariens, sur des marqueurs cellulaires et moléculaires liés aux différentes fonctions de défense de l'épithélium respiratoire, ceci dans différents modèles cellulaires.

Le système que nous souhaitons concevoir devait permettre : 1) de générer des concentrations choisies, stables et reproductibles en HCHO et NO<sub>2</sub>, 2) d'alimenter une enceinte d'exposition avec le mélange gazeux ainsi généré pour y exposer des cellules en culture, cette exposition devant pouvoir se faire sur des cultures à l'interface air-liquide ou sur des cultures immergées mais maintenues sous bascule afin d'assurer un contact direct des cellules avec le flux gazeux et le milieu de culture, alternativement, et 3) de mesurer, en temps réel, tout au long des expositions, les concentrations en HCHO et NO<sub>2</sub> effectivement présentes dans l'enceinte d'exposition. Cette partie du projet s'est déroulée en trois étapes : 1) la conception matérielle du système, 2) la mise au point des conditions de génération du HCHO et du NO<sub>2</sub>, et 3) l'exposition de cellules en culture à de l'air synthétique en vue de l'évaluation du système.

L'évaluation de l'effet du HCHO et du NO<sub>2</sub> dans les différents modèles cellulaires s'est déroulée en 3 étapes : 1) l'évaluation de l'impact du HCHO solubilisé, 2) l'évaluation de l'impact du HCHO et NO<sub>2</sub> gazeux, seuls ou en mélange, et 3) l'évaluation de l'impact du HCHO et NO<sub>2</sub> gazeux sur les réponses induites par les endotoxines ou les allergènes

d'acariens. Six lignées épithéliales respiratoires ont été utilisées au cours de ce travail : quatre lignées bronchiques (Calu-3, 16-HBE, NCI-H292 et BEAS-2B), une lignée alvéolaire (A549) et une lignée nasale (RPMI 2650). Les lignées bronchiques Calu-3 et 16-HBE ont été sélectionnées pour leurs très bonnes propriétés de barrière. La lignée NCI-H292 a été choisie pour sa capacité à produire du mucus. La lignée BEAS-2B a été utilisée à titre comparatif. Les lignées A549 et RPMI 2650 ont été choisies pour leur origine alvéolaire et nasale, respectivement. Parmi ces différentes lignées, la lignée Calu-3 a été la principale utilisée. Les marqueurs qui ont été étudiés dans ces modèles cellulaires sont : 1- les changements de perméabilité épithéliale et la mort cellulaire permettant d'évaluer d'éventuelles pertes dans la fonction de barrière de l'épithélium, 2- la production de facteurs impliqués dans le recrutement ou l'activation des cellules immunitaires permettant d'évaluer d'éventuelles altérations de la fonction d'immunorégulation de l'épithélium, 3- le stress oxydant facteur d'inflammation et de mort cellulaire, 4- la production de mucus essentielle dans le rôle de clairance de l'épithélium, et 5- la production de facteurs de croissance impliqués dans le remodelage tissulaire. Les marqueurs ayant donné des résultats pertinents et exploitables sont : les changements de perméabilité épithéliale, la mort cellulaire, le stress oxydant et la production de facteurs impliqués dans la régulation de l'inflammation.

### **Principaux résultats obtenus**

**Nous avons conçu un système permettant d'exposer des cellules** en culture à des concentrations connues, stables et reproductibles de HCHO et NO<sub>2</sub> gazeux. Ce système présente plusieurs avantages. Il permet des expositions à un mélange des deux polluants. Ceci est novateur, car les études publiées à ce jour sur l'exposition de cellules respiratoires à des polluants gazeux n'ont concerné que des polluants seuls. L'enceinte d'exposition de ce système est prévue pour permettre deux modes d'exposition des cellules aux mélanges gazeux, le mode à l'interface air-liquide et le mode immergé où les cellules sont alternativement exposées au flux gazeux et au milieu de culture présent au pôle apical. Ainsi, nous avons eu l'opportunité pour la première fois, de comparer dans le même système, ces deux modes d'exposition qui présentent chacun des avantages et des inconvénients. En effet, alors que la méthode à l'interface air-liquide est jugée représentative de la situation *in vivo*, elle est trop stressante pour permettre des expositions uniques de plus de 30 min, mais également des expositions répétées. La méthode d'exposition en mode immergé permet, grâce au milieu de culture présent au pôle apical des cellules, de limiter ce stress, et donc d'augmenter le temps d'exposition, mais également de répéter des expositions. Un troisième point fort de notre système est la possibilité de mesurer en temps réel les concentrations en HCHO et NO<sub>2</sub> dans l'enceinte d'exposition, et ce, tout au long de l'exposition des cellules. Cette qualité de métrologie est rarement atteinte dans la littérature, en particulier pour le HCHO. Enfin, l'enceinte conçue permet d'exposer aux polluants deux plaques de culture, et donc de tester simultanément un grand nombre de conditions expérimentales.

Le HCHO, disponible commercialement sous forme liquide, peut être solubilisé dans les milieux de culture cellulaire afin d'étudier sa toxicité. Bien que cette approche expérimentale n'ait pas été prévue dans notre projet, nous avons trouvé opportun, avant d'entreprendre notre étude sur le HCHO et le NO<sub>2</sub> gazeux, de l'utiliser pour évaluer la réactivité de nos modèles cellulaires et appréhender les effets que nous serions susceptibles d'observer en réponse au HCHO gazeux. Ainsi, nous avons caractérisé **les effets du HCHO solubilisé** sur des marqueurs cellulaires et moléculaires liés aux différentes fonctions de défense de l'épithélium respiratoire dans deux lignées cellulaires, suite à une exposition à court-terme (30 min ou 24 h) ou une exposition à long-terme (4 semaines). **L'étude à court-terme** a montré que le HCHO solubilisé est capable d'interférer avec l'intégrité et la fonction d'immunorégulation de l'épithélium respiratoire de manière dose- et temps-dépendante. Ainsi, une mort des cellules par nécrose a été mise en évidence suite à une exposition de 24 h à de très fortes concentrations (1400-7000 µM) en HCHO. De même, une augmentation de perméabilité épithéliale et une inhibition de la production basale et induite par les

endotoxines de cytokines pro-inflammatoires ont été observées suite à une exposition de 30 min à des concentrations non cytotoxiques, mais relativement élevées (3500-7000  $\mu\text{M}$ ) en HCHO. Ces résultats suggèrent que seules des expositions d'une durée supérieure à plusieurs heures à des concentrations en HCHO bien au delà des concentrations physiologiques sont susceptibles d'induire des lésions de l'épithélium respiratoire (la concentration sanguine en HCHO dans l'organisme est estimée à 70-100  $\mu\text{M}$ ). **L'étude à long-terme** (exposition journalière de 30 min à 70  $\mu\text{M}$  de HCHO pendant 4 semaines) n'a pas montré d'effet direct du HCHO, ni d'effet du polluant sur les réponses induites par les endotoxines. Ces données renforcent l'idée que seules des concentrations très élevées en HCHO solubilisé sont susceptibles d'interférer avec l'intégrité et les fonctions de l'épithélium respiratoire.

**Nos travaux sur les polluants gazeux ont montré qu'une exposition unique**, de 30 min à l'interface air-liquide ou de 2 h en mode immergé, de cellules épithéliales bronchiques, nasales ou alvéolaires, confluentes ou non confluentes, à des concentrations élevées en HCHO (200  $\mu\text{g.m}^{-3}$ ) et  $\text{NO}_2$  (800  $\mu\text{g.m}^{-3}$ ) au regard des concentrations moyennes retrouvées en milieu intérieur (10 à 100  $\mu\text{g.m}^{-3}$  pour le HCHO et 10 à 214  $\mu\text{g.m}^{-3}$  pour le  $\text{NO}_2$ ) n'a pas d'effet sur l'intégrité et les fonctions de barrière et d'immunorégulation de ces cellules. Ainsi, les concentrations en HCHO et  $\text{NO}_2$  retrouvées en milieu intérieur, même en mélange, ne seraient pas susceptibles d'altérer l'intégrité et les fonctions de l'épithélium respiratoire suite à une exposition unique de courte durée. Nos résultats ont par contre montré que **l'exposition répétée** (30 min par jour pendant 4 jours consécutifs) de cellules Calu-3 au mélange HCHO (200  $\mu\text{g.m}^{-3}$ ) et  $\text{NO}_2$  (800  $\mu\text{g.m}^{-3}$ ) gazeux induit des effets significatifs sur l'intégrité et la fonction d'immunorégulation de ces cellules, qui ne surviennent pas en réponse à une exposition unique. A notre connaissance, nos données sont les premières à rapporter l'effet d'une exposition répétée de cellules en culture à un mélange de polluants gazeux. Elles suggèrent ainsi l'intérêt de pouvoir tester l'impact d'expositions répétées afin de mettre en évidence, dans des modèles *in vitro*, un effet des polluants sur l'épithélium respiratoire à des concentrations retrouvées en milieu intérieur.

Un dernier objectif de notre projet était d'étudier **l'impact du HCHO et du  $\text{NO}_2$  sur la réponse de l'épithélium respiratoire à deux polluants biologiques**, les endotoxines et les allergènes d'acariens. Comme évoqué plus haut, nos travaux sur le HCHO solubilisé ont montré un effet inhibiteur de ce polluant sur les fonctions immunorégulatrices de l'épithélium respiratoire à l'état basal et en réponse aux endotoxines. Un certain nombre de travaux d'association du HCHO et du  $\text{NO}_2$  gazeux aux allergènes d'acariens ont été également conduits. Ces travaux n'ont pas mis en évidence d'effet potentialisateur ou inhibiteur des polluants gazeux sur la réponse à l'allergène. Il faut souligner toutefois que dans cette partie de notre projet, nos investigations ont été limitées par l'impossibilité de disposer d'un modèle cellulaire capable de répondre de façon reproductible aux allergènes d'acariens.

### **Impact et utilité du projet**

Ce travail a abouti à la conception d'un système d'exposition de cellules en culture à deux polluants majeurs du milieu intérieur, le HCHO et au  $\text{NO}_2$ , et à la mise en place de modèles cellulaires, qui ont permis d'étudier les effets du HCHO et du  $\text{NO}_2$ , seuls ou en mélange, sur l'épithélium respiratoire suite à des expositions uniques ou répétées à des concentrations en polluants retrouvées en air intérieur. Nos résultats ont suggéré, en accord avec la littérature, que seules des concentrations gazeuses très élevées en HCHO ou en  $\text{NO}_2$ , ou des expositions répétées à ces polluants sont capables d'altérer l'intégrité et les propriétés d'immunorégulation de l'épithélium respiratoire. Ces résultats n'excluent pas que le HCHO et le  $\text{NO}_2$  jouent un rôle dans les allergies respiratoires et l'asthme, aux concentrations classiquement mesurées en air intérieur. En effet, la réalisation de ce projet nous a permis d'identifier plusieurs axes de recherche pouvant être explorés pour améliorer notre outil d'étude de l'impact de la pollution intérieure sur la santé respiratoire. Les résultats issus de ce projet ont fait l'objet de deux publications dans des revues internationales à comité de lecture et de plusieurs communications à des congrès.

## Note de synthèse en anglais

Indoor air contains a large variety of chemical, biological and particulate pollutants that may favor the onset and severity of allergic asthma. However, the impact of numerous of these compounds, alone or as mixtures, on the response to allergen and therefore on asthma, is still unknown. Pollutants could target airway epithelium to modulate the response to allergen. Indeed, airway epithelium plays a pivotal role in the onset and severity of asthma and in the defense of the lung towards pollutants, by acting as a tight barrier, by trapping and clearing inhaled pollutants from the respiratory tract and/or by producing mediators involved in the regulation of inflammation and immunity (immune-regulation) or the tissue repair.

Therefore, the main aim of our project was to develop a cellular model that could be used to predict the impact of indoor air pollutants on the response to allergen. To do so, our specific goals were: 1) to design a device for the exposure of human cultured airway epithelial cells to targeted, stable and reproducible concentrations of gaseous indoor air pollutants and 2) to describe the acute and repeated effects of major indoor air pollutants, alone or as mixtures, as well as, in association with respiratory allergens, on cellular and molecular markers of the different functions of the airway epithelium: barrier, clearance, immune-regulation and tissue repair.

**The pollutants that were selected** for this project are two gaseous pollutants, **formaldehyde** (HCHO) and **nitrogen dioxide** (NO<sub>2</sub>), and one biological pollutant, the **endotoxins**. These pollutants are considered as priority (endotoxins), very priority (NO<sub>2</sub>) or highly priority (HCHO) by the Observatoire de la Qualité de l'Air Intérieur. The respiratory allergens used to mimic the response to allergen are **house dust mite allergens**, which are frequent indoor allergens and are the main cause of allergic asthma in children and adults.

### Studies that were conducted

Our studies were divided into 2 tasks: 1) the design of a system to expose cultured cells to gaseous HCHO and NO<sub>2</sub>, and 2) the assessment of the impact of HCHO and NO<sub>2</sub>, alone or as a mixture, and associated or not with endotoxins or house dust mite allergens, on molecular and cellular markers of airway epithelium functions, in different cell models.

The system to design should allow: 1) the controlled generation of HCHO and NO<sub>2</sub> at concentrations found indoors, 2) the exposure of cultured cells to these compounds, separately and as a mixture, at the air-liquid interface (ALI) or while submerged by a thin layer of culture medium and maintained under rocking, and 3) the real-time analysis of pollutant concentrations during the course of cell exposure in order to ensure that cultures are actually exposed to the desired atmosphere. This part of our project was divided into 3 steps: 1) the design of the system, 2) the adjustment of the conditions for the generation of HCHO and NO<sub>2</sub>, and 3) the exposure of cultured cells to synthetic air in order to assess the functionality and robustness of the system.

The assessment of the effect of HCHO and NO<sub>2</sub> in the different cell models was divided in three steps: 1) the evaluation of the impact of solubilized HCHO, 2) the evaluation of the impact of gaseous HCHO and NO<sub>2</sub>, alone or as a mixture, and 3) the evaluation of the impact of gaseous HCHO and NO<sub>2</sub> on the responses induced by endotoxins or house dust mite allergens. Six airway epithelial cell lines were used in these studies: four bronchial cell lines (Calu-3, 16-HBE, NCI-H292 and BEAS-2B), one alveolar cell line (A549) and one nasal cell line (RPMI 2650). The bronchial cell lines Calu-3 and 16-HBE were selected for their very good barrier properties. The NCI-H292 cell line was chosen for its capacity to produce mucus. The BEAS-2B cell line was used for comparison. The A549 and RPMI 2650 cell lines were chosen for their alveolar and nasal origins, respectively. Among these different cell lines, Calu-3 was the main cell line used. The markers that were studied in these models were: 1) epithelial permeability changes and cell death to evaluate the loss in the barrier function of the epithelium, 2) production of mediators involved the recruitment and activation of immune cells to assess alteration of the immune-regulatory function of the epithelium, and

3) oxidative stress, as a mediator of inflammation and cell death, 4) production of mucus, an essential element in the role of clearance of airway epithelium, and 5) production growth factors involved in tissue remodeling. The markers that gave pertinent results are: changes in epithelial permeability, cell death, oxidative stress and production of mediators involved in the regulation of inflammation.

### **Main data that were obtained**

**We have designed a device** that makes possible the exposure of cultured cells to targeted stable and reproducible concentrations of gaseous HCHO and NO<sub>2</sub>. This device has several advantages. It can be used to expose cells not only to individual pollutants, but also to their mixture. This is innovative, since studies carried out so far on the exposure of cultured cells to gaseous pollutants concerned individual pollutants only. The exposure chamber of this device was designed to expose cells to pollutants at the air-liquid interface (ALI) or while submerged by a thin layer of culture medium and maintained under rocking. This led us the possibility to compare for the first in the same device these two modes of exposure, that both have advantages and drawbacks. Indeed, whereas exposure at the ALI is considered as representative of the *in vivo* situation, it is too stressful to conduct single exposures of more than 30-min duration or to carry out repeated exposures. Thanks to the presence of culture medium at the apical side of the cell cultures, the submerged exposure method allows to limit this stress and to increase the exposure time, but also to repeat cell exposures. A third strong advantage of our device is the possibility to measure in the real-time HCHO and NO<sub>2</sub> concentrations in the exposure chamber, and this, all along the cell exposure. This quality of metrology was rarely achieved in the literature, particularly for HCHO. At last, in the designed chamber it is possible to expose to pollutants two culture plates and thus to test simultaneously a big number of experimental conditions.

HCHO is commercially available in a liquid form, and can be solubilised in culture medium in order to study its toxicity. Also this experimental approach was not initially planned in our project, we found convenient to use it in order to assess the reactivity of our cell models and to anticipate the effects we may observe in response to gaseous HCHO. Thus, we characterised the **effects of solubilised HCHO** on the different airway epithelium markers selected for the project in two bronchial cell lines (Calu-3 and 16-HBE), in response to short-term (30 min or 24 h) or long-term (4 weeks) exposures. The **short-term study** showed that solubilised HCHO alters the integrity and the immune-regulatory function of the airway epithelium in a dose- and time-dependent manner. Thus, cell necrosis was observed following a single 24-h exposure of cells to very high concentrations (1400-7000 µM) of HCHO. Similarly, an increase in epithelial permeability and an inhibition in the basal and endotoxin-induced production of pro-inflammatory cytokines were observed after a 30-min exposure to non-cytotoxic but relatively high (3500-7000 µM) HCHO concentrations. These results suggest that exposure of duration greater than several hours at HCHO concentrations far higher than physiological concentrations may damage airway epithelium (the blood HCHO concentration in humans is around 70-100 µM). The **long-term study** (daily exposure of 30 min to 70 µM HCHO for 4 weeks) did not show any direct effect of HCHO, nor effect of the pollutant on the responses evoked by endotoxins. These data strengthen the idea that only very high concentrations of solubilised HCHO may alter the integrity and the functions of airway epithelium.

**Our studies on the gaseous pollutants** showed that a **single exposure** of 30 min at the ALI or of 2 h in the submerged method, at high concentrations in HCHO (200 µg.m<sup>-3</sup>) and NO<sub>2</sub> (800 µg.m<sup>-3</sup>) compared to mean concentrations found indoors (10 to 100 µg.m<sup>-3</sup> for HCHO, and 10 to 214 µg.m<sup>-3</sup> for NO<sub>2</sub>) had no effect on the integrity and the barrier and immune-regulatory functions of confluent or non-confluent bronchial, nasal or alveolar epithelial cells. Thus, HCHO and NO<sub>2</sub> concentrations found indoors may not alter the integrity and functions of the airway epithelium following a single short-term exposure,

including as a mixture. Our results showed in contrast that **repeated exposures** (30 min a day for 4 consecutive days) to the HCHO ( $200 \mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ ) and NO<sub>2</sub> ( $800 \mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ ) gaseous mixture induce significant effects on the integrity and immune-regulatory function of Calu-3 cells, that were not observed in response to a single exposure. To our knowledge, we are the first to report the effect on cultured cells of repeated exposures to a mixture of gaseous pollutants. This highlights the necessity to be able to test the impact of repeated exposures in order to show, in *in vitro* airway epithelium models, an effect of pollutants at concentrations found indoors.

A last aim in our project was to study the **impact of HCHO and NO<sub>2</sub> on the responses of airway epithelium to the two biological pollutants**, endotoxins and house dust mite allergens. As described above, we found an inhibitory effect of solubilised HCHO on the immune-regulatory function of the airway epithelium, at basal and in response to endotoxins. Some studies of association of gaseous HCHO and NO<sub>2</sub> to house dust mite allergens were also conducted during the course of our project. These studies didn't show any increasing or inhibitory effect of gaseous pollutants on the responses evoked by these allergens. It should be stressed however that in this part of our project, our investigations were limited by the impossibility to have access to a cellular model able to respond in a reproducible manner to house dust mite allergens.

### **Impact and utility of the project**

This work led to the design of an exposure system and the implementation of cell models, that allowed us to study the effects of two major indoor air pollutants, HCHO and NO<sub>2</sub>, alone or as a mixture, on the airway epithelium in response to single or repeated exposures at concentrations of pollutants that are found indoors. Our results suggested, in agreement with the literature, that only high concentrations of HCHO or NO<sub>2</sub> or repeated exposures to these pollutants could alter the integrity and immune-regulatory properties of airway epithelium. These data do not rule out a role for HCHO and/or NO<sub>2</sub> in respiratory allergies and asthma at concentrations found indoors. Indeed, this project led us to identify several research axes that could be explored to improve our evaluation tool of the impact of indoor air pollution on respiratory health. The results of this project have led to two publications in international revues and several congress communications.



## Rapport détaillé

### 1- Rappel du contexte et des objectifs du projet

**Le contexte** de notre projet est la compréhension du lien existant entre la pollution de l'air intérieur et l'incidence et la morbidité des allergies et de l'asthme, qui ont augmenté fortement dans les pays industrialisés au cours des dernières décennies et posent un problème majeur de santé publique. L'air intérieur renferme, en effet, de nombreux polluants non-allergéniques susceptibles de favoriser l'installation, la progression et la gravité de ces maladies. Toutefois, les effets de bon nombre de ces composés sur la sensibilisation et la réponse bronchiques à l'allergène ne sont toujours pas connus. De plus, en milieu intérieur, les pollutions co-existent très souvent. Nos besoins de connaissance concernent donc l'impact de ces polluants pris individuellement, mais également l'impact d'expositions à des mélanges de ces polluants.

Les effets des polluants du milieu intérieur sur la sensibilisation et la réponse bronchiques à l'allergène pourraient résulter d'une action sur l'épithélium respiratoire. L'épithélium est, en effet, la première structure des voies respiratoires avec laquelle les allergènes et les polluants atmosphériques entrent en contact. De plus, cette structure joue un rôle majeur de défense du poumon, en formant une barrière imperméable, en assurant le piégeage et la clairance des toxiques inhalés et en produisant des médiateurs impliqués dans la régulation de l'inflammation et de la réponse immunitaire ou encore la réparation tissulaire.

Dans ce contexte, l'objectif de notre projet était de développer un modèle cellulaire alternatif à l'expérimentation animale permettant d'évaluer l'impact de polluants du milieu intérieur sur la réponse à l'allergène.

Pour cela, **nos objectifs** spécifiques sont de :

- Concevoir un système permettant d'exposer des cellules en culture à des concentrations connues, stables et reproductibles en polluants gazeux,
- Décrire l'effet aigu et répété de polluants majeurs de l'air intérieur, seuls ou en mélange, mais également associés à des allergènes respiratoires, sur des marqueurs cellulaires et moléculaires liés aux différentes fonctions de défense de l'épithélium respiratoire (fonctions de barrière, clairance, immunorégulation et réparation tissulaire).

Les polluants choisis pour développer ce modèle sont deux polluants gazeux, le formaldéhyde (HCHO) et le dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub>), et un polluant biologique, les endotoxines. Ces 3 polluants ont été classés prioritaire (endotoxines), très prioritaire (NO<sub>2</sub>) ou hautement prioritaire (HCHO) par l'Observatoire de la Qualité de l'Air Intérieur. Les allergènes respiratoires utilisés pour mimer la réponse à l'allergène sont les allergènes d'acariens de l'espèce *Dermatophagoides pteronyssinus*. Ces allergènes sont fréquemment retrouvés en milieu intérieur et constituent la première cause d'asthme allergique chez l'enfant et l'adulte.

### 2- Travaux réalisés et résultats obtenus

Notre travail s'est organisé autour de 2 tâches :

- La conception d'un système d'exposition de cellules en culture au HCHO et NO<sub>2</sub> gazeux,
- L'évaluation de l'impact de l'exposition au HCHO et NO<sub>2</sub>, seuls ou en mélange, et associés ou non à des endotoxines ou des allergènes d'acariens, sur des marqueurs cellulaires et moléculaires liés aux différentes fonctions de défense de l'épithélium respiratoire, ceci dans différents modèles cellulaires.

Six lignées épithéliales respiratoires ont été utilisées au cours de ce travail: quatre lignées bronchiques (Calu-3, 16-HBE, NCI-H292 et BEAS-2B), une lignée alvéolaire (A549) et une lignée nasale (RPMI 2650). Les lignées bronchiques Calu-3 et 16-HBE ont été sélectionnées pour leurs très bonnes propriétés de barrière. La lignée NCI-H292 a été choisie pour sa capacité à produire du mucus. La lignée BEAS-2B a été utilisée à titre comparatif. Les

lignées A549 et RPMI 2650 ont été choisies pour leur origine alvéolaire et nasale, respectivement. Parmi ces différentes lignées, la lignée Calu-3 a été la principale utilisée.

Les marqueurs cellulaires et moléculaires qui ont été étudiés dans ces modèles cellulaires sont : 1- les changements de perméabilité épithéliale et la mort cellulaire permettant d'évaluer d'éventuelles pertes de fonction de barrière de l'épithélium, 2- la production de facteurs impliqués dans le recrutement ou l'activation des cellules immunitaires permettant d'évaluer d'éventuelles altérations de la fonction d'immunorégulation de l'épithélium, 3- le stress oxydant facteur d'inflammation et de mort cellulaire, 4- la production de mucus essentielle dans le rôle de clairance de l'épithélium, et 5- la production de facteurs de croissance impliqués dans le remodelage tissulaire.

***Dans la suite du rapport, ne sont présentés que les travaux, les marqueurs et les lignées cellulaires ayant donné des résultats pertinents. Toutes les expériences exploratoires ou non pertinentes en terme de résultats ne sont pas abordées.***

## **2.1) Conception d'un système d'exposition de cellules en culture au HCHO et NO<sub>2</sub> gazeux**

Le système que nous souhaitons concevoir devait permettre de :

- générer des concentrations choisies, stables et reproductibles en HCHO et NO<sub>2</sub>,
- alimenter une enceinte d'exposition avec le mélange gazeux ainsi généré pour y exposer des cellules épithéliales respiratoires en culture, cette exposition devant pouvoir se faire sur des cultures à l'interface air-liquide ou sur des cultures immergées mais maintenues sous bascule afin d'assurer un contact direct des cellules avec le flux gazeux et le milieu de culture, alternativement,
- mesurer, en temps réel, tout au long des expositions, les concentrations en HCHO et NO<sub>2</sub> effectivement présentes dans l'enceinte.

Cette partie du projet s'est déroulée en trois étapes:

- La conception matérielle du système,
- La mise au point des conditions de génération du HCHO et du NO<sub>2</sub>,
- L'exposition de cellules en culture à de l'air synthétique en vue de l'évaluation du système.

### *2.1.1) Conception matérielle du système*

Le système qui a été conçu est composé de **3 modules** (Kastner et al., 2013):

Un **1<sup>er</sup> module** est destiné à la **génération** du HCHO et NO<sub>2</sub> gazeux. Le HCHO gazeux est généré à partir d'une solution aqueuse de HCHO à l'aide d'un tube à perméation thermostaté, tandis que le NO<sub>2</sub> gazeux est directement obtenu à partir d'un cylindre commercial. Le flux de chacun des polluants est dilué dans de l'air synthétique humidifié, afin d'obtenir les concentrations finales en polluants gazeux désirées. L'ensemble des débits est contrôlé à l'aide de débitmètres massiques.

Le mélange gazeux ainsi généré alimente de manière continue le **2<sup>e</sup> module** du système, qui est un module d'**exposition**. Celui-ci comprend une enceinte étanche qui peut accueillir 2 plaques de culture, et dans laquelle le flux gazeux diffuse de manière homogène. Cette enceinte est placée dans une étuve permettant le maintien des cultures à 37°C. Les cellules peuvent être exposées au flux gazeux à l'interface air-liquide, par culture sur la membrane poreuse d'inserts, ou en mode immergé, par culture dans des plaques conventionnelles qui subissent pendant l'exposition aux polluants gazeux une bascule permettant de mettre en contact la couche de cellules avec le flux gazeux et le milieu de culture, alternativement. La capacité d'accueil de l'enceinte d'exposition permet, à chaque expérience, de réaliser des mesures en triple des paramètres biologiques.

Le **3<sup>e</sup> module** du système est un **module d'analyse** qui permet de suivre en **temps réel** l'évolution des concentrations en HCHO et NO<sub>2</sub> dans l'enceinte d'exposition. Les concentrations en HCHO sont mesurées, en temps réel à l'aide de l'analyseur de HCHO

développé par le Laboratoire des Matériaux, Surfaces et Procédés pour la Catalyse (Le Calvé et al., 2010), qui donne une mesure toutes les 6 minutes, ou *a posteriori* par HPLC/UV après prélèvement et dérivation sur des cartouches de 2,4-DNPH. Les concentrations en NO<sub>2</sub> sont mesurées à l'aide d'un analyseur commercial de NO<sub>x</sub> basé sur la chimioluminescence et donnant une mesure par minute.

### 2.1.2) - Mise au point des conditions de génération du HCHO et du NO<sub>2</sub>

Ce système conçu, nous avons étalonné les conditions de génération des deux polluants gazeux. Ainsi, nous pouvons générer dans notre enceinte jusqu'à 250 µg.m<sup>-3</sup> de HCHO et 1200 µg.m<sup>-3</sup> de NO<sub>2</sub> gazeux, c'est-à-dire couvrir les gammes de concentrations en polluants retrouvées en air intérieur, ceci de manière reproductible. Les concentrations dans l'enceinte sont obtenues rapidement, i.e. dans les 5-10 min suivant la mise en route de la génération ou l'ouverture de l'enceinte pour y introduire les cellules à exposer. Une fois atteintes, les concentrations restent stables tout au long de l'exposition. Point important, nous pouvons générer les polluants en mélange, sans interférence sur les concentrations ciblées pour chacun des polluants (Kastner et al., 2013).

### 2.1.3)- Exposition de cellules en culture à de l'air synthétique

L'exposition de cellules en culture à un flux gazeux peut générer un stress. Aussi, au cours de la conception de notre système, nous avons cherché à évaluer le stress que pouvait représenter une ou plusieurs expositions à un flux gazeux dans les 2 modes d'exposition prévus, exposition de cellules à l'interface air-liquide ou exposition de cellules immergées.

Ainsi, des cellules Calu-3 cultivées sur inserts ou en microplaques ont été exposées pendant 30 min, 1 h ou 2 h à de l'air synthétique de façon unique, ou de façon répétée à raison d'une exposition de 30 min, 1 h ou 2 h par jour pendant 4 jours consécutifs. Vingt quatre heures après la fin des expositions, la viabilité cellulaire, la nécrose cellulaire, la production d'IL-6 et IL-8, ainsi que la perméabilité des monocouches cellulaires ont été mesurées. Des cellules non-exposées à de l'air ont été utilisées comme contrôle.

Nos résultats ont montré que l'exposition de cellules à l'interface air-liquide ne peut pas se prolonger au delà de 30 min en raison d'une altération significative de plusieurs des paramètres mesurés, dont la viabilité (Kastner et al., 2013). L'exposition en mode immergé permet, quant à elle, d'exposer les cellules de façon unique pendant des durées allant jusqu'à 2 h sans altération majeure de ces paramètres, mais également de répéter des expositions de 30 min sur 4 jours consécutifs. Ce stress engendré par l'exposition à l'interface air-liquide a été constaté pour toutes les lignées cellulaires utilisées au cours de ce projet.

**Ainsi**, le premier objectif de notre projet a été atteint. Le système conçu permet de générer et de suivre en temps réel des concentrations connues, stables et reproductibles en HCHO et NO<sub>2</sub> gazeux, seuls ou en mélange. Dans ce système, des cellules épithéliales respiratoires peuvent être exposées aux polluants à l'interface air-liquide ou en mode immergé, de façon unique ou répétée, pendant des temps d'exposition allant de 30 minutes à 2 heures.

**Ce système d'exposition et sa validation ont été décrits dans une publication parue dans le journal "Toxicology In vitro" (cf annexe de ce rapport).**

## 2.2) Evaluation de l'impact de l'exposition aux polluants, seuls ou associés, sur des modèles cellulaires d'épithélium respiratoire

Le deuxième objectif de notre projet était de décrire l'effet aigu et répété du HCHO et du NO<sub>2</sub>, seuls ou en mélange, et associés ou non à des endotoxines ou des allergènes d'acariens, sur des marqueurs cellulaires et moléculaires liés aux différentes fonctions de défense de l'épithélium, ceci dans différents modèles cellulaires d'épithélium respiratoire.

Cette partie du projet s'est déroulée en trois étapes:

- Evaluation de l'impact du HCHO solubilisé,

- Evaluation de l'impact du HCHO et NO<sub>2</sub> gazeux, seuls ou en mélange,
- Evaluation de l'impact du HCHO et du NO<sub>2</sub> gazeux sur les réponses induites par les endotoxines ou les allergènes d'acariens.

### 2.2.1)- *Evaluation de l'impact du HCHO solubilisé*

Le HCHO, disponible commercialement sous forme liquide, peut être solubilisé dans les milieux de culture cellulaire afin d'étudier sa toxicité (Balharry et al. 2008 ; Lim et al. 2010 ; Lovschall et al., 2002). Bien que cette approche expérimentale n'ait pas été prévue dans notre projet, nous avons trouvé opportun, avant d'entreprendre notre étude sur le HCHO et le NO<sub>2</sub> gazeux, de l'utiliser pour évaluer la réactivité de nos modèles cellulaires et appréhender les effets que nous serions susceptibles d'observer en réponse au HCHO gazeux. Ainsi, nous avons évalué les effets **d'une exposition unique à court-terme au HCHO solubilisé**, puis ceux **d'une exposition répétée à long-terme**.

#### - Effets d'une exposition unique à court-terme au HCHO solubilisé

Dans cette étude, des cellules de la lignée Calu-3 ont été exposées à des concentrations croissantes en HCHO (70-7000 µM) pendant 30 min ou 24 h, suivi dans certains cas (expositions de 30 min) d'une exposition de 24 h à un lipopolysaccharide bactérien (LPS). Vingt-quatre heures après le début de ces expositions, la viabilité cellulaire, la nécrose cellulaire, le stress oxydant, l'apoptose, la libération de cytokines et la perméabilité des monocouches cellulaires ont été évaluées. Une partie de ce travail a également été réalisée sur la lignée 16HBE à titre comparatif.

Nous avons alors mis en évidence, que le HCHO induit une baisse de la viabilité et une nécrose des cellules Calu-3 ou 16HBE suite à des expositions de 24 h aux concentrations les plus élevées (1400-7000 µM). Cette mort par nécrose s'accompagne d'une augmentation de la quantité d'espèces réactives de l'oxygène, un marqueur de stress oxydant. Des expositions à des concentrations plus faibles en HCHO (70-350 µM) et/ou d'une durée plus courte (30 min ou 4 h) conduisent à une apoptose ou à une inhibition de la production, basale et induite par le LPS, des interleukines pro-inflammatoires IL-6 et IL-8. Enfin, nous avons montré que le HCHO solubilisé peut induire une diminution de l'intégrité épithéliale – évaluée par la mesure de la résistance électrique transépithéliale – sans que cela se traduise nécessairement par une mort cellulaire. Au cours de ce travail, aucune différence majeure de réponse n'a été observée entre les lignées cellulaires 16HBE et Calu-3 (Kastner et al., 2011).

#### - Effets d'une exposition répétée à long-terme au HCHO solubilisé

Comme cela sera décrit plus loin dans ce rapport, il nous a été difficile sur l'ensemble de notre projet, de mettre en évidence un effet du HCHO ou du NO<sub>2</sub> gazeux à des concentrations représentatives de la pollution de l'air intérieur suite à une exposition unique, malgré le nombre important de marqueurs d'effet évalués. Ceci pourrait être dû au fait que les expositions gazeuses ne sont pas de durée suffisante (au maximum 2 h), la durée de ces expositions ne pouvant être augmentée en raison du stress cellulaire induit. Aussi, nous avons décidé d'évaluer l'impact d'une exposition répétée au HCHO solubilisé. Ce type d'approche a été récemment décrit dans la littérature pour l'étude de l'effet génotoxique à long-terme de faibles concentrations en HCHO (Liu et al., 2011).

Ainsi, nous avons exposé des cellules Calu-3 pendant 4 semaines consécutives à 70 µM de HCHO solubilisé. Cette concentration en HCHO représente environ 10% de la concentration ayant induit une baisse de viabilité de 50 % (IC50) des cellules Calu-3 après une exposition unique de 24 h. Dans ces expériences, les cellules ont été exposées au HCHO de manière continue (présence permanente de HCHO dans le milieu de culture pendant les 4 semaines) ou de manière discontinue (exposition de 30 min par jour, 4 jours par semaine pendant 4 semaines). Des cellules non exposées au HCHO ont servi de témoin. Une fois par semaine, les cultures ont été sous-cultivées afin d'évaluer les effets induits par le HCHO sur une partie des cellules, l'autre partie de la culture servant à poursuivre l'exposition au HCHO. Les cellules destinées à l'évaluation des effets induits par le HCHO ont étéensemencées dans

des plaques de culture en présence ou non de HCHO, puis exposées ou non pendant 2 h ou 24 h à un LPS, afin d'évaluer l'effet direct du HCHO, mais également l'impact de ce polluant sur les réponses induites par les endotoxines. Les marqueurs d'effets évalués dans ces expériences ont été la nécrose cellulaire, le stress oxydant et la sécrétion d'IL-6.

Les cellules exposées de manière continue au HCHO ont cessé de se multiplier après quelques jours de culture. Cette condition expérimentale n'a donc pas pu être exploitée. Les cellules exposées de façon discontinue au HCHO se sont multipliées normalement. Nos résultats sur ces cellules n'ont pas mis en évidence d'effet direct du HCHO sur les différents paramètres mesurés, ni d'effet de ce polluant sur les réponses induites par les endotoxines.

**Ainsi**, nous avons montré que le HCHO est capable d'interférer à court-terme (30 min, 4 h ou 24 h) avec l'intégrité et les grandes fonctions de l'épithélium respiratoire lorsqu'il est solubilisé dans le milieu de culture des cellules à de fortes concentrations (1400-7000  $\mu\text{M}$ ). Par contre, nous n'avons pas été en mesure de montrer que cet effet peut être observé lors d'expositions à long-terme (4 semaines) à des concentrations plus faibles, et donc plus réalistes en HCHO.

**Les résultats concernant les effets à court-terme du HCHO solubilisé ont fait l'objet d'une publication parue dans le journal "Toxicology Letters" (Cf annexe de ce rapport).**

#### *2.2.2)- Evaluation de l'impact du HCHO et du NO<sub>2</sub> gazeux, seuls ou en mélange*

Notre système d'exposition au point nous avons évalué, en accord avec les objectifs de notre projet, les effets aigus et répétés du HCHO et du NO<sub>2</sub> gazeux, seuls ou en mélange.

Ce travail s'est déroulé en deux étapes:

- Evaluation de l'effet d'une exposition à l'interface air-liquide,
- Evaluation de l'effet d'une exposition en mode immergé.

##### - Effet d'une exposition à l'interface air-liquide

Comme décrit plus haut, l'exposition à un flux gazeux de cellules en culture à l'interface air-liquide ne peut se prolonger au delà de 30 min, en raison du stress cellulaire engendré. Aussi, dans ces expériences, seules des expositions uniques de 30 min au HCHO seul ou associé au NO<sub>2</sub> ont été testées. Ces expériences ont été réalisées sur des cellules Calu-3, principale lignée de notre étude, mais également sur la lignée RPMI 2650, lignée épithéliale d'origine nasale. En effet, en raison de sa solubilité en milieu aqueux et de sa réactivité chimique, il est souvent considéré que 90 à 95 % de la dose de HCHO inhalé se dépose au niveau des muqueuses nasales et que l'aldéhyde atteint peu les bronches (Wolkoff et Nielsen, 2010). Ainsi, bien que cela n'ait pas été initialement prévu dans notre projet, nous avons étudié les effets du HCHO et du NO<sub>2</sub> gazeux sur la lignée RPMI 2650. Vingt-quatre heures après le début des expositions aux polluants, la viabilité cellulaire, la nécrose cellulaire, le stress oxydant, la production de cytokines et/ou la perméabilité des monocouches cellulaires ont été évalués. Des cellules exposées à de l'air dans les mêmes conditions ont été utilisées comme contrôles.

Dans un premier temps, une étude dose-réponse a été conduite, dans laquelle des cellules Calu-3 ont été exposées à 50, 100 ou 200  $\mu\text{g.m}^{-3}$  de HCHO ou à 200, 400 ou 800  $\mu\text{g.m}^{-3}$  de NO<sub>2</sub>, i.e. à des concentrations se situant dans les valeurs moyennes rencontrées en milieu intérieur ou représentatives de pics de pollution. Ces premières expériences ne nous ont pas permis d'observer d'effet significatif des polluants seuls sur les différents paramètres évalués. Aussi, dans un deuxième temps, des cellules Calu-3 ont été exposées à un mélange de 200  $\mu\text{g.m}^{-3}$  HCHO et 800  $\mu\text{g.m}^{-3}$  NO<sub>2</sub>. Aucune différence significative n'a été observée entre le mélange de polluants et les polluants seuls, quel que soit le paramètre mesuré. Dans un troisième temps, la lignée RPMI 2650 a été exposée à 200  $\mu\text{g.m}^{-3}$  HCHO, 800  $\mu\text{g.m}^{-3}$  NO<sub>2</sub> ou au mélange des deux polluants. Les résultats obtenus sur cette lignée ont été similaires à ceux observés avec la lignée bronchique Calu-3.

**Ainsi**, l'exposition unique à l'interface air-liquide au HCHO et au NO<sub>2</sub> gazeux, seuls ou en mélange, à des concentrations allant de 50 à 200 µg.m<sup>-3</sup> et de 200 à 800 µg.m<sup>-3</sup> respectivement, n'a pas eu d'effet significatif sur l'intégrité et les fonctions de barrière et d'immunorégulation de cellules épithéliales bronchiques ou nasales en culture (Kastner et al., 2013).

#### - Effet d'une exposition en mode immergé

Au vu de ces résultats, nous avons cherché à déterminer les effets des deux polluants dans le cadre d'une exposition en mode immergé, ce mode d'exposition étant moins stressant pour les cellules et permettant de répéter des expositions de 30 min ou de réaliser des expositions uniques de durée supérieure à 30 min (jusqu'à 2 h).

Dans un premier temps, nous nous sommes posé la question de l'impact que pourrait avoir une exposition unique de 2 h, mais également, comme précédemment, du choix de la lignée cellulaire. Nous nous sommes aussi questionnés sur la pertinence d'avoir travaillé jusque là sur des cultures confluentes représentatives d'une barrière épithéliale intègre, alors que l'intégrité de l'épithélium peut être altérée chez les sujets souffrant d'asthme sévère, ce qui peut augmenter sa sensibilité aux polluants. Pour répondre à ces interrogations, nous avons exposé pendant 2 h à 200 µg.m<sup>-3</sup> HCHO, à 800 µg.m<sup>-3</sup> NO<sub>2</sub> ou aux deux polluants en mélange, d'une part, des cellules Calu-3 et des cellules A549 confluentes, et d'autre part, des cellules Calu-3 confluentes ou non confluentes (80 % de confluence environ). Vingt-quatre heures après le début des expositions, la viabilité et la nécrose cellulaires, le stress oxydant et/ou la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8 ont été évalués. Ces travaux n'ont montré aucun effet des polluants seuls ou en mélange, ceci quelle que soit la lignée cellulaire (bronchique (Calu-3) ou alvéolaire (A549)), l'état des cultures (confluentes ou non confluentes) ou le paramètre évalué. Ces données ont donc renforcé l'idée qu'une exposition unique de courte durée au HCHO et au NO<sub>2</sub> à des concentrations se situant dans les valeurs moyennes rencontrées en milieu intérieur n'a vraisemblablement pas d'effet sur l'épithélium respiratoire, comme nous l'avons déjà entrevu en réponse à des expositions uniques de 30 min à l'interface air-liquide.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié les effets d'une exposition unique ou répétée (une exposition par jour pendant 4 jours consécutifs) de 30 min à 200 µg.m<sup>-3</sup> de HCHO et 800 µg.m<sup>-3</sup> de NO<sub>2</sub> en mélange, sur la lignée Calu-3. Nous avons alors observé que l'exposition répétée au mélange de polluants induit une baisse de la viabilité des cellules Calu-3 associée à une nécrose significative, ainsi qu'une augmentation significative de la production d'IL-8, alors qu'une exposition unique est sans effet. Ainsi, l'exposition répétée au mélange HCHO (200 µg.m<sup>-3</sup>) et NO<sub>2</sub> (800 µg.m<sup>-3</sup>) gazeux, en mode immergé, a eu des effets significatifs sur l'intégrité et la fonction d'immunorégulation des cellules Calu-3, qui n'ont pas été observés en réponse à une exposition unique (Kastner et al., 2013).

**Ainsi**, l'exposition unique à l'interface air-liquide (30 min) ou en mode immergé (30 min ou 2 h) de cellules épithéliales bronchiques, nasales ou alvéolaires, confluentes ou non confluentes, à 200 µg.m<sup>-3</sup> HCHO et 800 µg.m<sup>-3</sup> NO<sub>2</sub>, seuls ou en mélange, n'a pas eu d'effet sur l'intégrité et les fonctions de barrière et d'immunorégulation de ces cellules. En revanche, l'exposition répétée en mode immergé au mélange HCHO (200 µg.m<sup>-3</sup>) et NO<sub>2</sub> (800 µg.m<sup>-3</sup>) gazeux, a eu des effets significatifs sur l'intégrité et la fonction d'immunorégulation des cellules Calu-3.

**La majeure partie de ces résultats concernant les effets des polluants gazeux seuls ou en mélange ont fait l'objet d'une publication parue dans le journal "Toxicology In Vitro" (Cf annexe de ce rapport).**

#### *2.2.3)- Evaluation de l'impact du HCHO et du NO<sub>2</sub> gazeux sur les réponses induites par les allergènes d'acariens ou les endotoxines*

Un autre aspect de notre projet était d'évaluer l'impact du HCHO et du NO<sub>2</sub> gazeux sur les réponses à deux polluants biologiques majeurs de l'air intérieur, à savoir les endotoxines et les allergènes d'acariens. Comme nous l'avons vu plus haut, les cellules Calu-3 choisies comme lignée principale dès le début de notre projet sont capables de répondre au LPS.

Nous avons d'ailleurs montré que dans ces cellules le HCHO solubilisé est capable d'inhiber à court-terme la production de cytokines pro-inflammatoires induite par les endotoxines. Toutefois, la réponse à des agents biologiques peut varier fortement d'un type cellulaire à l'autre. Ainsi, avant d'envisager toute étude associant les polluants gazeux aux endotoxines ou aux allergènes d'acariens, nous avons évalué l'impact de ces agents sur les différents modèles cellulaires à notre disposition afin d'identifier la lignée qui serait la plus adaptée à ce volet de notre étude.

Tout un travail de caractérisation des réponses induites par différents lipopolysaccharides (LPS issus d'*Escherichia coli*, de *Pseudomonas aeruginosa* ou de *Salmonella enterica*) ou un extrait d'allergènes d'acariens dans les lignées Calu-3, A549, BEAS-2B et NCI-H292 a donc été réalisé. Ce travail a mis en évidence une forte variabilité de réponse, notamment pro-inflammatoire (réponse principalement attendue), de ces différentes lignées à ces agents. Alors que la plupart des lignées se sont avérées répondre aux endotoxines (avec toutefois des différences d'intensité), aucune lignée, dont la lignée Calu-3 majoritairement utilisée jusque là dans nos expériences, ne s'est avérée répondre de façon satisfaisante et reproductible aux stimulations par les allergènes d'acariens. Un certain nombre de travaux d'association du HCHO et du NO<sub>2</sub> gazeux aux allergènes d'acariens ont tout de même été conduits au cours de ce projet, mais ces expériences n'ont pas donné de résultats concluants.

**Ainsi**, nos possibilités d'évaluer l'impact du HCHO et du NO<sub>2</sub> gazeux sur la réponse à l'allergène dans le temps imparti au projet ont été limitées, en raison de l'impossibilité de disposer d'un modèle cellulaire capable de répondre de façon reproductible aux allergènes d'acariens.

### 3- Discussion

Au cours de ce projet, **nous avons conçu un système permettant d'exposer des cellules** épithéliales respiratoires en culture à des concentrations connues, stables et reproductibles en HCHO et NO<sub>2</sub> gazeux. Ce système présente plusieurs avantages. Tout d'abord, il permet des expositions à un mélange des deux polluants. Ceci est novateur, car les études publiées à ce jour sur l'exposition de cellules respiratoires à des polluants gazeux n'ont concerné que des polluants analysés individuellement. De plus, notre enceinte d'exposition est prévue pour permettre deux modes d'exposition des cellules aux mélanges gazeux, le mode à l'interface air-liquide et le mode immergé où les cellules sont alternativement exposées au flux gazeux et au milieu de culture présent au pôle apical grâce à une bascule. Ainsi, nous avons eu l'opportunité pour la première fois, de comparer dans le même système, ces deux modes d'exposition qui présentent chacun des avantages et des inconvénients. En effet, alors que la méthode à l'interface air-liquide est jugée représentative de la situation *in vivo*, elle est trop stressante pour permettre des expositions uniques de plus de 30 min, mais également des expositions répétées. La méthode d'exposition en mode immergé permet, grâce au milieu de culture présent au pôle apical des cellules, de limiter ce stress, et donc d'augmenter le temps d'exposition, mais également de répéter des expositions. Dans ce cas, la couche de milieu de culture limite l'accessibilité du gaz, et le temps de contact direct des cellules avec le gaz est inférieur à la durée effective de l'exposition. Toutefois, *in vivo*, l'épithélium respiratoire est recouvert d'une couche de mucus et n'est donc pas directement exposé aux polluants. Ainsi, la méthode d'exposition en mode immergé, à condition que la couche de milieu de culture recouvrant les cellules soit réduite à son minimum (pour permettre un contact direct du flux gazeux avec les cellules) représente selon nous une mode d'exposition tout aussi réaliste que le mode à l'interface air-liquide. Un troisième point fort de notre système est la possibilité de mesurer en temps réel les concentrations en HCHO et en NO<sub>2</sub> dans l'enceinte d'exposition, et ce, tout au long de l'exposition des cellules. Cette qualité de métrologie est rarement atteinte dans la littérature, en particulier pour le HCHO. Enfin, l'enceinte conçue permet d'exposer aux polluants deux plaques de culture, et donc de tester simultanément un grand nombre de conditions expérimentales.

**Nous avons caractérisé les effets du HCHO solubilisé** suite à une exposition unique de courte durée (court-terme) ou après exposition à long-terme sur des marqueurs cellulaires et

moléculaires liés aux différentes fonctions de défense de l'épithélium respiratoire, ceci dans deux lignées cellulaires. **L'étude à court-terme a montré** que le HCHO est capable d'induire la mort de ces cellules, mais uniquement suite à une exposition de plusieurs heures (4-24 h) à de très fortes concentrations (1400-7000  $\mu\text{M}$ ). Le HCHO solubilisé s'est également révélé capable à court-terme (exposition de 30 min), dans des conditions non cytotoxiques mais à des concentrations toujours relativement élevées (3500-7000  $\mu\text{M}$ ), d'inhiber les fonctions immunorégulatrices de l'épithélium respiratoire et de nuire à son imperméabilité. Ces résultats suggèrent que seules des expositions d'une durée supérieure à plusieurs heures à des concentrations bien au delà des concentrations physiologiques en HCHO sont susceptibles d'induire des lésions de l'épithélium respiratoire (la concentration sanguine en HCHO dans l'organisme est estimée à 70-100  $\mu\text{M}$ ). En accord avec cette hypothèse, Balharry et ses collaborateurs (2008) ont montré que seules des concentrations élevées en HCHO (5000  $\mu\text{M}$ ) pendant 24 h provoquent une baisse du nombre de cellules épithéliales en culture. De même, l'exposition de la lignée alvéolaire A549 au HCHO solubilisé a permis à Lim et collaborateurs (2010) de montrer une induction de la mort cellulaire pour une gamme de concentrations en aldéhyde de 0 à 100 mM pendant 24 h. En revanche, nos résultats sur la production de cytokines et la résistance transépithéliale suggèrent que des expositions de 30 min seulement à des concentrations non cytotoxiques en HCHO pourraient altérer la fonction de barrière de l'épithélium respiratoire et inhiber sa fonction d'immunorégulation. Seuls Balharry et ses collaborateurs (2008) ont montré un effet du HCHO solubilisé à des concentrations non-cytotoxiques sur la résistance électrique transépithéliale de cellules épithéliales respiratoires en culture. Toutefois, pour des raisons que nous ne pouvons expliquer, cet effet était opposé à celui que nous avons mis en évidence. Par contre, différents aldéhydes ont été décrits comme capables d'inhiber la production de cytokines induite par les endotoxines *in vitro* (Kim et al., 2010 ; Li et al., 1999). Cet effet résultait de l'inhibition de l'activation du principal facteur de transcription impliqué dans l'expression des cytokines pro-inflammatoires, NF-kB. Egalement en accord avec nos résultats, il a été rapporté dans la littérature que l'inflammation des voies aériennes induite par un allergène est inhibée dans les voies respiratoires de rats exposés de façon répétée au HCHO gazeux (Lino dos Santos Franco et al., 2009). **L'étude à long-terme** (exposition de 30 min par jour, 4 jours par semaine, pendant 4 semaines à 70  $\mu\text{M}$  de HCHO) **n'a pas montré d'effet direct du HCHO solubilisé** sur les cellules, ni d'effet du polluant sur les réponses induites par les endotoxines. Ces données renforcent l'idée que seules des concentrations très élevées en HCHO solubilisé sont susceptibles d'interférer avec l'intégrité et les fonctions de l'épithélium respiratoire.

**Nos résultats sur les polluants gazeux ont montré que l'exposition unique de courte durée**, à l'interface air-liquide (30 min) ou en mode immergé (30 min ou 2 h), de cellules épithéliales bronchiques, nasales ou alvéolaires, confluentes ou non confluentes, à des concentrations élevées en HCHO (200  $\mu\text{g.m}^{-3}$ ) et  $\text{NO}_2$  (800  $\mu\text{g.m}^{-3}$ ) au regard des concentrations moyennes retrouvées en milieu intérieur (10 à 100  $\mu\text{g.m}^{-3}$  pour le HCHO et 10 à 214  $\mu\text{g.m}^{-3}$  pour le  $\text{NO}_2$ ) n'a pas d'effet sur l'intégrité et les fonctions de barrière et d'immunorégulation de ces cellules. En accord avec nos résultats, Persoz et ses collaborateurs (2010) n'ont rapporté qu'une perte de viabilité réduite, et Pariselli et ses collaborateurs (2009) n'ont détecté aucune nécrose des cellules épithéliales respiratoires suite à une exposition de courte durée (30 min ou 1 heure) à 75 ou 750  $\mu\text{g.m}^{-3}$  de HCHO. Des effets cytotoxiques du  $\text{NO}_2$  gazeux sur des cellules épithéliales alvéolaires de la lignée A549 ont été rapportés dans la littérature. Toutefois, ces effets ont été observés suite à une exposition de 1 h à des concentrations de gaz allant de 5000 à 29 000  $\mu\text{g.m}^{-3}$  (Bakand et al., 2006), soit des valeurs 6 à 36 fois supérieures à la concentration de  $\text{NO}_2$  de 800  $\mu\text{g.m}^{-3}$ . A l'inverse, Koehler et collaborateurs (2010) n'ont observé aucune nécrose, apoptose ou baisse de viabilité de cellules épithéliales nasales en réponse à une exposition de 30 min à 19  $\mu\text{g.m}^{-3}$  de  $\text{NO}_2$  et plus. Par contre, à des concentrations plus élevées (765 à 1530  $\mu\text{g.m}^{-3}$  pendant 20 min), Devalia et ses collaborateurs (1993) ont montré que des cellules épithéliales bronchiques primaires étaient sujettes à une nécrose cellulaire. Ainsi, les résultats de la littérature dans des modèles *in vitro* suggèrent, en accord avec les nôtres, que les concentrations en HCHO et  $\text{NO}_2$  retrouvées en milieu intérieur, même en mélange, ne sont pas susceptibles d'altérer l'intégrité et les fonctions de l'épithélium respiratoire suite à



une exposition unique de courte durée. Des études expérimentales ont rapporté des effets délétères du HCHO ou du NO<sub>2</sub> sur le tractus respiratoire chez l'animal de laboratoire, mais là encore, ces effets ont été observés pour des concentrations en polluants non représentatives de celles retrouvées dans les habitats (Kakinoki et al., 1998 ; Monticello et al., 1991). Des études d'expositions contrôlées chez des volontaires ont rapporté peu ou pas d'effet du HCHO sur la fonction respiratoire de sujets sains ou de sujets asthmatiques suite à des expositions de courte durée (1-4 h) à des concentrations inférieures à 1000 µg.m<sup>-3</sup> (Harving et al., 1990 ; Krakowiak et al., 1998 ; Wolkoff and Nielsen 2010). Dans une revue des données cliniques sur les expositions à court-terme au NO<sub>2</sub>, Hesterbeg et al. (2009) ont montré que les concentrations ambiantes moyennes en NO<sub>2</sub> (< 380 µg.m<sup>-3</sup>) n'étaient pas à même d'altérer la fonction respiratoire, ni d'induire une inflammation chez des sujets sains. Des effets aigus du NO<sub>2</sub> ont été rapportés dans des études contrôlées chez l'homme, mais en réponse à des concentrations en polluant supérieures à 1800 µg.m<sup>-3</sup> (Sandström, 1995 ; Folinsbee, 1992). Ainsi, les études sur l'impact à court-terme du HCHO et du NO<sub>2</sub> dans des modèles *in vitro* d'épithélium respiratoire sont en accord avec les effets aigus de ces polluants décrits chez l'homme.

Jusqu'à ce jour, les études de toxicité répétée sur les polluants de l'air intérieur n'ont été menées que chez l'animal. Un de nos objectifs au cours de ce projet était donc de pouvoir étudier l'effet d'expositions répétées au HCHO et au NO<sub>2</sub>. Cet objectif a été atteint grâce l'exposition des cellules en mode immergé, mode moins stressant pour les cellules que l'exposition à l'interface air-liquide. Nous avons alors montré que **l'exposition répétée** (30 min par jour pendant 4 jours consécutifs) de cellules Calu-3 au mélange HCHO (200 µg.m<sup>-3</sup>) et NO<sub>2</sub> (800 µg.m<sup>-3</sup>) gazeux induit des effets significatifs sur l'intégrité et la fonction d'immunorégulation de ces cellules, qui ne surviennent pas en réponse à une exposition unique. A notre connaissance, nos données sont les premières à rapporter l'effet d'une exposition répétée de cellules en culture à un mélange de polluants gazeux. Elles suggèrent ainsi l'intérêt de pouvoir tester l'impact d'expositions répétées afin de mettre en évidence, dans des modèles *in vitro*, un effet des polluants intérieurs sur l'épithélium respiratoire à des concentrations retrouvées en milieu intérieur.

Un dernier objectif de notre projet était d'étudier **l'impact du HCHO et du NO<sub>2</sub> sur la réponse de l'épithélium respiratoire à deux polluants biologiques**, les endotoxines ou les allergènes d'acariens. Nos travaux sur le HCHO solubilisé ont montré un effet inhibiteur de ce polluant sur les fonctions immunorégulatrices de l'épithélium respiratoire à l'état basal et en réponse aux endotoxines. Un certain nombre de travaux d'association du HCHO et du NO<sub>2</sub> gazeux aux allergènes d'acariens ont également été conduits au cours de ce projet. Ces travaux n'ont pas permis de mettre en évidence d'effet potentialisateur ou inhibiteur des polluants gazeux sur la réponse à l'allergène. Il faut souligner toutefois que nos travaux dans cette partie du projet ont été limités, en raison de l'impossibilité de disposer d'un modèle cellulaire capable de répondre de façon reproductible aux allergènes d'acariens.

#### 4- Retombées et perspectives

Ce travail avait pour objectif la mise en place et la caractérisation d'outils nécessaires à l'étude et la compréhension du rôle de la pollution intérieure dans la survenue et la sévérité des allergies respiratoires, l'analyse de la part respective des différents polluants dans cet effet, mais également la mise en évidence d'éventuels effets additifs ou synergiques entre ces polluants.

Il a abouti à la conception d'un système d'exposition de cellules en culture à deux polluants majeurs du milieu intérieur, le HCHO et au NO<sub>2</sub>, et à la mise en place de modèles cellulaires, qui ont permis d'étudier les effets de ces polluants, seuls ou en mélange, sur l'épithélium respiratoire suite à des expositions uniques ou répétées, à des concentrations retrouvées en air intérieur. Nos résultats ont suggéré, en accord avec la littérature, que seules des concentrations gazeuses très élevées en HCHO et en NO<sub>2</sub>, ou des expositions répétées à ces polluants sont capables d'altérer l'intégrité et les propriétés d'immunorégulation de l'épithélium respiratoire. En effet, il est important d'insister sur le fait que les concentrations et les durées d'exposition ayant conduit à des effets du HCHO solubilisé dans nos modèles

sont bien supérieures aux concentrations sanguines physiologiques en cet aldéhyde ou aux durées d'exposition qui sont techniquement réalisables dans tout système d'exposition de cellules en culture à un flux gazeux.

Nos résultats n'excluent pas que le HCHO et le NO<sub>2</sub> puissent jouer un rôle dans les allergies et l'asthme, aux concentrations classiquement mesurées en air intérieur. En effet, la réalisation de ce projet nous a permis d'identifier plusieurs axes de recherche pouvant être explorés pour améliorer notre outil d'étude de l'impact de la pollution intérieure dans la survenue et la sévérité des allergies respiratoires. Parmi ces axes de recherche future, on peut citer en premier lieu le modèle cellulaire d'étude. L'absence de réponse reproductible aux allergènes d'acariens des différentes lignées cellulaires utilisées cours de ce projet pourrait en effet suggérer que ces modèles ne sont pas à même de mimer parfaitement un épithélium respiratoire, et notamment un épithélium d'asthmatique. En ce sens, l'utilisation de cellules pré-sensibilisées à l'aide d'une cytokine pro-inflammatoire (Persoz et al., 2011) ou de cellules primaires pourrait représenter une voie intéressante pour la recherche d'effets directs de nos polluants d'intérêt sur la monocouche épithéliale. De même, on sait désormais qu'*in vivo*, la cellule épithéliale respiratoire interagit avec des cellules du système immunitaire, et en particulier des cellules dendritiques et des macrophages, et que cette interaction peut jouer un rôle important dans sa réponse aux toxiques. Un système associant des cellules épithéliales et des cellules immunitaires a été récemment proposé par Rothen-Rutishauser et ses collaborateurs pour l'étude de la toxicité respiratoire de particules. Ce type de modèle, qui n'a pu être utilisé dans le temps imparti à ce projet, car lourd à développer et à mettre en oeuvre, pourrait s'avérer utile à notre problématique.

Un deuxième axe de recherche future pourrait concerner les marqueurs utilisés pour mettre en évidence d'éventuels effets des polluants. Ceux utilisés au cours de ce projet sont des marqueurs fonctionnels, qui ne sont peut-être pas assez sensibles pour détecter des effets liés à des expositions uniques de courte de durée à de faibles concentrations en toxiques, i.e. des effets dans des conditions où aucune toxicité apparente n'est observée. La génomique, qui permet désormais l'étude simultanée de plusieurs milliers de gènes, pourrait être une solution à cette limite. Une étude récente a décrit, dans des cellules épithéliales nasales primaires, des modifications de l'expression de nombreux gènes, dans des conditions d'exposition au HCHO solubilisé induisant moins de 10 % de mort cellulaire.

Enfin, un troisième axe pourrait concerner les polluants eux-mêmes. Dans une démarche visant à s'approcher encore d'avantage des conditions d'exposition réelles de l'épithélium respiratoire aux polluants atmosphériques dans les environnements intérieurs non industriels, il serait pertinent de réaliser des expositions à des mélanges complexes de polluants gazeux. En effet, l'air présent à l'intérieur des locaux, et notamment des habitations, contient bien souvent de nombreux polluants chimiques de nature très variée (composés organiques volatils, oxydes de carbone, de soufre ou d'azote, hydrocarbures aromatiques polycycliques, particules, etc.) auxquels les voies respiratoires sont exposées de manière simultanée. Bien que certains de ces polluants soient parfois présents uniquement à des concentrations très faibles voire infimes, leur présence continue pourrait jouer un rôle direct ou potentialisateur sur la réponse de l'épithélium respiratoire à une pollution dont ils ne sont pas les constituants majoritaires. L'utilisation de mélanges gazeux complexes pose tout de même des questions de nature métrologique, puisque la complexité des mélanges gazeux utilisés irait de paire avec la complexité des moyens analytiques à déployer pour assurer la mesure des concentrations de chacun des composants de ces mélanges.

## 5- Bibliographie

- Bakand, S., Winder, C., Khalil, C., Hayes, A., 2006. A novel in vitro exposure technique for toxicity testing of selected volatile organic compounds. *J Environ Monit* 8, 100-105.
- Balharry, D., Sexton, K., BéruBé, K.A., 2008. An in vitro approach to assess the toxicity of inhaled tobacco smoke components: nicotine, cadmium, formaldehyde and urethane. *Toxicology*. 244, 66-76.
- Devalia, J.L., Sapsford, R.J., Cundell, D.R., Rusznak, C., Campbell, A.M., Davies, R.J., 1993. Human bronchial epithelial cell dysfunction following in vitro exposure to nitrogen dioxide. *Eur Respir J* 6,1308-1316.
- Folinsbee, L.J., 1992. Does nitrogen dioxide exposure increase airways responsiveness? *Toxicol Ind Health* 8, 273-283.
- Harving, H., Korsgaard, J., Pedersen, O.F., Molhave, L., Dahl, R., 1990. Pulmonary function and bronchial reactivity in asthmatics during low-level formaldehyde exposure. *Lung* 168, 15-21.
- Hesterberg, T.W., Bunn, W.B., McClellan, R.O., Hamade, A.K., Long, C.M., Valberg, P.A., 2009. Critical review of the human data on short-term nitrogen dioxide (NO<sub>2</sub>) exposures: evidence for NO<sub>2</sub> no-effect levels. *Crit Rev Toxicol* 39, 743-781.
- Kakinoki, Y., Ohashi, Y., Tanaka, A., Washio, Y., Yamada, K., Nakai, Y., Morimoto, K., 1998. Nitrogen dioxide compromises defence functions of the airway epithelium. *Acta Otolaryngol Suppl* 538, 221-226.
- Kastner, P.E., Casset, A., Pons, F., 2011. Formaldehyde interferes with airway epithelium integrity and functions in a dose- and time-dependent manner. *Toxicol Lett* 200, 109-116.
- Kastner, P.E., Le Calvé S., Zheng W., Casset A., Pons F., 2013. A dynamic system for single and repeated exposure of airway epithelial cells to gaseous pollutants. *Toxicol In Vitro*, 27 :632-640.
- Kim, B.H., Lee, Y.G., Lee, J., Lee, J.Y., Cho, J.Y., 2010. Regulatory effect of cinnamaldehyde on monocyte/macrophage-mediated inflammatory responses. *Mediators Inflamm* 2010,529359.
- Koehler, C., Ginzkey, C., Friehs, G., Hackenberg, S., Froelich, K., Scherzed, A., Burghartz, M., Kessler, M., Kleinsasser, N., 2010. Aspects of nitrogen dioxide toxicity in environmental urban concentrations in human nasal epithelium. *Toxicol Appl Pharmacol* 245, 219-25.
- Krakowiak, A., Gorski, P., Pazdrak, K., Ruta, U., 1998. Airway response to formaldehyde inhalation in asthmatic subjects with suspected respiratory formaldehyde sensitization. *Am J Ind Med* 33, 274-281.
- Le Calvé S., W. Zheng, J.-L. Ponche, P. Bernhardt, Dispositif et procédé de détermination de la concentration d'un composé dans une phase aqueuse ou gazeuse, brevet français déposé le 11 juin 2009 sous le n° 09/53868, extension internationale déposé le 8 juin 2010 sous le n° PCT/FR2010/051134.
- Li, L., Hamilton, R.F. Jr, Holian, A., 1999. Effect of acrolein on human alveolar macrophage NF-kappaB activity. *Am J Physiol* 277, L550-7.
- Lim, S.K., Kim, J.C., Moon, C.J., Kim, G.Y., Han, H.J., Park S.H., 2010. Formaldehyde induces apoptosis through decreased Prx 2 via p38 MAPK in lung epithelial cells. *Toxicology* 271, 100-6.
- Lino dos Santos Franco, A., Domingos, H.V., Damazo, A.S., Breithaupt-Faloppa, A.C., de Oliveira, A.P., Costa, S.K., Olinari, S.M., Oliveira-Filho, R.M., Vargaftig, B.B., Tavares-de-Lima, W., 2009. Reduced allergic lung inflammation in rats following formaldehyde exposure: long-term effects on multiple effector systems. *Toxicology* 256, 157-163.
- Lovschall, H., Eiskjaer, M., Arenholt-Bindslev, D., 2002. Formaldehyde cytotoxicity in three human cell types assessed in three different assays. *Toxicol In Vitro* 16, 63-69.
- Monticello, T.M., Miller, F.J., Morgan, K.T., 1991. Regional increases in rat nasal epithelial cell proliferation following acute and subchronic inhalation of formaldehyde. *Toxicol Appl Pharmacol* 111, 409-421.
- Pariselli, F., Sacco, M.G., Rembges, D., 2009. An optimized method for in vitro exposure of human derived lung cells to volatile chemicals. *Exp Toxicol Pathol* 61, 33-9.

Persoz, C., Achard, S., Leleu, C., Momas, I., Seta, N., 2010. An in vitro model to evaluate the inflammatory response after gaseous formaldehyde exposure of lung epithelial cells. *Toxicol Lett* 195, 99-105.

Persoz, C., Leleu, C., Achard, S., Fasseu, M., Menotti, J., Meneceur, P., Momas, I., Derouin, F., Seta, N., 2011. Sequential air-liquid exposure of human respiratory cells to chemical and biological pollutants. *Toxicol Lett* 207, 53-59.

Sandstrom, T., 1995. Respiratory effects of air pollutants: experimental studies in humans. *Eur Respir J* 8, 976-995.

Wolkoff, P., Nielsen, G.D., 2010. Non-cancer effects of formaldehyde and relevance for setting an indoor air guideline. *Environ Int* 36, 788-799.

## **6- Valorisation scientifiques des résultats**

### ***Publications scientifiques***

#### Articles

Kastner P.E., Casset A., Pons F. Formaldehyde interferes with airway epithelium integrity and functions in a dose- and time-dependent manner. *Toxicology Letters*, **2011**, 200:109-116.

Kastner P.E., Le Calvé S., Zheng W., Casset A., Pons F. A dynamic system for single and repeated exposure of airway epithelial cells to gaseous pollutants. *Toxicology In Vitro*, **2013**, 27:632-640.

#### Actes de colloques

Kastner P.E., Le Calvé S., Zheng W., Casset A., Pons F. Conception d'un système permettant d'exposer des cellules en culture à des polluants gazeux afin d'étudier l'impact de ces polluants sur l'épithélium bronchique. *Revue Française d'Allergologie*, **2011**, 51(3): 380.

Kastner P. E., Le Calvé S., Casset A., Zheng W., Pons F. Exposure of airway epithelial cells in culture to a mixture of gaseous pollutants: Impact on cell integrity. *Toxicology letters*, **2011**, 205S: S123-S123.

### ***Participation à des manifestations scientifiques : poster et présentations***

Kastner P.E., Le Calvé S., Casset A., Zheng W. et Pons F. *Conception d'un système d'exposition de cellules épithéliales bronchiques en culture à des polluants gazeux*. Journées de Recherche Respiratoire des 23 et 24 octobre 2009, Strasbourg.

Kastner P.E., Casset A., Le Calvé S., Pons F. *Développement d'un modèle cellulaire prédictif du rôle des polluants du milieu intérieur dans la survenue et la sévérité des allergies respiratoires*. Forum de REALISE (Réseau Alsace des Laboratoires en Ingénierie et Sciences pour l'Environnement), 31 mars 2010, Strasbourg.

Kastner P.E., Casset A., Le Calvé S. et Pons F. *Development of a respiratory epithelium cellular model for applications in pharmacology and toxicology*. Journées du Campus d'Illkirch des 3 et 4 mai 2010, Illkirch.

Kastner P.E., Le Calvé S., Pons F. *Impact de l'exposition au formaldéhyde et/ou au dioxyde d'azote sur la réponse de l'épithélium bronchique à l'allergène*. Journée des doctorants du service d'évaluation de la qualité de l'air de l'ADEME, 17 mai 2010, Paris.

Kastner P.E., Le Calvé S., Zheng W., Casset A. et Pons F. *Design of a dynamic exposure system to study the toxicological impact of controlled mixtures of gaseous pollutants on the airway epithelium in vitro*. Congrès de la Société Française de Toxicologie, 25 et 26 novembre 2010, Institut Pasteur, Paris.

Kastner P.E., Casset A. et Pons F. *In vitro assessment of the impact of air pollutants on the respiratory epithelium functions and integrity – Example of formaldehyde*. Congrès de la Société Française de Toxicologie des 25 et 26 novembre 2010, Institut Pasteur, Paris.

Kastner P.E., Casset A., Pons F. *Evaluation de l'impact de polluants atmosphériques sur l'intégrité et les fonctions de l'épithélium respiratoire in vitro – Exemple du formaldéhyde*. Rencontres scientifiques de l'ANSES, 6 décembre 2010, Paris.

Kastner P.E., Le Calvé S., Zheng W., Casset A., Pons F. *Design of a dynamic exposure system to study the toxicological impact of controlled mixtures of gaseous pollutants on the airway epithelium in vitro*. Forum de REALISE (Réseau Alsace des Laboratoires en Ingénierie et Sciences pour l'Environnement), 29 mars 2011, Strasbourg.

Kastner P.E., Casset A., Pons F. *In vitro assessment of the impact of air pollutants on the respiratory epithelium functions and integrity – Example of formaldehyde*. Forum de REALISE, 29 mars 2011, Strasbourg.

Kastner P.E., Le Calvé S., Zheng W., Casset A., Pons F. *Etude de l'impact des polluants du milieu intérieur sur l'intégrité et les fonctions de l'épithélium bronchique*. 6<sup>e</sup> Congrès Francophone d'Allergologie, 19-22 avril 2011, Paris.

Kastner P.E., Le Calvé S., Zheng W., Casset A., Pons F. *Conception d'un système permettant d'exposer des cellules en culture à des polluants gazeux afin d'étudier l'impact de ces polluants sur l'épithélium bronchique*. 6<sup>e</sup> Congrès Francophone d'Allergologie, 19-22 avril 2011, Paris.

Kastner P.E., Le Calvé S., Zheng W., Casset A., Pons F. *Etude de l'impact du formaldéhyde et du dioxyde d'azote sur l'intégrité et les fonctions de l'épithélium bronchique*. Journée Scientifique de l'UMR 7199, 24 mai 2011, Illkirch.

Kastner P.E., Le Calvé S., Zheng W., Casset A., Pons F. *Exposure of airway epithelial cells in culture to a mixture of gaseous pollutants : impact on cell integrity*. Eurotox 2011 – 47<sup>th</sup> Congress of the European Societies of Toxicology, 28-31 août 2011, Paris.

#### Thèse d'université

Pierre-Edouard Kastner, Université de Strasbourg : « Impact de l'exposition au formaldéhyde et/ou au dioxyde d'azote sur les fonctions de l'épithélium bronchique » - Date de soutenance : 21 septembre 2011

#### **7-Annexes :**

Versions post-print des deux publications issues de ce travail

## **Formaldehyde interferes with airway epithelium integrity and functions in a dose- and time-dependent manner**

Pierre Edouard KASTNER, Anne CASSET and Françoise PONS<sup>†</sup>

Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives, UMR 7199 CNRS - Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, 74 route du Rhin, BP 60024, 67401 Illkirch Cedex, France.

<sup>‡</sup>To whom correspondence should be addressed: Pr Françoise Pons, UMR 7199, Faculté de Pharmacie, 74 route du Rhin, 67400 Illkirch Cedex, France.

Phone: (+33) 3 68 85 42 03 ; Fax: (+33) 3 68 85 43 06 ; E-mail: pons@unistra.fr

### **Abstract**

Formaldehyde (HCHO) is a common indoor air pollutant. To assess its potential role and mechanism of action in asthma, we exposed the bronchial epithelial cell lines Calu-3 and 16HBE to HCHO (70 –7000  $\mu$ M) according to two exposure schedules (30 min and 24 h), before measuring cell viability, necrosis and apoptosis, reactive oxygen species production, cytokine release, as well as trans-epithelial electrical resistance (TEER) of cell monolayers. Whereas exposure to HCHO for 30 min had a limited effect on cell viability, exposure for 24 h to 1400 - 7000  $\mu$ M HCHO induced a pronounced dose-dependent cell death. The important decrease in cell viability observed after 24 h exposure to the highest concentrations of HCHO (1400 – 7000  $\mu$ M) was accompanied by important LDH release and ROS production, whereas a 4 h exposure to lower HCHO concentrations (350  $\mu$ M) induced cell apoptosis. Also, exposure to HCHO for 30 min dose-dependently inhibited basal and lipopolysaccharide-induced interleukin-6 (IL-6) and IL-8 production by bronchial epithelial cells. As well, HCHO triggered a dose- and time-dependent decrease in TEER of Calu-3 cell monolayers. The present work demonstrates that HCHO interferes with airway epithelium integrity and functions, and may thus modulate the onset and the severity of asthma. However, importantly, conditions of exposure to HCHO, e.g. level and duration, are determinant in the nature of the effects triggered by the pollutant.

**Keywords :** Formaldehyde – Airway epithelium – Cytotoxicity – Oxidative stress – Inflammation – Transepithelial electrical resistance

## 1. Introduction

Formaldehyde (HCHO) is a chemical compound that is used in industries for the manufacturing of a variety of consumer products including wood-based furnishing materials or glass whole insulations made with adhesives containing formaldehyde resins, paints, flooring materials, disinfectants, preservatives as well as cosmetics (De Groot et al., 2009; Kelly et al., 1999; Salthammer et al., 2010). HCHO is also produced by combustion processes, including smoking (Li et al., 2002). Due to its wide use and the large variety of its sources, HCHO is a very common pollutant of occupational and domestic environments, where it is responsible for human exposure by the airway route (Bruinen de Bruin et al., 2008; Hodgson et al., 2002; Jurvelin et al., 2003). HCHO concentrations measured indoors (average concentrations from 8.0 to 94.9  $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$  with maximal values up to 224  $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ ) often exceed those found outdoors (average concentrations from 4.7 to 15.7  $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$  with maximal values up to 23  $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ ) (Ferrari et al., 1998; Hodgson et al., 2002; Marchand et al., 2006; Rumchev et al., 2002; Smedje et al., 2001; Zhang, 1994). Therefore, HCHO is considered as a major indoor air pollutant.

Asthma is a disorder of the conducting airways that manifested by a variable degree of airflow obstruction and hyperresponsiveness to a wide range of exogenous and endogenous stimuli (Bousquet, 2000). In allergic asthma, these features result from an aberrant immune response to common environmental allergens that leads to production of allergen-specific immunoglobulin E and airway inflammation. The main immune/inflammatory cells involved in asthma include dendritic cells as antigen- processing and presenting cells, T-helper 2 cells as orchestrators of the disease, and mast cells, eosinophils and neutrophils as effectors. These cells infiltrate the airways and contribute to the pathogenesis and chronicity of the disease by responding to and producing a variety of mediators, including pro-inflammatory cytokines and chemokines.

Atmospheric pollution is a factor of pathogenesis and severity of asthma (Penard-Morand et al., 2010; Rage et al., 2009). Among pollutants, indoor air pollutants are of concern, since nowadays town dwellers spend up to 70-80% of their life indoors (Bernstein et al., 2008; Burr, 1999). Thus, it has been suggested that exposure to HCHO could play a role in the increased incidence and gravity of asthma observed in developed countries over the last decades (Britton, 1992; Burr et al., 1989). In agreement with this hypothesis, epidemiological studies suggested a possible association between HCHO exposure and asthma exacerbation (Smedje et al., 2001; Wieslander et al., 1997). As well, Rumchev and collaborators (2002) observed an increased risk of asthma in children exposed to HCHO. In a human exposure study, Krakowiak et al. (1998) reported higher symptom scores and an increase in leukocytes and eosinophils in nasal washes recovered from asthmatic and healthy subjects exposed to HCHO. More recently, house dust mite asthmatics were shown to exhibit an exacerbation of lung function after inhalation of allergen when pre-exposed to HCHO compared to ambient air (Casset et al., 2006). However, some clinical studies did not find any effect of HCHO on lung function and airway response to allergen in asthmatic subjects, suggesting that more investigations are needed to conclude on the role of HCHO in asthma (Ezratty et al., 2007; Harving et al., 1990).

The airway epithelium represents the interface between the environment and the respiratory tract and is thus the first defense mechanism against atmospheric pollutants (Mills et al., 1999). It also plays a critical role in the pathogenesis of asthma (Holgate, 2008). Indeed, the airway epithelium is the place where the sensitization to allergens and the asthmatic reaction are initiated. Thus, by damaging the epithelial barrier or altering its permeability, pollutants like HCHO may favor the encounter between allergens and dendritic cells, or between allergens and mast cells, and thus facilitate the sensitization or the asthmatic reaction, respectively (Pons-Lebeau, 2007). Damage and loss of integrity of the airway epithelium are recognized patterns of asthma severity (Holgate, 2008). Epithelial cells are also important

regulators of the immune response (Schleimer et al., 2007). Indeed, inflammatory cell recruitment and differentiation, as well as antigen sensitization are under the influence of epithelial-derived factors, which may be produced in increased amount upon airway exposure to air pollutants (Mills et al., 1999). Among these factors, interleukin-8 (IL-8) is a neutrophil chemo-attractant that is associated with asthma severity (Devalia et al., 1993; Rusznak et al., 1996). As well, IL-6 is a pleiotropic mediator that plays a role in leukocyte activation and is present at increased levels in the airways and blood of asthmatic patients (Auger et al., 2006). Thus, the trigger of epithelial factors may be another mechanism by which HCHO could contribute to increase the onset or severity of asthma. This pollutant may also be responsible for the production of reactive oxygen species (ROS) (Teng et al., 2001), which may activate inflammatory cells, interfere with the release of mediators, damage airway epithelial cells and increase epithelium permeability (Henricks and Nijkamp, 2001).

To assess the role and the mechanism of action of HCHO in asthma, some studies investigated the effects of HCHO on airway epithelial cell integrity and functions. However, these works gave disparate results. Indeed, whereas one study did not find any significant cell necrosis and IL-8 release in response to HCHO (Pariselli et al., 2009), other ones reported a decrease in cell viability, a cell death by apoptosis or an increase in IL-8 secretion (Balharry et al., 2008; Lim et al., 2010; Persoz et al., 2010). This disparity could result from differences in experimental conditions among studies, e.g. type of cell line used (bronchial or alveolar), mode of cell exposure to HCHO (gaseous or solubilized HCHO), duration of exposure (30 min for gaseous exposure compared to 24 h for exposure to solubilized HCHO), as well as concentrations of the pollutant. In this context, the aim of the present work was to further characterize the effects of HCHO on bronchial epithelial cells in culture, in order to provide a better understanding of the epithelial functions that may be impaired by this pollutant. This work was conducted in two bronchial epithelial cell lines, Calu-3 and 16HBE, exposed to solubilized HCHO. This mode of exposure was chosen, since it allowed us to expose cells for short (30 min) as well as long periods of time (24 h) to a wide range of HCHO concentrations before the analysis of cell integrity and functions. This analysis included the measurements of cell viability, necrosis and apoptosis, reactive oxygen species production, cytokine release, as well as trans-epithelial electrical resistance (TEER) of cell monolayers.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals and reagents

Formaldehyde (HCHO, 37% in water), 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), neutral red (NR), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), dimethyl sulfoxide (DMSO), camptothecin (CAM) and lipopolysaccharide (LPS, *Escherichia coli* 055:B5) were purchased from Sigma-Aldrich. DMEM/F-12 culture medium, fetal bovine serum (FBS), fungizone, penicillin-streptomycin mix (10,000 U.mL<sup>-1</sup> and 10,000 µg.mL<sup>-1</sup>, respectively), trypsin, Hepes (1 M) and phosphate buffered saline (PBS) were manufactured by Gibco and obtained from Invitrogen Corp. Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) was purchased from Molecular Probes.

### 2.2. Cell lines and culture

The Calu-3 cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) and the 16HBE14o- (16HBE) cells were a generous gift from Dr D. Gruenert (California Pacific Medical Center Research Institute, San Francisco, CA, USA). The two cell lines were grown in culture flasks (Becton-Dickinson) with DMEM/F-12 culture medium supplemented with 10% FBS, 100 U.mL<sup>-1</sup> penicillin, 100 µg.mL<sup>-1</sup> streptomycin and 5 mM Hepes. Culture was carried out at 37 °C, in a 5 % CO<sub>2</sub> and 100 % humidified atmosphere. At confluence, cells were released with trypsin (0.5 % in PBS), counted and transferred to culture plates (Becton-Dickinson) or inserts (Thincert PET cell culture inserts with transparent membrane and 0.4 µm pores, Greiner Bio-One). When cells were cultured on inserts, 1 µg.mL<sup>-1</sup> fungizone was added to the culture



medium. Medium was changed every other day. For all experiments, cells were from passages 21-31 and 47-54 for Calu-3 and 16HBE, respectively.

### *2.3. Cell exposure to HCHO*

Exposure in culture plates – Cells were seeded in plates at a density of  $10^5$  cells.cm<sup>-2</sup> and cultured until confluence (5-6 days after seeding). Concentrations of interest in HCHO (70-7000  $\mu$ M), and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as positive control, were obtained by dilution of stock commercial solutions into the culture medium. Exposures to toxicants lasted for 30 min or 24 h, and biological assays were performed at 24 h after the beginning of exposure in both cases. For the 30 min exposures, medium containing the toxicant was changed to fresh culture medium or culture medium containing LPS up to 24 h.

Exposure in inserts – Cells were seeded on inserts at a density of  $5 \cdot 10^5$  cells.cm<sup>-2</sup> and cultured for 10 to 12 days before exposure to HCHO. At this time point, cultures had a TEER of at least 1400 ohm.cm<sup>2</sup>. Cells were exposed to HCHO by replacing the apical medium by medium containing HCHO, for 30 min or 24 h, as described above.

### *2.4. Cell viability assessment*

Viability of cells cultured in plates or inserts was assessed by the MTT assay according to Mosmann (1983) or by the NR assay according to Borenfreund et al. (1990). Cells were exposed to HCHO as described above. The culture medium present in plate wells or in upper compartments of inserts was removed and cells were washed once with 200 (plates) or 350 (inserts)  $\mu$ L PBS. Then, fresh culture medium containing 1 mg.mL<sup>-1</sup> MTT or 100  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> NR was added allowing living cells to metabolize MTT or incorporate NR. After dye incubation, cells were either lysed with DMSO (MTT assay) or washed with a fixative (1% formaldehyde-1% CaCl<sub>2</sub>) followed by the addition of a 1% acetic acid solution containing 50% ethanol (NR assay). Absorbance of the resulting solution was read at 570 or 540 nm using a Multiskan FC reader (Thermo Scientific). Cell viability was expressed as the percentage of the absorbance of treated cells relative to the absorbance of control cells.

### *2.5. Cell necrosis assessment*

Cell necrosis was assessed by measuring the release of lactate dehydrogenase (LDH) in the culture medium using the Cytotoxicity Detection Kit Plus (Roche Applied Science) according to the manufacturer's instructions. LDH activity was expressed as the percentage of the maximal LDH activity, obtained by cell lysis.

### *2.6. Intracellular ROS production assessment*

ROS generation was measured using the method described by Wang and Joseph (1999). Just before exposure to HCHO or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, cells were incubated with culture medium containing 20  $\mu$ M DCFH-DA, for 30 min at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. DCFH-DA was then removed, cells were washed with PBS and exposed to HCHO or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as described above. After exposure, fluorescence of each well was read immediately using a Spectra Max Gemini XPS microplate reader (Molecular Devices) with an excitation filter set at 485 nm and an emission filter set at 530 nm. Data were expressed as fold induction of the fluorescence intensity relative to the intensity of the non-exposed control cells.

### *2.7. Apoptosis assessment*

Apoptosis was assessed by measuring the induction of caspase-3 activity and cytoplasmic nucleosomes. Cells were exposed to HCHO, or camptothecin (CAM) as a positive control, for 4 h and lysed directly after exposure for apoptosis assays. The Caspase-3 Activity Assay Kit and the Cell Death Detection ELISA Kit (Roche Applied Science) were used according to the manufacturer's instructions. Data were expressed as fold induction of the fluorescence (Caspase-3 Activity assay) or the colorimetric (Cell Death Detection assay) intensity of treated cells, relative to the intensity of the non-exposed control cells.

### 2.8. Cytokine assay

Culture media were collected at the end of cell exposure to toxicants, centrifuged at 3,000 g for 5 min and stored at -20 °C until use. The cytokines IL-6 and IL-8 were quantified using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (BD Biosciences), according to the manufacturer's instructions. Absorbance was read at 450 nm with a correction at 570 nm using a Multiskan FC reader (Thermo Scientific). Calibration curves were used to calculate the cytokine concentrations, expressed in ng.mL<sup>-1</sup>.

### 2.9. TEER measurement

The development or the disruption of a tight epithelial cell monolayer was determined by measuring the TEER during cell culture or HCHO exposure, with an ohmmeter and chopstick electrodes (World Precision Instruments, Inc.). During cell culture, TEER measurements were performed every other day and resistance values were expressed in ohm.cm<sup>2</sup>. During exposure to HCHO, TEER was measured at 0, 0.5, 1.5, 4, 8 and 24 h and data were expressed as percentage of the initial TEER (t=0). In both cases, the TEER value of an unseeded insert was subtracted from each measurement.

### 2.10. Statistical analysis

Results were expressed as arithmetic means ± standard error of the mean (SEM). Statistical differences were analyzed from raw data by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni's test using the GraphPad Prism 5 software. Data were considered as statistically different when  $p < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Dose- and time-dependent effect of HCHO on cell viability

To investigate the dose- and time-dependent effect of HCHO on bronchial epithelial cell viability, Calu-3 cells were exposed in culture plates to increasing concentrations of HCHO (70-7000 µM) for 30 min or 24 h and cell viability was assessed at 24 h. Tetrazolium salt-based assays have been widely used to investigate the effect of HCHO on airway epithelial cell viability (Balharry et al., 2008; Lim et al., 2010; Persoz et al., 2010). Therefore, in the present study, the MTT assay was used in the first place. As shown on Figure 1 (panels A and B), HCHO decreased viability of Calu-3 cells in a dose- and time-dependent manner. A decrease in cell viability of 24 to 38 % was observed after a 30 min exposure to 350, 1400 and 3500 µM HCHO, but not for higher or lower concentrations (Fig. 1A). However, these decreases reached statistical significance for 1400 µM HCHO only (38% decrease,  $p < 0.05$ ). In contrast, after a 24 h exposure, cell viability was markedly decreased by 57 to 85 % at 1400 ( $p < 0.001$ ), 3500 ( $p < 0.001$ ) and 7000 µM ( $p < 0.001$ ) HCHO, with a maximal decrease of 85 % at the concentration of 7000 µM (Fig. 1B). In a study on human dental pulp fibroblasts, buccal epithelial cells and HeLa cervix cancer cells exposed to HCHO, Lovschall et al. (2002) found however that the NR assay is more sensitive than the MTT assay in some cell types. Therefore, in the present study, the NR assay was used to verify the dose- and time-dependent effect of HCHO observed with the MTT assay. As shown on panels C and D of figure 1, the NR assay gave similar results, except when cells were exposed to 7000 µM HCHO for 30 min. In this condition, indeed, whereas the MTT assay did not indicate a significant change in cell viability, the NR assay showed a significant decrease (45 %,  $p < 0.001$ ).

### 3.2. Effect of HCHO on cell viability, necrosis and ROS production

Induction of oxidative stress and necrosis is major mechanism of cell death evoked by toxicants. In order to investigate whether the decrease in cell viability induced by HCHO is accompanied by oxidative stress and/or cell necrosis, Calu-3 cells were exposed in culture plates to HCHO (70-7000 µM) for 30 min or 24 h, and cell necrosis and ROS production were assessed at 24 h. No induction of LDH release or ROS production was observed after cell exposure for 30 min to HCHO, whatever its concentration (data not shown). In contrast, as shown on figure 2,

significant cell necrosis (panel A) and increases in ROS production (panel B) were observed after a 24 h exposure of cells to the highest HCHO concentrations (e.g. 1400, 3500 and/or 7000  $\mu\text{M}$ ).

In order to consolidate these results in regards to the data previously reported in the literature, the effect of HCHO on airway epithelial cell viability, necrosis and ROS production was assessed in a second cell line, the 16HBE cell line. In a comparative experiment, Calu-3 and 16HBE cells were exposed in culture plates to 7000  $\mu\text{M}$  HCHO or 4 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  as a positive control, for 30 min or 24 h, and viability (Fig. 3A and 3B), necrosis (Fig. 3C and 3D) and ROS production (Fig. 3E and 3F) were assessed at 24 h. Significant decreases in cell viability and increases in necrosis and ROS production were observed after a 24 h exposure to  $\text{H}_2\text{O}_2$  for both cell lines, as a control (Fig. 3B, 3D and 3F). No significant changes in viability of Calu-3 and 16HBE cells was observed after a 30 min exposure to 7000  $\mu\text{M}$  HCHO (Fig. 3A, white bars), as already described in Figure 1. In the same conditions, there was no increase in ROS production for the two cell lines (Fig. 3E, white bars), and a significant increase in LDH release for 16HBE cells only (Fig. 3C, white bars). However, a significant decrease in cell viability was observed for Calu-3 and 16HBE cells after a 24 h exposure to HCHO (Fig. 3A, black bars) and this decrease was associated with a significant necrosis (Fig. 3C, black bars) and an important ROS production (Fig. 3E, black bars) for the two cell lines.

### 3.3. Induction of apoptosis by HCHO

Recently, Lim et al. (2010) reported the capacity of HCHO to induce apoptosis in the alveolar epithelial cell line A549. Therefore, we intended to investigate the capacity of HCHO to induce apoptosis in bronchial epithelial cells. Calu-3 cells were exposed in culture plates to increasing concentrations of HCHO for 4 h followed by assessment of apoptosis according to previous studies (Liu et al., 2010). Figure 4 shows the effect of increasing concentrations of HCHO on caspase-3 activity (A) and cytoplasmic nucleosomes (B) in Calu-3 cells. Exposure to 350  $\mu\text{M}$  HCHO led to a 5-fold induction of caspase-3 activity ( $p < 0.001$ ) and a 2-fold induction of cytoplasmic nucleosome quantity ( $p < 0.01$ ) compared to non-exposed cells, whereas other HCHO concentrations were without significant effect on the two apoptosis-associated events. Exposure to the apoptosis inducer camptothecin (CAM) in the same conditions led to a 4-fold induction of caspase-3 activity ( $p < 0.001$ ) and a 2-fold induction of cytoplasmic nucleosome amount ( $p < 0.01$ ). In these test conditions (4 h exposure), no significant increase in LDH activity was observed whatever the HCHO concentration (data not shown).

### 3.4. Impact of HCHO on IL-6 and IL-8 production

In order to assess the impact of HCHO on the immunoregulatory functions of the bronchial epithelium, IL-6 and IL-8 levels were measured in the culture supernatants of Calu-3 and 16HBE cells pre-exposed for 30 min to increasing concentrations of HCHO and further cultured for 24 h in the presence of medium alone (basal cytokine production) or of medium containing *E. coli* LPS (evoked cytokine production). As shown on figure 5, Calu-3 cell pre-exposure to HCHO resulted in a dose-dependent decrease in both basal and LPS-evoked IL-6 (Fig. 5A) and IL-8 (Fig. 5B) production. Basal IL-6 and IL-8 release, as well as LPS-induced IL-8 production were decreased by pre-exposures to 3500  $\mu\text{M}$  (64 % decrease,  $p < 0.001$ ) and 7000  $\mu\text{M}$  (97 % decrease,  $p < 0.001$ ) HCHO, and LPS-induced IL-6 secretion was significantly decreased by a pre-exposure to 7000  $\mu\text{M}$  HCHO (75 %,  $p < 0.001$ ). Likewise, pre-exposure to HCHO markedly decreased both basal- and LPS-induced cytokine production in 16HBE cells. Thus, in cells pre-exposed to 3500  $\mu\text{M}$  HCHO, inhibition of basal IL-6 and IL-8 production reached 91 and 93 % and reduction of LPS-evoked IL-6 and IL-8 release reached 95 and 63 %, respectively. In these experiments, inhibition of cytokine production induced by pre-exposure to HCHO was not associated with decreased cell viability (data not shown).

### 3.5. Effect of HCHO on the epithelial monolayer permeability

In order to assess the effect of HCHO on the epithelial permeability by TEER measurements, we first investigated which cell line from Calu-3 and 16HBE is the best adapted

for this kind of measurements. Thus, we measured TEER values of Calu-3 and 16HBE monolayers cultured on inserts as a function of time from seeding up to 17 days of culture. As illustrated on figure 6, TEER values increased from the first days of culture for both cell lines. They further increased regularly for Calu-3, reaching  $1360 \pm 159$  ohm.cm<sup>2</sup> at 14 days of culture, before decreasing. In contrast, TEER values measured on 16HBE cultures stopped growing a few days only after seeding, and reached a plateau between  $424 \pm 39$  and  $661 \pm 77$  ohm.cm<sup>2</sup> during the 13 following days. Therefore, the effect of HCHO on the epithelial permeability was assessed on Calu-3 cell cultures.

Calu-3 monolayers were exposed to increasing concentrations of HCHO during 24 h and TEER values were measured before and at different times during exposure. As well, cell viability was assessed at the end of exposure. Figure 7 shows that TEER values (A) and viability (B) of Calu-3 cell monolayers were not affected by exposure to 70 or 350  $\mu$ M HCHO compared to control cells. The TEER of the monolayers exposed to 1400  $\mu$ M HCHO significantly decreased from 1.5 h (32 % decrease,  $p < 0.01$ ) to 24 h (86 % decrease,  $p < 0.001$ ) of exposure suggesting an increased permeability (Fig. 7A), whereas interestingly, no significant modification of cell viability was observed at this HCHO concentration (Fig. 7B). The TEER of Calu-3 cell monolayers exposed to 3500  $\mu$ M HCHO also significantly decreased from 1.5 h of exposure (Fig. 7A), but the increase in permeability was then associated with a significant decrease (55 % decrease,  $p < 0.01$ ) in cell viability (Fig. 7B).

#### 4. Discussion

Atmospheric pollutants are known to be responsible for harmful health effects towards the respiratory tract. Among them, HCHO is a common indoor air pollutant, which is suspected to play a role in the development and the severity of asthma. While exposures of lung epithelial cells to HCHO have been reported in the literature, the mechanisms by which HCHO could interact with the bronchial epithelium in the context of asthma remain unclear. Thus, the aim of this study was to further investigate the effects of HCHO on bronchial epithelial cell integrity and functions. In this work, the two well-documented bronchial epithelial cell lines, Calu-3 and 16HBE, were exposed to a range of HCHO concentrations according to two exposure schedules. Assessment of the effects triggered by HCHO included cell viability, necrosis and apoptosis, as well as ROS production, cytokine and chemokine release, and changes in epithelial monolayer permeability.

The airway epithelium is at the interface between the environment and the respiratory tract. Maintenance of its integrity is therefore of prime importance in the defense of the lung against atmospheric pollutants. Investigating the effect of HCHO concentrations and time of exposure on cell viability using the Calu-3 cell line, our results showed that HCHO is capable of decreasing bronchial epithelial cell viability in a time- and dose-dependent manner. Indeed, whereas a very short-term exposure (30 min) to HCHO (70-7000  $\mu$ M) resulted in a limited effect, exposure for 24 h to 1400 - 7000  $\mu$ M HCHO induced a pronounced dose-dependent cell death. These observations were made by means of two viability assays, the MTT assay which has been previously used to investigate the effect of HCHO on airway epithelial cell viability (Balharry et al., 2008; Lim et al., 2010) and the NR assay which has been found to be a more sensitive assay in some cell types (Lovschall et al., 2002). Both assays gave similar results, except when cells were exposed to 7000  $\mu$ M HCHO for 30 min. In this condition, indeed, whereas the MTT assay did not indicate a significant change in cell viability, the NR assay showed a significant decrease. Taking into account that the MTT assay measures an enzymatic activity, the absence of clear dose-reponse effect after the 30 min exposure using this assay suggests that a short exposure to high concentrations of HCHO may stimulate cell metabolic activity. Taken together, our viability results suggest that only long-term exposure to high concentrations of HCHO - at least 200 times higher than the physiological concentrations (Heck et al., 1985; Luo et al., 2001) - can lead to a loss of airway epithelium integrity. Supporting this hypothesis, Persoz et al. (2010) reported a

limited loss of viability only and Pariselli et al. (2009) did not observe any LDH release in airway epithelial cells exposed for a very short period of time (30 min and 1 h, respectively) to 75  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  (concentration classically found indoors) and 750  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  (concentration far beyond the ones found indoors) HCHO, respectively. As well, our results at 24 h are in clear accordance with the data of Balharry et al. (2008) showing a decrease in cell numbers after a 24 h exposure to 5000  $\mu\text{M}$  HCHO and more.

Induction of oxidative stress and necrosis is major mechanism of cell death evoked by toxicants. We therefore investigated the effect of HCHO on LDH release and ROS production in our experimental set-up. We then found that the important decrease in cell viability observed after a 24 h exposure to the highest HCHO concentrations was accompanied by important LDH release and ROS production in the two cell lines used. This result indicates that necrosis is involved in the decrease of airway epithelial cell viability triggered by high concentrations of HCHO, and that an oxidative stress could be responsible for this cell death, as suggested by Lim et al. (2010). No ROS induction was observed after a 30 min exposure to the same concentrations of HCHO. This is in accordance with the results of Teng et al. (2001) who reported a time-dependent increase in oxidative stress in response to HCHO in rat hepatocytes. Recently, Lim et al. (2010) reported the capacity of HCHO to induce apoptosis in the A549 alveolar epithelial cell line. As well, an increased number of apoptotic cells has been observed in bronchial and bronchiolar tissue of rats exposed to HCHO (Sandikci et al., 2009). Moreover, Liu et al. (2010) described the activation of caspases by crotonaldehyde in BEAS-2B cells, indicating that this capacity is shared by other aldehydes. In agreement with these studies, we observed a significant induction of apoptosis after a 4 h exposure to HCHO, as assessed by the measurement of caspase-3 activity and cytoplasmic nucleosomes. These responses occurred at 350  $\mu\text{M}$  HCHO, but not for lower or higher concentrations. These data combined with our other results on cell viability and necrosis, suggest that exposure to moderate concentrations of HCHO may induce apoptosis in bronchial epithelial cells, whereas more important exposures – to higher concentrations and for longer periods of time – lead to cell necrosis. This kind of toxic feature has been already described for  $\text{H}_2\text{O}_2$  on human lung fibroblasts (Teramoto et al., 1999).

Inflammation of the airways is an important feature of asthma (Bousquet et al., 2000). In this context, we investigated the effect of HCHO on the production of the pro-inflammatory cytokine IL-6 and the neutrophil chemo-attractant IL-8 by bronchial epithelial cells, at both basal and LPS-induced levels. A dose-dependent decrease in both basal and LPS-induced production of these mediators was observed after a 30 min cell exposure to HCHO, suggesting that HCHO interferes with the cytokine production machinery and that a 30 min exposure is enough to induce a mechanism of inhibition that is not reversed by a following 24 h incubation without HCHO. Importantly, cell viability was not significantly altered in these experiments, demonstrating that the cytokine inhibition evoked by HCHO is not due to cell death. IL-6 is a pleiotropic cytokine that plays a role in leukocyte recruitment, whereas IL-8 is a chemokine that is responsible for neutrophil attraction (Mukaida, 2003). Inhibition of these two mediators suggests that HCHO may exhibit a protective effect in asthma. This hypothesis may be surprising in consideration of the pro-inflammatory effect of HCHO that was reported in a recent *in vitro* study (Persoz et al., 2010). In this study, indeed, an increase in IL-8 release (IL-6 production remaining unchanged) was observed in cells pre-sensitized with TNF-alpha and exposed to gaseous HCHO. However, in agreement with our data, different aldehydes have been reported to inhibit cytokine production evoked by LPS *in vitro* (Kim et al., 2010; Li et al., 1997). Importantly, this inhibitory activity resulted from inhibition of activation of the primary transcription factor involved in pro-inflammatory cytokine expression, NF-kB, (Kim et al., 2010; Li et al., 1999). At last, supporting a possible inhibition of asthma-associated inflammation by HCHO, an impaired inflammatory response to allergen was observed in rats repeatedly exposed to HCHO (Franco et al., 2009).

The role of physical barrier is a major property of the bronchial epithelium. This property can be assessed on cell monolayers by measuring the TEER, as an indicator of the epithelial permeability (Florea et al., 2003). TEER values of Calu-3 and 16HBE cells cultured on inserts were assessed to compare the ability of the two cell lines to acquire barrier property. Our results clearly demonstrated that Calu-3 cells are able to produce higher TEER values than 16HBE cells, and confirmed that this line is a good candidate for permeability studies (Geys et al., 2007). Calu-3 cells were thus used to investigate the effects of HCHO on airway epithelium permeability. The absence of modification of the TEER during a 24 h exposure to 70 or 350  $\mu\text{M}$  HCHO compared to control indicated that these concentrations are not able to harm the epithelial barrier, whereas exposure to 1400 or 3500  $\mu\text{M}$  provoked a rapid loss of integrity that was already detectable at 2 h. Interestingly, the MTT assay performed in this experiment indicated that there was no decrease in cell viability after exposure to 1400  $\mu\text{M}$  HCHO, whereas the 3500  $\mu\text{M}$  exposure induced a significant cell death. This result demonstrates that HCHO is able to alter the barrier property of the bronchial epithelium without necessarily inducing cell death. Alteration of the junctional complexes that allow epithelial cells to produce a TEER could explain this increase in monolayer permeability induced by HCHO in the absence of cell death (Arıcan et al., 2009; Rotoli et al., 2009).

The airway epithelium is one of the first potential targets for inhaled HCHO. The present work demonstrates that this indoor air pollutant exhibits pleiotropic effects on the bronchial epithelium, depending on its concentration and the duration of exposure. These effects may modulate the onset and the severity of asthma. By inducing cell death by apoptosis or necrosis or by altering the barrier property of the airway epithelium, HCHO could facilitate or aggravate the chronic wounding of the airways or the epithelial loss that occur in severe asthma, and thus promote the response to allergen. On the contrary, by inhibiting pro-inflammatory cytokine and/or chemokine release, HCHO may exhibit a protective effect in asthma. Importantly, our results demonstrate that conditions of exposure to HCHO, e.g. level and duration, are determinant in the nature of the effects triggered by the pollutant.

### **Acknowledgements**

This work was supported by the Ministère de l'Écologie, de l'Énergie, du Développement durable et de la Mer through the Primequal 2-Predit program and the Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail (EST-2009-1-30). The laboratory was sponsored by the Réseau Alsace de Laboratoires en Ingénierie et Sciences de l'Environnement, the Société Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique, the Université de Strasbourg and the Centre National de la Recherche Scientifique for equipment purchase. Pierre Edouard Kastner was the recipient of a joint PhD grant from the Agence de l'Environnement et de la Maitrise de l'Énergie and the Région Alsace.

### **References**

- Arıcan, R.Y., Sahin, Z., Ustunel, I., Sarikcioglu, L., Ozdem, S., Oguz, N., 2009. Effects of formaldehyde inhalation on the junctional proteins of nasal respiratory mucosa of rats. *Experimental and Toxicologic Pathology* 61, 297-305.
- Auger, F., Gendron, M.C., Chamot, C., Marano, F., Dazy, A.C., 2006. Responses of well-differentiated nasal epithelial cells exposed to particles: role of the epithelium in airway inflammation. *Toxicol Appl Pharmacol* 215, 285-294.
- Balharry, D., Sexton, K., BeruBe, K.A., 2008. An in vitro approach to assess the toxicity of inhaled tobacco smoke components: nicotine, cadmium, formaldehyde and urethane. *Toxicology* 244, 66-76.

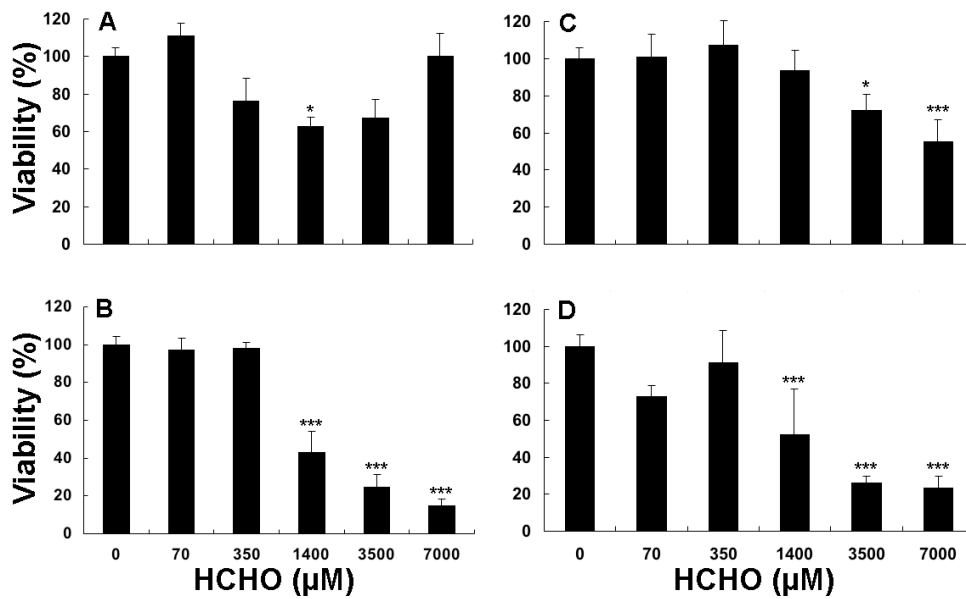
- Bernstein, J.A., Alexis, N., Bacchus, H., Bernstein, I.L., Fritz, P., Horner, E., Li, N., Mason, S., Nel, A., Oullette, J., Reijula, K., Reponen, T., Seltzer, J., Smith, A., Tarlo, S.M., 2008. The health effects of non-industrial indoor air pollution. *J Allergy Clin Immunol* 121, 585-591.
- Borenfreund, E., Babich, H., Martin-Alguacil, N., 1990. Rapid chemosensitivity assay with human normal and tumor cells in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol* 26, 1030-1034.
- Bousquet, J., Jeffery, P.K., Busse, W.W., Johnson, M., Vignola, A.M., 2000. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 161, 1720-1745.
- Britton, J., 1992. Asthma's changing prevalence. *Bmj* 304, 857-858.
- Bruinen de Bruin, Y., Koistinen, K., Kephelopoulos, S., Geiss, O., Tirendi, S., Kotzias, D., 2008. Characterisation of urban inhalation exposures to benzene, formaldehyde and acetaldehyde in the European Union: comparison of measured and modelled exposure data. *Environ Sci Pollut Res Int* 15, 417-430.
- Burr, M.L., 1999. Indoor air pollution and the respiratory health of children. *Pediatr Pulmonol Suppl* 18, 3-5.
- Burr, M.L., Butland, B.K., King, S., Vaughan-Williams, E., 1989. Changes in asthma prevalence: two surveys 15 years apart. *Arch Dis Child* 64, 1452-1456.
- Casset, A., Marchand, C., Purohit, A., le Calve, S., Uring-Lambert, B., Donnay, C., Meyer, P., de Blay, F., 2006. Inhaled formaldehyde exposure: effect on bronchial response to mite allergen in sensitized asthma patients. *Allergy* 61, 1344-1350.
- de Groot, A.C., Flyvholm, M.A., Lensen, G., Menne, T., Coenraads, P.J., 2009. Formaldehyde-releasers: relationship to formaldehyde contact allergy. Contact allergy to formaldehyde and inventory of formaldehyde-releasers. *Contact Dermatitis* 61, 63-85.
- Devalia, J.L., Campbell, A.M., Sapsford, R.J., Rusznak, C., Quint, D., Godard, P., Bousquet, J., Davies, R.J., 1993. Effect of nitrogen dioxide on synthesis of inflammatory cytokines expressed by human bronchial epithelial cells in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 9, 271-278.
- Ezratty, V., Bonay, M., Neukirch, C., Orset-Guillossou, G., Dehoux, M., Koscielny, S., Cabanes, P.A., Lambrozo, J., Aubier, M., 2007. Effect of formaldehyde on asthmatic response to inhaled allergen challenge. *Environ Health Perspect* 115, 210-214.
- Ferrari, C.P., Kaluzny, P., Roche, A., Jacob, V., Foster, P., 1998. Aromatic hydrocarbons and aldehydes in the atmosphere of Grenoble, France. *Chemosphere* 37, 1587-1601.
- Florea, B.I., Cassara, M.L., Junginger, H.E., Borchard, G., 2003. Drug transport and metabolism characteristics of the human airway epithelial cell line Calu-3. *J Control Release* 87, 131-138.
- Franco, A.L.D., Dorningos, H.V., Damazo, A.S., Breithaupt-Faloppa, A.C., de Oliveira, A.P.L., Costa, S.K.P., Oliani, S.M., Oliveira, R.M., Vargaftig, B.B., Tavares-De-Lima, W., 2009. Reduced allergic lung inflammation in rats following formaldehyde exposure: Long-term effects on multiple effector systems. *Toxicology* 256, 157-163.
- Geys, J., Nemery, B., Hoet, P.H., 2007. Optimisation of culture conditions to develop an in vitro pulmonary permeability model. *Toxicol In Vitro* 21, 1215-1219.
- Harving, H., Korsgaard, J., Pedersen, O.F., Molhave, L., Dahl, R., 1990. Pulmonary function and bronchial reactivity in asthmatics during low-level formaldehyde exposure. *Lung* 168, 15-21.
- Heck, H.D., Casanova-Schmitz, M., Dodd, P.B., Schachter, E.N., Witek, T.J., Tosun, T., 1985. Formaldehyde (CH<sub>2</sub>O) concentrations in the blood of humans and Fischer-344 rats exposed to CH<sub>2</sub>O under controlled conditions. *Am Ind Hyg Assoc J* 46, 1-3.
- Henricks, P.A., Nijkamp, F.P., 2001. Reactive oxygen species as mediators in asthma. *Pulm Pharmacol Ther* 14, 409-420.

- Hodgson, A.T., Beal, D., McIlvaine, J.E., 2002. Sources of formaldehyde, other aldehydes and terpenes in a new manufactured house. *Indoor Air* 12, 235-242.
- Holgate, S.T., 2008. The airway epithelium is central to the pathogenesis of asthma. *Allergol Int* 57, 1-10.
- Jurvelin, J.A., Edwards, R.D., Vartiainen, M., Pasanen, P., Jantunen, M.J., 2003. Residential indoor, outdoor, and workplace concentrations of carbonyl compounds: relationships with personal exposure concentrations and correlation with sources. *J Air Waste Manag Assoc* 53, 560-573.
- Kelly, T.J., Smith, D.L., Satola, J., 1999. Emission rates of formaldehyde from materials and consumer products found in California homes. *Environmental Science & Technology* 33, 81-88.
- Kim, B.H., Lee, Y.G., Lee, J., Lee, J.Y., Cho, J.Y., Regulatory effect of cinnamaldehyde on monocyte/macrophage-mediated inflammatory responses. *Mediators Inflamm* 2010, 529359.
- Krakowiak, A., Gorski, P., Pazdrak, K., Ruta, U., 1998. Airway response to formaldehyde inhalation in asthmatic subjects with suspected respiratory formaldehyde sensitization. *Am J Ind Med* 33, 274-281.
- Li, L., Hamilton, R.F., Jr., Holian, A., 1999. Effect of acrolein on human alveolar macrophage NF-kappaB activity. *Am J Physiol* 277, L550-557.
- Li, L., Hamilton, R.F., Jr., Taylor, D.E., Holian, A., 1997. Acrolein-induced cell death in human alveolar macrophages. *Toxicol Appl Pharmacol* 145, 331-339.
- Li, S., Banyasz, J.L., Parrish, M.E., Lyons-Hart, J., Shafer, K.H., 2002. Formaldehyde in the gas phase of mainstream cigarette smoke. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 65, 137-145.
- Lim, S.K., Kim, J.C., Moon, C.J., Kim, G.Y., Han, H.J., Park, S.H., Formaldehyde induces apoptosis through decreased Prx 2 via p38 MAPK in lung epithelial cells. *Toxicology*.
- Liu, X.Y., Yang, Z.H., Pan, X.J., Zhu, M.X., Xie, J.P., Crotonaldehyde induces oxidative stress and caspase-dependent apoptosis in human bronchial epithelial cells. *Toxicol Lett*.
- Lovschall, H., Eiskjaer, M., Arenholt-Bindslev, D., 2002. Formaldehyde cytotoxicity in three human cell types assessed in three different assays. *Toxicology in Vitro* 16, 63-69.
- Luo, W.H., Li, H., Zhang, Y., Ang, C.Y.W., 2001. Determination of formaldehyde in blood plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B* 753, 253-257.
- Marchand, C., Buillot, B., Le Calve, S., Mirabel, P., 2006. Aldehyde measurements in indoor environments in Strasbourg (France). *Atmospheric Environment* 40, 1336-1345.
- Mills, P.R., Davies, R.J., Devalia, J.L., 1999. Airway epithelial cells, cytokines, and pollutants. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 160, S38-S43.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63.
- Mukaida, N., 2003. Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284, L566-577.
- Pariselli, F., Sacco, M.G., Rembges, D., 2009. An optimized method for in vitro exposure of human derived lung cells to volatile chemicals. *Experimental and Toxicologic Pathology* 61, 33-39.
- Penard-Morand, C., Raherison, C., Charpin, D., Kopferschmitt, C., Lavaud, F., Caillaud, D., Annesi-Maesano, I., 2010. Long-term exposure to close-proximity air pollution and asthma and allergies in urban children. *Eur Respir J* 36, 33-40.
- Persoz, C., Achard, S., Leleu, C., Momas, I., Seta, N., 2010. An in vitro model to evaluate the inflammatory response after gaseous formaldehyde exposure of lung epithelial cells. *Toxicol Lett*. 195, 99-105.

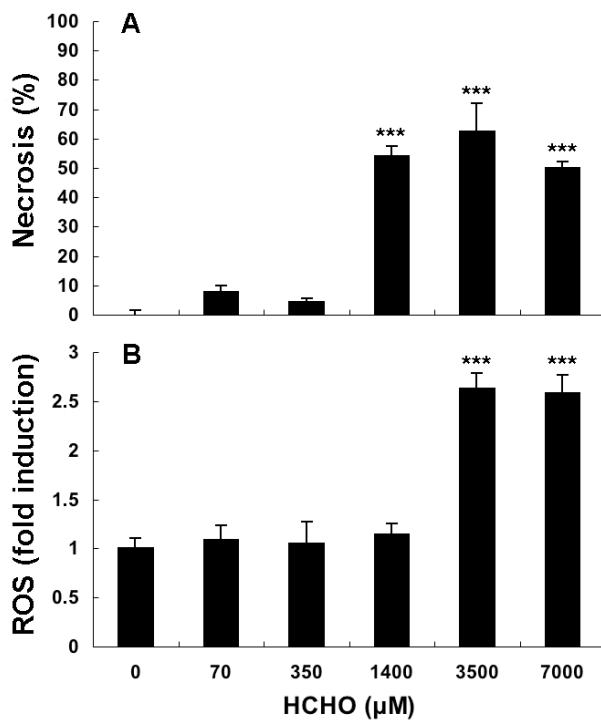


- Pons-Lebeau, F., 2007. Hypersensitivity to formaldehyde: Mechanism of action. *Revue Francaise D Allergologie Et D Immunologie Clinique* 47, 139-143.
- Rage, E., Siroux, V., Kunzli, N., Pin, I., Kauffmann, F., 2009. Air pollution and asthma severity in adults. *Occup Environ Med* 66, 182-188.
- Rotoli, B.M., Bussolati, O., Barilli, A., Zanello, P.P., Bianchi, M.G., Magrini, A., Pietroiusti, A., Bergamaschi, A., Bergamaschi, E., 2009. Airway barrier dysfunction induced by exposure to carbon nanotubes in vitro: which role for fiber length? *Hum Exp Toxicol* 28, 361-368.
- Rumchev, K.B., Spickett, J.T., Bulsara, M.K., Phillips, M.R., Stick, S.M., 2002. Domestic exposure to formaldehyde significantly increases the risk of asthma in young children. *Eur Respir J* 20, 403-408.
- Rusznak, C., Devalia, J.L., Sapsford, R.J., Davies, R.J., 1996. Ozone-induced mediator release from human bronchial epithelial cells in vitro and the influence of nedocromil sodium. *Eur Respir J* 9, 2298-2305.
- Salthammer, T., Mentese, S., Marutzky, R., 2010. Formaldehyde in the indoor environment. *Chemical Reviews* 110, 2536-2572.
- Sandikci, M., Seyrek, K., Aksit, H., Kose, H., 2009. Inhalation of formaldehyde and xylene induces apoptotic cell death in the lung tissue. *Toxicol Ind Health* 25, 455-461.
- Schleimer, R.P., Kato, A., Kern, R., Kuperman, D., Avila, P.C., 2007. Epithelium: at the interface of innate and adaptive immune responses. *J Allergy Clin Immunol* 120, 1279-1284.
- Smedje, G., Norback, D., 2001. Incidence of asthma diagnosis and self-reported allergy in relation to the school environment--a four-year follow-up study in schoolchildren. *Int J Tuberc Lung Dis* 5, 1059-1066.
- Teng, S., Beard, K., Pourahmad, J., Moridani, M., Easson, E., Poon, R., O'Brien, P.J., 2001. The formaldehyde metabolic detoxification enzyme systems and molecular cytotoxic mechanism in isolated rat hepatocytes. *Chemico-Biological Interactions* 130, 285-296.
- Teramoto, S., Tomita, T., Matsui, H., Ohga, E., Matsuse, T., Ouchi, Y., 1999. Hydrogen peroxide-induced apoptosis and necrosis in human lung fibroblasts: protective roles of glutathione. *Jpn J Pharmacol* 79, 33-40.
- Wang, H., Joseph, J.A., 1999. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radical Biology and Medicine* 27, 612-616.
- Wieslander, G., Norback, D., Bjornsson, E., Janson, C., Boman, G., 1997. Asthma and the indoor environment: the significance of emission of formaldehyde and volatile organic compounds from newly painted indoor surfaces. *Int Arch Occup Environ Health* 69, 115-124.
- Zhang, J., Wilson, W.E., Liou, P.J., 1994. Sources of organic acids in indoor air: a field study. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 4, 25-47.

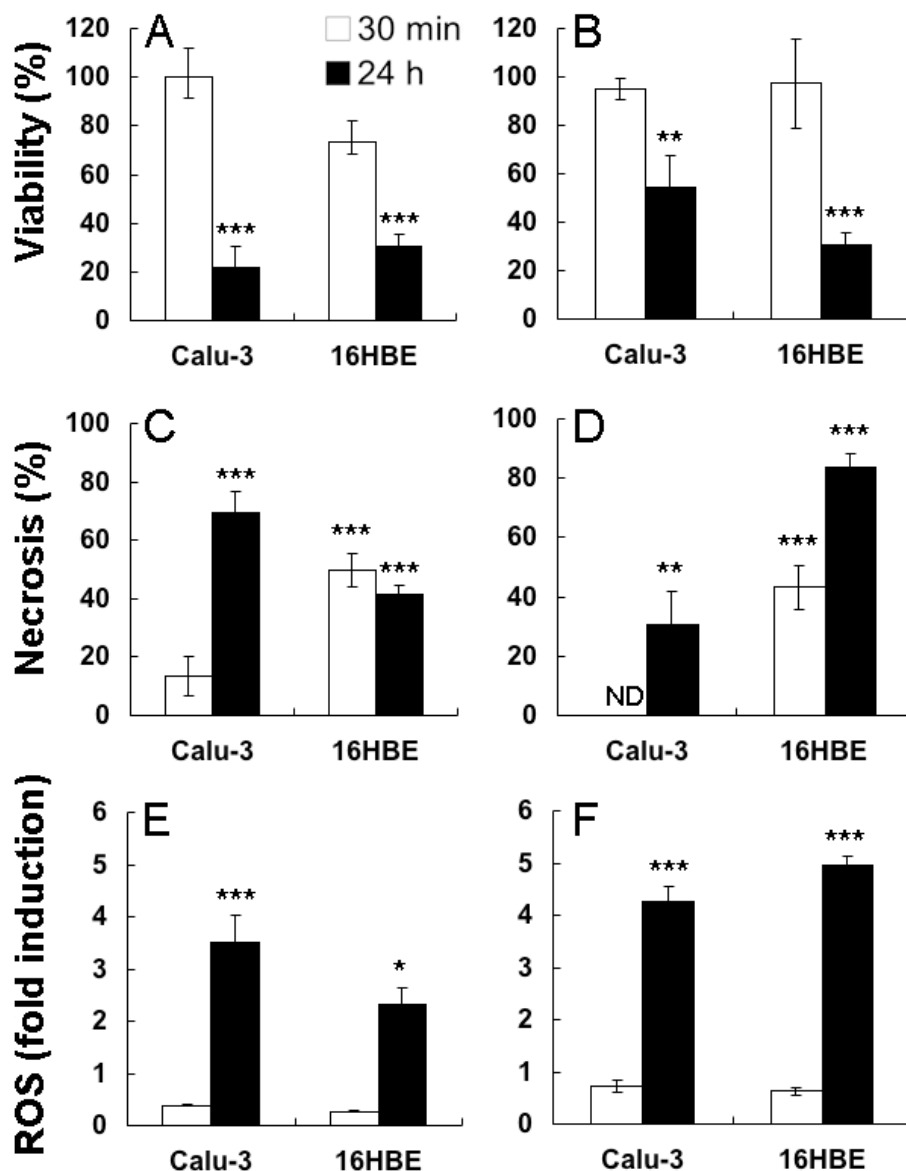
## Figures



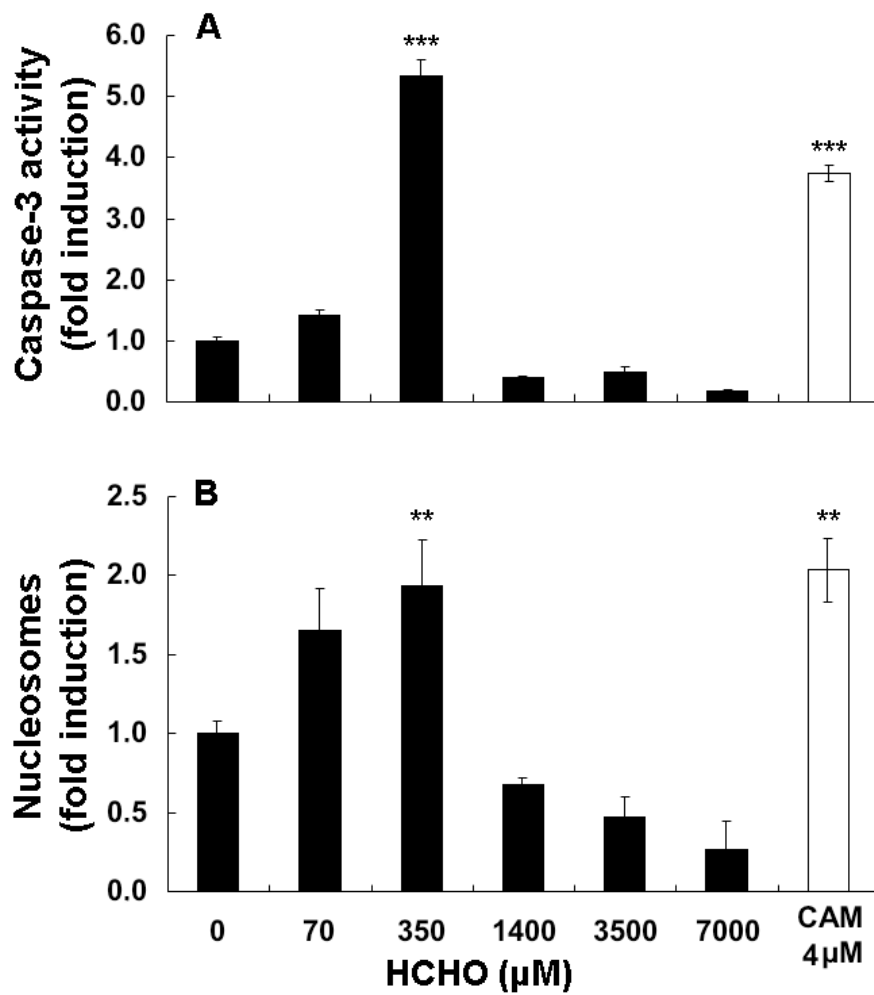
**Figure 1.** Dose- and time-dependent effects of HCHO on cell viability. Calu-3 cells were exposed for 30 min (A, C) or 24 h (B, D) to increasing concentrations of HCHO and cell viability was assessed 24 h after the beginning of exposure, using the MTT (A, B) and NR (C, D) assays, as described in the material and method section. Data are mean  $\pm$  SEM of 6 or 9 values from 2 to 3 experiments. \*  $p < 0.05$  and \*\*\*  $p < 0.001$  vs control cells.



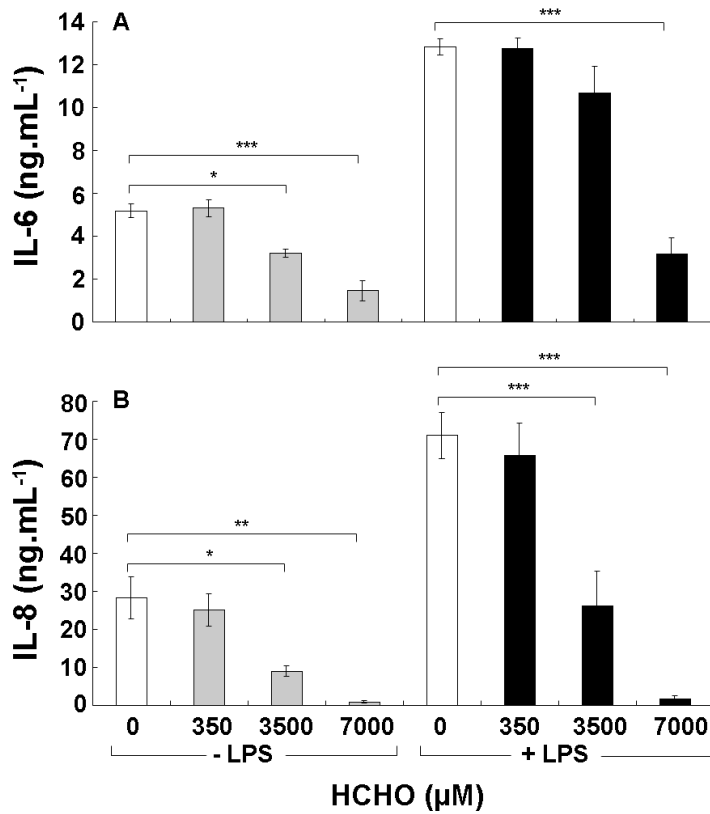
**Figure 2.** Effect of HCHO on cell necrosis and ROS production. Calu-3 cells were exposed for 24 h to increasing concentrations of HCHO, and cell necrosis (A) and intracellular ROS production (B) were assessed at the end of exposure, as described in the material and method section. Data are mean  $\pm$  SEM of 9 values from 3 experiments. \*\*\*  $p < 0.001$  vs control cells.



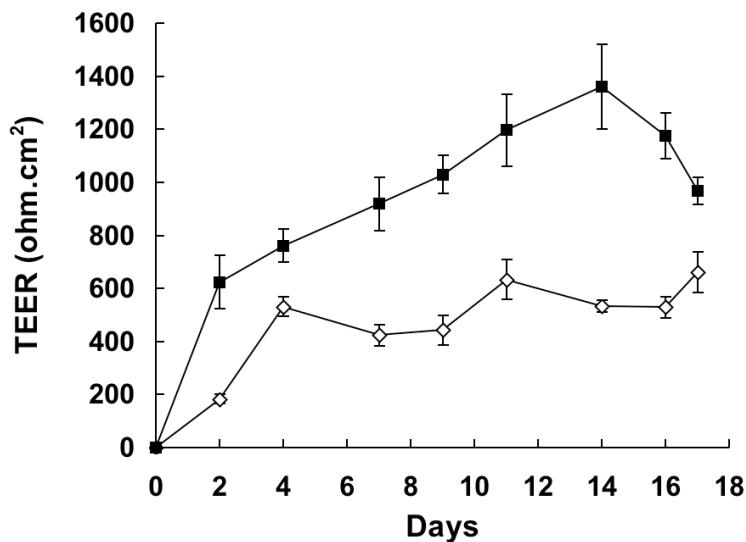
**Figure 3.** Effect of HCHO on cell viability, necrosis and ROS production. Calu-3 and 16HBE cells were exposed to 7000  $\mu\text{M}$  HCHO (A, C and E) or to 4 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  as a positive control (B, D and F), for 30 min (white bars) or 24 h (black bars), and cell viability as measured by the MTT assay (A, B), necrosis (C, D) and intracellular ROS production (E, F) were assessed at 24 h, as described in the material and method section. Data are mean  $\pm$  SEM of 9 or 12 values from 3 to 4 experiments. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$  vs control cells. ND, non detected.



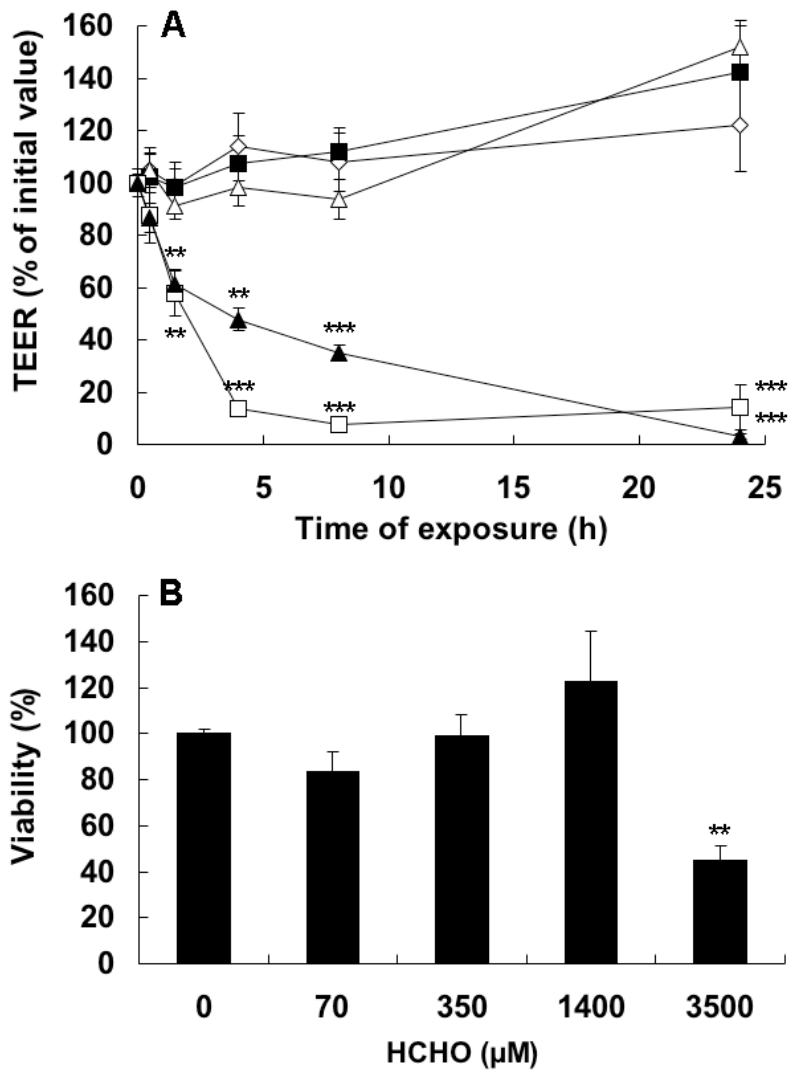
**Figure 4.** Induction of apoptosis by HCHO. Calu-3 cells were exposed to increasing concentrations of HCHO (black bars) or to 4  $\mu\text{M}$  camptothecin (CAM, white bar) as a positive control of apoptosis for 4 h, and caspase-3 activity (A) and cytoplasmic nucleosomes (B) were assessed in cell lysates directly after exposure. Data are mean  $\pm$  SEM of 9 values from 3 experiments. \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$  vs controls.



**Figure 5.** Impact of HCHO on IL-6 (A) and IL-8 (B) production. Calu-3 cells were pre-exposed to increasing concentrations of HCHO (grey and black bars) or medium alone (white bars) for 30 min and further cultured in the presence of medium alone (-LPS) or of medium containing *E. coli* LPS (+LPS) for 24 h. IL-6 and IL-8 concentrations were measured in the culture medium by ELISA. Data are mean  $\pm$  SEM of 9 values from 3 experiments. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$  vs controls.



**Figure 6.** Trans-epithelial electrical resistance (TEER) of Calu-3 (■) and 16HBE (◇) cell monolayers as a function of days of culture after seeding. Cells were seeded on inserts and TEER was measured every other day up to 17 days of culture. Data are mean  $\pm$  SEM of TEER measurements performed on 3 different inserts ( $n = 3$ ).



**Figure 7.** Effect of HCHO on cell monolayer integrity (A) and viability (B). Calu-3 cells were cultured on inserts until maximal TEER values were reached, and 0 (◇), 70 (■), 350 (△), 1400 (□) or 3500 μM (▲) HCHO was added on the apical side of the inserts. TEER was monitored at the beginning of the exposure (t = 0 h), and at t = 0.5, 1.5, 4, 8 and 24 h. At 24 h, cell viability was assessed by the MTT assay as described in the material and method section. Data are mean ± SEM of 9 values from 3 experiments. \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$  vs controls.

## **A dynamic system for single and repeated exposure of airway epithelial cells to gaseous pollutants**

Pierre Edouard Kastner<sup>1,2</sup>, Stéphane Le Calvé<sup>2</sup>, Wuyin Zheng<sup>2</sup>,  
Anne Casset<sup>1</sup>, Françoise Pons<sup>1†</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives (LCAMB), UMR 7199 CNRS - Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, 74 route du Rhin, BP 60024, 67401 Illkirch Cedex, France. ; <sup>2</sup>Laboratoire des Matériaux, Surfaces et Procédés pour la Catalyse (LMSPC), UMR 7515 CNRS - Université de Strasbourg, 25 rue Becquerel, 67087 Strasbourg Cedex 02, France.

†To whom correspondence should be addressed: Pr Françoise Pons, UMR 7199, Faculté de Pharmacie, 74 route du Rhin, 67400 Illkirch Cedex, France  
Phone: (+33) 3 68 85 42 03 ; Fax: (+33) 3 68 85 43 06 ; E-mail : pons@unistra.fr

### **Abstract**

*In vitro* models are promising approaches to investigate the adverse effects and the mode of action of air pollutants on the respiratory tract. We designed a dynamic system that allows the single or repeated exposure of cultured cells to two major indoor air gaseous pollutants, formaldehyde (HCHO) and nitrogen dioxide (NO<sub>2</sub>), alone or as a mixture. In this system, the Calu-3 human bronchial epithelial cell line was exposed at the air-liquid interface (ALI) or submerged by culture medium to synthetic air or to target concentrations of HCHO and/or NO<sub>2</sub> once or on 4 consecutive days before assessment of cell viability and necrosis, IL-6 and IL-8 release and trans-epithelial electrical resistance. Our data showed that whereas the ALI method can be used for single short-term exposures only, the submerged method provides the possibility to expose Calu-3 cells in a repeated manner. As well, we found that repeated exposures of the cells to HCHO and NO<sub>2</sub> at concentrations that can be found indoors triggered a significant decrease in cell metabolism and an increase in IL-8 release that were not evoked by a single exposure. Thus, our work highlights the fact that the development of systems and methods that allow repeated exposures of cultured cells to gaseous compounds in mixtures is of major interest to evaluate the impact of air pollution on the respiratory tract.

**Keywords** : Airway epithelium ; Gaseous pollutants ; Exposure system ; Repeated exposures

## 1. Introduction

In developed countries, air pollution is of major concern because of its potential adverse effects on human health. In modern societies people spend 80 to 90 % of their time in closed environments. Studies addressing indoor air quality have shown that a huge variety of pollutants may be found indoors, among which gaseous compounds such as formaldehyde (HCHO) and nitrogen dioxide (NO<sub>2</sub>) (Dales et al., 2008; Marchand et al., 2006; Sakai et al., 2004; World Health Organization, 2010). Epidemiological studies have suggested an association between indoor air pollution and human respiratory health, especially asthma (Bernstein et al., 2008; Burr, 1999; Hulin et al., 2010; Roda et al., 2011; World Health Organization, 2010). In addition, animal studies have demonstrated deleterious effects of indoor pollutants on the respiratory tract (Kawano et al., 2012; Larsen et al., 2007; Lino dos Santos Franco et al., 2006; Poynter et al., 2006). However, these studies concerned a small number of pollutants among the huge variety that can be found indoors and sometimes gave conflicting results. Therefore, beside epidemiological and animal studies, *in vitro* models are promising approaches to better investigate the adverse effects and the mode of action of indoor air pollutants on the respiratory tract (Aufderheide et al., 2003; Bakand et al., 2006b; Berube et al., 2010; Klein et al., 2011).

In the respiratory tract, the epithelium acts as a protective physical barrier, allowing the mechanical clearance of noxious substances and is involved in the host defense by producing a wide range of pro-inflammatory and immune mediators (Holgate, 2008). It plays thus a crucial role in the defense against noxious air pollutants. Airway epithelium is also the first structure that inhaled environmental agents encounter upon their entry in the respiratory tract. Integrity and functions of the airway epithelium have been shown to be impaired in response to several air pollutants including indoor gaseous compounds such as HCHO and NO<sub>2</sub> (Bakand et al., 2007; Baulig et al., 2003; Garcon et al., 2006; Kastner et al., 2011; Pariselli et al., 2009; Persoz et al., 2010). These effects could contribute to the development and severity of lung diseases (Mills et al., 1999). Thus, *in vitro* models based on airway epithelial cells are currently developed to investigate the adverse effects and the mode of action of air pollutants on the respiratory tract. The cellular composition of the epithelium changes all along the airways to fulfill multiple functions (hydration, host defense, clearance, gas exchange, etc.). Nearly a dozen epithelial cell types have been identified in the whole respiratory tract, among which nasal, olfactory, ciliated and alveolar (Berube et al., 2010). Different models may be used to study the airway epithelium response to air pollutants, according to the area of interest in the respiratory tract (Verstraelen et al., 2008). Among these models, the Calu-3 human epithelial cell line is considered as a good model to study airway epithelium integrity and functions (Grainger et al., 2006; Wan et al., 2000; Zhu et al., 2010). It is one of the few respiratory cell lines that form tight junctions *in vitro*. Besides, the Calu-3 cell line is derived from bronchial epithelium, which plays a central role in the physiopathology of asthma (Holgate, 2008). It is thus a model of interest to analyze the role of air pollutants in the development and severity of this lung disease.

Cells in culture can be exposed to airborne gaseous pollutants by different manners. Agents commercially available under a liquid form, such as HCHO or crotonaldehyde can be diluted in the culture medium before their addition on submerged cells (Kastner et al., 2011; Liu et al., 2010; Lovschall et al., 2002). However, this method is often judged as poorly representative of the *in vivo* situation. The air-liquid interface (ALI) method that consists in culturing cells on inserts and in exposing them to a gaseous pollutant flow after removal of the culture medium is considered to be more relevant (Aufderheide et al., 2003; Bayram et al., 1999; Haswell et al., 2010; Pariselli et al., 2009; Persoz et al., 2010). However, Pariselli et al. reported a significant decrease in cell viability that was accompanied by a significant necrosis in the HaCaT keratinocyte cell line after exposure to air at the ALI for a period as short as 1 h. Although such changes did not occur in the alveolar epithelial cell line A549 (Pariselli et al., 2006), it is reasonable to think that exposure at the ALI could be too stressful to carry out repeated cell exposures to gaseous pollutants. A method where cells cultured in plates and maintained



submerged by a thin layer of culture medium are exposed to a gas flow by means of a rocking table has been used by several groups to expose cells to gaseous species (Persinger et al., 2001; Rusznak et al., 1999). This method assuring humidification of the cultures during their exposure could represent an interesting way to limit cell stress during exposure of airway cells to gaseous pollutants, particularly when exposures have to be repeated.

Indoor air pollution is most often composed of a mixture of pollutants and exposure to this pollution generally occurs in a repeated manner. However, studies carried out so far on airway epithelial models concerned essentially single short-term exposures to individual pollutants at levels far higher than environmental concentrations. In this context, we undertook to design a dynamic system that allows: 1- the controlled generation of two major gaseous indoor air pollutants, HCHO and NO<sub>2</sub> at concentrations found indoors, 2- the exposure of cultured airway epithelial cells to these compounds, separately and as a mixture, at the ALI or while submerged by a thin layer of culture medium and maintained under rocking, and 3- the real-time analysis of pollutant concentrations during the course of cell exposures in order to ensure that cultures are actually exposed to the desired atmosphere. Our hypotheses were on the one hand, that exposure of submerged cells might allow repeating exposures with limited stress, and on the other hand, that repeated exposures or association of pollutants might trigger some toxicological effects that would not be observed in response to single exposure or to individual pollutants. To test these hypotheses, the Calu-3 cell line, on which we previously described the effects of solubilized HCHO (Kastner et al., 2011), was exposed once or on 4 consecutive days to synthetic air or HCHO and/or NO<sub>2</sub> before assessment of cell viability and necrosis, IL-6 and IL-8 release and trans-epithelial electrical resistance (TEER).

## 2. Material and methods

### 2.1. Chemicals and reagents

HCHO (37 % in water), 2,4-dinitrophenylhydrazine (2,4-DNPH), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO) and ammonium acetate were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Acetylacetone and acetic acid were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). DMEM/F-12 culture medium, fetal bovine serum (FBS), fungizone (250 µg mL<sup>-1</sup>), penicillin-streptomycin mix (10,000 U mL<sup>-1</sup> and 10,000 µg mL<sup>-1</sup>, respectively), trypsin, HEPES (1 M) and phosphate buffered saline (PBS) were manufactured by Gibco and obtained from Invitrogen Corp (Cergy Pontoise, France). NO<sub>2</sub> (16.4 ppmv) diluted in air was obtained from Messer (Puteaux, France). Synthetic air (20 ± 1 % O<sub>2</sub> in N<sub>2</sub>, global purity 99.999 %) was purchased from Air Liquide (Paris, France).

### 2.2. Design of the exposure system

As shown in figure 1, the exposure system we designed is divided in three devices: a gas generation device, a cell exposure device and a gas analysis device, as detailed below.

#### 2.2.1. Gas generation device – Generation of controlled atmospheres

Generation of gaseous HCHO concentrations: Gaseous HCHO was obtained from an HCHO aqueous solution using a permeation tube. To do so, synthetic air was passed through a microporous PTFE membrane tube (180 cm × 0.8 cm i.d., Sumitomo Corporation, Osaka, Japan) at a highly controlled flow rate ( $F_{\text{HCHO}}$ ) of 25-100 mL min<sup>-1</sup> (Brooks Instrument, 5850S, Abrest, France). The tube was surrounded by 100 mL of a 0.10 % HCHO aqueous solution thermostated at 20.0 ± 0.2 °C. Phase equilibrium was achieved, for the dissolved HCHO, at the gas/water interface along the inner surface of the tube, similarly to the technique widely used to measure the Henry's law constant in our laboratory (Feigenbrugel et al., 2004). At the exit of this small reactor, the gas phase containing HCHO was diluted with synthetic air ( $F_{\text{AIR}}$ ). The target HCHO concentrations (up to 250 µg m<sup>-3</sup> including the average concentrations found indoors and concentrations representative of pollution peaks (Salthammer et al., 2010; Sarigiannis et al.,

2011) were reached by varying the gas flow ( $F_{\text{HCHO}}$ ) through the microporous tube as shown on supplementary figure 1A.

*Generation of NO<sub>2</sub> concentrations:* The target NO<sub>2</sub> concentrations (up to 1200  $\mu\text{g m}^{-3}$  including the average concentrations found indoors and concentrations representative of pollution peaks (Sakai et al., 2004; Speizer et al., 1980; Tunnicliffe et al., 1994)) were obtained from a 16.4 ppmv commercial gas cylinder by varying the NO<sub>2</sub> flow ( $F_{\text{NO}_2}$ ), as shown on supplementary figure 1B.

The dilution air flow ( $F_{\text{AIR}}$ ) was humidified by passing through a water bubbler. The resulting relative humidity was typically  $40 \pm 5 \%$ . The total gas flow ( $F_{\text{T}} = F_{\text{HCHO}} + F_{\text{NO}_2} + F_{\text{AIR}}$ ) was set at 3500 mL  $\text{min}^{-1}$  to allow sampling of sufficient volumes of gaseous mixture for the simultaneous real-time monitoring of the two pollutants.

*Generation of HCHO and NO<sub>2</sub> mixture:* Before cell exposure to pollutants, we verified that the two pollutants could be generated as a mixture and that the target concentrations of each one were stable during all the course of cell exposures. Figure 2 shows the record of a real-time measurement of the two pollutants during the generation of a mixture of 200  $\mu\text{g m}^{-3}$  HCHO and 800  $\mu\text{g m}^{-3}$  NO<sub>2</sub>, which are the highest target concentrations of each pollutant in our study. These concentrations were reached within the 10 min that followed the beginning of the generation and remained stable. The chamber was then opened for 4 s to insert cell plates, inducing a 48 % and 23 % decrease in the NO<sub>2</sub> and HCHO concentrations, respectively. Stability at the target concentrations was reached again within 5 min after the closing of the chamber, and concentrations remained stable during the course of the exposure and at least for up to 2 h.

### 2.2.2. Cell exposure device

The gaseous mixture containing the controlled HCHO and/or NO<sub>2</sub> concentrations was introduced continuously in a 4.8 L polystyrene exposure chamber (Mini-Desi MD-1, Sanplatec Corp., Osaka, Japan) that can contain 2 insert or culture plates. The chamber was placed in an incubator, in order to keep the cells at 37 °C during the course of exposures. Temperature and relative humidity in the chamber were controlled for each experiment using a portable device (P330, Dostmann Electronic, Wertheim-Reicholzheim, Germany). Inside the chamber, a glass tube filled with 1 mm holes allowed the gas flow to diffuse in all directions except towards the cultures, to avoid cell stress. To allow exposure to gas flow of cells cultured in plates and maintained submerged by culture medium, a rocking table was placed in the incubator under the chamber, according to the principle previously described by other studies (Persinger et al., 2001; Rusznak et al., 1999). During cell exposures, a culture medium layer of 1 mm-thick was left on the top of the cells and passed every 4 s from one side of the plate well to another through the gentle action of the rocking shelf (7°). The medium layer thickness of 1 mm was determined as the one that allowed on the one hand, exposure of all the culture surface to the pollutants (half of the monolayer surface is uncovered upon a 7° rocking of the culture) and, on another hand, hydration and nutrition of the culture (the 1-min layer covers the whole cell monolayer surface when the plates are at the horizontal position). Gas mixture was sampled near the cell cultures for pollutant analysis.

### 2.2.3. Gas analysis device – Measurement of HCHO and NO<sub>2</sub> concentrations

A chemiluminescence NO<sub>x</sub> analyzer (Seres NO<sub>x</sub> 2000G, Aix en Provence, France) was used for the real-time monitoring of NO<sub>2</sub> concentrations in the exposure chamber. This NO<sub>x</sub> analyzer was calibrated according to the manufacturer's instructions using a known mixture of NO in air (Messer, Puteaux, France).

HCHO concentrations were measured with the widely used derivative technique, in which sampled air was pumped through a 2,4-DNPH cartridge (Supelco Analytical, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France), producing the HCHO hydrazone which was quantified using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) coupled to UV detection, as described previously (Marchand et al., 2006; Marchand et al., 2008).

In addition, a homemade analyzer was used for the real-time measurement of HCHO concentrations. This measurement is based on the reaction of HCHO with a selective derivative

compound (fluoral-p) to form an easily analyzable fluorescent species. This analyzer measures HCHO concentrations according to 3 stages strongly coupled between them: 1) the uptake of the gaseous HCHO into an aqueous solution; 2) the selective derivatization of HCHO by reaction with fluoral-p (0.3 % acetic acid, 0.2 % acetylacetone, 154 g L<sup>-1</sup> ammonium acetate in water) and 3) the analysis of the reaction product by fluorescence spectroscopy (Le Calvé et al., 2010). The resulting signal is a Gaussian peak (see supplementary figure 2) whose height and area are proportional to the HCHO concentration in the aqueous solution and consequently in the gas phase. This analyzer is controlled by a computer working with a home-made software developed for Microsoft Windows. Atmosphere was sampled at the exit of the exposure chamber at a rate of 1.3 L min<sup>-1</sup> for 2 min and measurements could be performed every 6 min. The detection limit was estimated to be lower than 0.1 µg m<sup>-3</sup> and the repeatability was better than 5 %. This automated HCHO analyzer was calibrated with known concentrations of gaseous HCHO, generated using the permeation tube and determined using the 2,4-DNPH technique, as described above.

### *2.3. Cell line and culture*

The Calu-3 cell line was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, HTB-55) and grown in culture flasks (Becton-Dickinson Biosciences, Le Pont-De-Claix, France) using DMEM/F-12 culture medium supplemented with 10 % FBS, 100 U mL<sup>-1</sup> penicillin, 100 µg mL<sup>-1</sup> streptomycin, 1 µg mL<sup>-1</sup> fungizone and 5 mM HEPES. Culture was carried out at 37 °C, in a 5 % CO<sub>2</sub> humidified atmosphere. Medium was changed every other day. At confluence, cells were released with trypsin (0.5 % in PBS), counted and transferred into 12-well culture plates (Becton-Dickinson) or inserts (Falcon PET cell culture inserts for 24-well plates with transparent membrane and 0.4 µm pores, Becton-Dickinson) for experiments. Cells used in this study were from passages 21-31.

### *2.4. Cell exposure to gaseous pollutants*

#### Methods of exposure:

Exposure of cells at the air-liquid interface – Calu-3 cells were seeded on inserts at a density of 5 × 10<sup>5</sup> cells cm<sup>-2</sup> and cultured for 10 to 12 days to allow maximal TEER value (at least 1400 ohm cm<sup>2</sup>) to be reached (Kastner et al., 2011). Just before exposure to pollutants or synthetic air, the medium of the apical compartment of each insert was removed and kept at 37 °C. Cells were then placed in the exposure chamber. At the end of exposures, the apical culture media were placed again in inserts, and cells were put back in the incubator.

Exposure of cells submerged by culture medium – Calu-3 cells were seeded in 12-well plates at a density of 10<sup>5</sup> cells cm<sup>-2</sup> and cultured until confluence (5-6 days after seeding). Just before exposure to pollutants or synthetic air, 350 µL of medium were left on the culture, the remaining volume being kept at 37 °C. At the end of exposure, volumes of culture medium withdrawn from the wells were placed again on the cells, and culture plates were put back in the incubator.

#### Protocols of exposure:

Single exposures were carried out on cells at the ALI and on submerged cells. Repeated exposures were carried out once a day for 4 consecutive days on submerged cells only, taking into account (as shown in section 3.1) that exposure at the ALI was significantly stressful for the cells. Durations of exposure were fixed to 30 min, 1 h or 2 h according to previous studies and the World Health Organization guidelines for HCHO and NO<sub>2</sub> (World Health Organization, 2010). Cell viability and necrosis, and IL-6 and IL-8 release were assessed 24 h after the beginning of the single or of the last repeated exposures. TEER assessments (cells exposed at the ALI only) were carried out before the exposures, and at 4 and 24 h after the beginning of exposures.

### *2.5. Cell viability assessment*

Viability of cells exposed to pollutants or synthetic air in plates or inserts was assessed by the MTT assay according to Mosmann (Mosmann, 1983). The culture medium in the plate

wells or in the upper compartment of inserts was removed and cells were washed once with 1 mL (plates) or 350  $\mu$ L (inserts) PBS. Then, fresh culture medium containing 1 mg mL<sup>-1</sup> MTT was added allowing living cells to metabolize MTT. After dye incubation, cells were lysed with DMSO and absorbance of the resulting solution was measured at 570 nm using a Multiskan FC reader (Thermo Scientific, Courtaboeuf, France). Cell viability was expressed as the percentage of the absorbance of treated cells relative to the absorbance of control cells.

### 2.6. Cell necrosis assessment

Cell necrosis was assessed by measuring the release of lactate dehydrogenase (LDH) in the culture medium using the Cytotoxicity Detection Kit Plus assay (Roche Applied Science, Meylan, France) according to the manufacturer's instructions. LDH activity was expressed as the percentage of the maximal LDH activity obtained by cell lysis.

### 2.7. Cytokine assay

The cytokine IL-6 and the chemokine IL-8 were quantified in the cell culture supernatants using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (Becton-Dickinson Biosciences, Le Pont-De-Claix, France), according to the manufacturer's instructions. Absorbance was measured at 450 nm with a correction at 570 nm using a Multiskan FC reader (Thermo Scientific, Courtaboeuf, France). Calibration curves were used to calculate the cytokine concentrations, expressed as the percentage of the concentration in the media of treated cells relative to the concentration in the media of control cells.

### 2.8. TEER measurement

The development or the disruption of a tight epithelial cell monolayer was determined by measuring the TEER with an ohmmeter and chopstick electrodes (World Precision Instruments, Inc., Hertfordshire, UK). TEER was measured before and at 4 and 24 h after cell exposure to pollutants and data were expressed as percentage of the initial TEER value ( $t = 0$ ). The TEER value of an unseeded insert was subtracted from all measurements.

### 2.9. Statistical analysis

Results were expressed as arithmetic means  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of three independent experiments performed at least in duplicates. Statistical differences between the different groups were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni's post-test using the GraphPad Prism 4 software. Data were considered as statistically different when  $p < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Effects of single or repeated cell exposure to synthetic air

Exposure to a gas flow at the ALI has been reported to represent a significant stress for some cells (Pariselli et al., 2006; Persoz et al., 2010). For this reason, we first evaluated the effect on Calu-3 cells of single and repeated exposures to synthetic air, the cells being exposed at the ALI or while submerged. As shown on figure 3A, a single exposure of cells to synthetic air at the ALI resulted in a duration-dependent decrease in MTT metabolism. This decrease was the most important and reached significance after a 2-h exposure (69 % decrease,  $p < 0.05$ ). Conversely, exposure of cells to air triggered the release of LDH in a duration-dependent manner, with a maximal release being observed after a 2-h exposure (52 % release,  $p < 0.001$ ). The cells released more IL-6 after exposure to synthetic air at the ALI, when compared to non-exposed cells (Fig. 3B, grey bars). This release tended to increase with the duration of exposure, but it did not reach significance whatever the duration. In the same conditions, IL-8 release was not affected (Fig. 3B, black bars). TEER values measured on the cultures were not significantly affected by a 30-min or 1-h exposure to air, even if a slight decrease was observed at  $t = 4$  h (Fig. 4). This decrease was partially reversed 24 h after the exposure. On the contrary, TEER was drastically

decreased after a 2-h exposure to air (99 % decrease,  $p < 0.001$ , at  $t = 4$  h) and this decrease was not reversed 24 h after the exposure (94 % decrease,  $p < 0.001$ , at  $t = 24$  h).

Taking into account the results observed with the ALI exposure method, evaluation of the effect of synthetic air on submerged cells was conducted on cultures exposed for 30 min or 2 h at once or on 4 consecutive days. Exposure of submerged cells to air resulted in no change in MTT metabolism when cells were exposed once or 4 times for 30 min, or once for 2 h. MTT metabolism was increased however when cells were repeatedly exposed for 2 h (40 % increase,  $p < 0.001$ ) (Fig. 3C). No significant induction of LDH release was detected in submerged cells exposed to air, whatever the exposure conditions. IL-6 release remained unchanged when cells were exposed to air once whatever the duration of exposure, but a 71 % ( $p < 0.05$ ) and 225 % ( $p < 0.001$ ) increase was observed when cells were repeatedly exposed for 30 min and 2 h, respectively. IL-8 release was not significantly affected by exposure to air, whatever the exposure conditions (Fig. 3D).

### 3.2. Effects of single or repeated cell exposure to HCHO and/or NO<sub>2</sub>

The ALI method is widely used in the literature to expose cultured cells to gaseous species (Aufderheide et al., 2003; Bakand et al., 2006b; Devalia et al., 1993; Persoz et al., 2011). The above data showed decreases in cell viability and TEER values that were duration-dependent upon cell exposure to synthetic air at the ALI. The 30-min exposure evoked however little cellular damage (MTT and LDH) and no change in other endpoints (IL-6, IL-8, or TEER), in contrast to the 1-h and 2-h exposures. Therefore, the 30-min duration was used to investigate the effects of a single exposure to HCHO and NO<sub>2</sub> at the ALI on Calu-3 cells. At first, a dose-response study was conducted on each pollutant separately. For this pilot study, HCHO concentrations of 50, 100 and 200  $\mu\text{g m}^{-3}$  and NO<sub>2</sub> concentrations of 200, 400 and 800  $\mu\text{g m}^{-3}$  were used. These concentrations are within the average HCHO and NO<sub>2</sub> concentrations that are encountered indoors or are representative of peaks of HCHO and NO<sub>2</sub> pollution (Goldstein et al., 1979; Sakai et al., 2004; Salthammer et al., 2010; Sarigiannis et al., 2011; Speizer et al., 1980; Tunnicliffe et al., 1994; World Health Organization, 2010). Whatever the pollutant or its concentration, a single exposure at the ALI for 30 min had no effect on Calu-3 cell monolayer viability, necrosis, IL-6 and IL-8 secretion or TEER (data not shown). Given these results, the highest pollutant concentrations used in this pilot study, *i.e.* 200  $\mu\text{g m}^{-3}$  HCHO and 800  $\mu\text{g m}^{-3}$  NO<sub>2</sub>, were selected to assess the effect of exposure of airway epithelial cells to the mixture of HCHO and NO<sub>2</sub>. Thus, Calu-3 cells cultured on inserts were exposed once for 30 min to synthetic air, 200  $\mu\text{g m}^{-3}$  HCHO, 800  $\mu\text{g m}^{-3}$  NO<sub>2</sub>, or the mixture of both pollutants at the ALI before assessment of cell viability, necrosis, IL-6 and IL-8 release and TEER. As shown on figure 5, MTT metabolism was not affected by exposure to pollutants alone or as a mixture, compared to cells exposed to air only (Fig. 5A). LDH release was slightly increased when cells were exposed to pollutants. This increase reached significance for the mixture of pollutants only (32 % increase,  $p < 0.05$ ) when compared to cells exposed to air. However, there was no significant difference in LDH release between cells exposed to pollutants alone and cells exposed to the mixture. IL-6 and IL-8 release (Fig. 5B) and TEER (data not shown) were not significantly modified by exposure to pollutants alone or to the mixture, compared to cells exposed to air.

Given the above data, the effects of the pollutants on submerged cells were investigated for the gas mixture only, with the aim to compare the responses evoked by single and repeated exposures. Calu-3 cells cultured in plates were exposed once or 4 times (once a day for 30 min on 4 consecutive days) to synthetic air or to the mixture of 200  $\mu\text{g m}^{-3}$  HCHO and 800  $\mu\text{g m}^{-3}$  NO<sub>2</sub> before the assessment of cell viability, necrosis and IL-6 and IL-8 release. As shown on figure 5, single or repeated exposure of submerged cells to the HCHO and NO<sub>2</sub> mixture did not modify significantly MTT metabolism and LDH release (Fig. 5C), as well as IL-6 and IL-8 release (Fig. 5D) by Calu-3 cells when compared to air exposure. However, repeated exposures to HCHO and NO<sub>2</sub> triggered a significant decrease in MTT metabolism and an increase in IL-8 release when compared to single exposure to the pollutants (Fig. 5C and D,  $p < 0.05$ ).

## 4. Discussion

*In vitro* models are promising approaches to better characterize the impact of indoor air pollution on the respiratory tract. Air pollution is most often composed of a mixture of pollutants, and exposure to it generally occurs in a repeated manner. Therefore, the aim of our study was to design a dynamic system allowing the single and repeated exposure of cultured cells to two major indoor gaseous pollutants, HCHO and NO<sub>2</sub>, alone and as a mixture. This system was then used to assess the impact of the two pollutants on the Calu-3 human bronchial epithelial cell line. Assessed endpoints included cell viability and necrosis, changes in epithelial monolayer resistance and cytokine release.

The exposure system was designed to make possible the generation of HCHO and NO<sub>2</sub> not only separately, but also as a mixture. This is one of the strong points of our system, since most studies that investigated the impact of indoor air pollutants on cultured cells concerned so far individual pollutants. Importantly, generation of the pollutants in the system was achieved at concentrations that include average concentrations found in indoor environments, and concentrations that are representative of pollution peaks, namely up to 250 µg m<sup>-3</sup> for HCHO and 1200 µg m<sup>-3</sup> for NO<sub>2</sub> (Goldstein et al., 1979; Sakai et al., 2004; Salthammer et al., 2010; Sarigiannis et al., 2011; Speizer et al., 1980; Tunnicliffe et al., 1994; World Health Organization, 2010). The real-time monitoring of the pollutants in the system ensured us that the target HCHO and NO<sub>2</sub> concentrations were stable during the whole cell exposure course, even when the two gaseous pollutants were generated as a mixture. This quality of pollutant monitoring is rarely achieved in the literature, especially for HCHO since the 2,4-DNPH derivative technique largely used to measure HCHO, does not allow a sufficient temporal resolution for real-time measurements. The exposure chamber of the system was designed to carry out exposures to gaseous species according to two methods, the ALI and the submerged methods. This gave us the possibility to compare for the first time, in the same system, two exposure methods, which both present advantages and drawbacks. Indeed, while the ALI method is judged as representative of the *in vivo* situation, it could be too stressful to carry out repeated exposures because of cell stress (Pariselli et al., 2006; Persoz et al., 2010). In the submerged method, cells are alternatively exposed to the gas flow and to the culture medium, which may limit cell stress. However, one could argue that with this method the time of cell exposure to the pollutants is in reality shorter than the time spent by the cells in the exposure chamber. As well, the presence of a medium layer on the top of the culture could influence the toxicological response of the cells. However, in the present study, the thickness of the medium layer was reduced to its minimum, i.e. 1 mm. Besides, the airway epithelium is generally not directly exposed to inhaled atmospheres because of the presence of the mucus layer. Thus, we believed that exposure of submerged cells, provided that medium layer is reduced to its minimum, may represent a rather realistic method, even if dissolution of pollutants in the mucus may differ from dissolution in the culture medium. In both the ALI and submerged methods, HCHO will anyway easily dissolve in the culture medium. Yet, pollutants can be degraded or undergo chemical reactions in culture medium. In the present study, we did not investigate the fate of the two pollutants in the culture medium above the cells. The chamber of the system was designed to hold two insert or culture plates, whatever the exposure method used. This allows us to simultaneously expose 48 inserts or 24 wells respectively, and consequently to be able to assess a variety of endpoints within the same pollutant generation. This represents another strong point of our system, since the number of cell cultures that can be exposed simultaneously is sometimes a limitation of commercial systems. Finally, our system is scalable, since it can easily be adapted to other gaseous pollutants by adding appropriate generation and measurement devices.

In this system, we first exposed Calu-3 cells to synthetic air, in order to evaluate and compare the impact of each exposure method on our endpoints of interest, *i.e.* cell viability and necrosis, cytokine release and TEER. We thus demonstrated that a single exposure to synthetic

air at the ALI is responsible for a loss of integrity of the cell monolayer that increased with exposure duration and therefore limited the use of the ALI method to exposures of 30-min duration. This kind of limitation, which has been suggested by other groups using a commercial system (Pariselli et al., 2006; Persoz et al., 2010), illustrates the need to develop methods alternative to the ALI to expose cultured cells to gaseous species at once for long periods of time (> 30 min) or in a repeated manner. Thus, we evaluated in our system a second cell exposure method, the submerged method. Our results showed that it allows carrying out single cell exposures of 30-min to 2-h duration, but also to repeat 30-min exposures for 4 consecutive days without cell damage. Thus, our data demonstrate that exposure of submerged cells may be an interesting alternative to cell exposure at the ALI for the testing of gaseous pollutants, particularly when the impact of repeated exposures has to be assessed.

We then assessed the impact on Calu-3 cells of a single exposure to HCHO and NO<sub>2</sub>, individually and as a mixture. Using the ALI method, we found that cell viability and secretion of IL-6 and IL-8, as well as epithelial monolayer resistance were not affected by a single exposure to 200 µg m<sup>-3</sup> HCHO and/or 800 µg m<sup>-3</sup> NO<sub>2</sub>. A slight increase in LDH release, a marker of necrosis, was observed in response to the pollutant mixture. However, it should be stressed that whereas the MTT assay measures a metabolic activity at a given time (in our case 24 h after the exposures), the LDH assay measures the activity of an enzyme that has accumulated in the culture medium from the beginning of the exposure. Therefore, taking into account that cytokine release was unchanged, it is reasonable to think that the LDH releases measured in our experiment did not reflect a real response. In agreement with this hypothesis, most groups that investigated the effect of gaseous HCHO or NO<sub>2</sub> on airway epithelial cells exposed at the ALI reported little or no effects on cell viability, necrosis or cytokine release upon a single short-term (30 min or 1 h) exposure (Bakand et al., 2007; Bakand et al., 2006a; Pariselli et al., 2009; Persoz et al., 2010). Furthermore, in the present work, a single exposure of submerged Calu-3 cultures to the HCHO and NO<sub>2</sub> mixture did not induce as well any significant changes in cell viability, necrosis and IL-6 and IL-8 release when compared to air. All together, our data and the ones reported so far in the literature in *in vitro* models suggest that indoor air HCHO and NO<sub>2</sub> concentrations, even in mixture, are not likely to alter the integrity or to trigger some pro-inflammatory response in airway epithelial cells after a single very short-term exposure. Experimental studies have reported deleterious effects of HCHO or NO<sub>2</sub> on the respiratory tract of animals (Kakinoki et al., 1998; Monticello et al., 1991). However, these effects were observed for pollutant levels that are not relevant of indoor situations, making difficult any comparison with the data obtained so far in cell models. Controlled exposure studies in human volunteers showed limited or no effect of HCHO on lung function of healthy or asthmatic subjects after short-term exposure (1-4 h) to pollutant concentrations below 1000 µg m<sup>-3</sup> (Harving et al., 1990; Krakowiak et al., 1998; Lang et al., 2008; Wolkoff and Nielsen, 2010; World Health Organization, 2010). Hesterberg et al. reviewed human clinical data on short-term NO<sub>2</sub> exposures and reported that typical ambient NO<sub>2</sub> concentrations (i.e. below 380 µg m<sup>-3</sup>) would not impair respiratory function nor trigger an inflammation in healthy subjects (Hesterberg et al., 2009). Acute health effects in response to NO<sub>2</sub> have been reported in controlled human studies following short-term exposure at concentrations that exceeded 1880 µg m<sup>-3</sup> (World Health Organization, 2010). According to Sandström, there is evidence that lung function may decrease in response to NO<sub>2</sub> in healthy subjects at concentrations greater than 2700 µg m<sup>-3</sup> (Sandstrom, 1995). As well, airway responsiveness may increase upon NO<sub>2</sub> inhalation, but at concentrations higher than 1900 µg m<sup>-3</sup> (Folinsbee, 1992). Thus, studies on the impact of HCHO or NO<sub>2</sub> in *in vitro* models of airway epithelium led to data in line with observations made in humans.

So far, repeated toxicity studies on indoor air pollutants have been carried out within the context of animal studies only, as it is the case for HCHO or NO<sub>2</sub> (Arican et al., 2009; Ather et al., 2010; Fujimaki et al., 2004; Hubbard et al., 2002; Jung et al., 2007; Lino dos Santos Franco et al., 2006). These studies concerned a small number of pollutants among the huge variety that can be

found indoors. Consequently, a full characterization of the impact of indoor air pollution on the respiratory health using traditional toxicological methods would be animal and time consuming. In this context, the development of *in vitro* repeated dose toxicity testing is needed (Prieto et al., 2006). Thus, an important goal of our study was to assess the impact on airway epithelial cells of repeated exposures to gaseous HCHO and NO<sub>2</sub>. This goal was achieved thanks to the submerged exposure method. We then found that repeated exposures of Calu-3 cells to the pollutants at concentrations encountered indoors induced a significant decrease in MTT metabolism associated with an increase in IL-8 secretion when compared to single exposure to the same pollutants. Thus, we suggest that the development of systems and methods that allow repeated exposures to pollutant mixtures is of major interest. To our knowledge, the present study is the first one to assess the impact of repeated exposures to mixed gaseous species *in vitro*.

In conclusion, we described a system that can be used to expose cultured cells at the ALI or while submerged by culture medium to a perfectly controlled mixture of gaseous pollutants in a single or repeated manner. Using this system, we showed that the ALI method is suitable for single short-term exposures only, whereas the submerged method allows carrying out repeated exposures. As well, we suggested that systems and methods allowing the testing of the impact of repeated cell exposures to gaseous compounds are of major interest. These observations were made on a monoculture airway epithelium model. In the future, the use in this system of co-culture or 3D-constructs models that better mimic the organization of the airway epithelium (Berube et al., 2010; Klein et al., 2011) will permit to take into account the structural complexity of the airway wall and to better characterize the impact of indoor air pollution on the respiratory tract.

### **Acknowledgements**

Financial funding for this work was provided by the French Ministry of Environment through the PRIMEQUAL 2-Predit program and the Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail (EST-2009-1-30). Pierre Edouard Kastner was the recipient of a joint PhD grant from the Agence de l'Environnement et de la Maitrise de l'Energie and the Région Alsace, and a post-doctoral grant from the Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail (EST-2009-1-30). The laboratory was sponsored by the Réseau Alsace de Laboratoires en Ingénierie et Sciences de l'Environnement, the Société Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique, the Université de Strasbourg and the Centre National de la Recherche Scientifique for equipment purchase.

### **Conflict of interest**

The authors declare that they have no conflict of interest.

### **References**

- Arican, R.Y., Sahin, Z., Ustunel, I., Sarikcioglu, L., Ozdem, S., Oguz, N., 2009. Effects of formaldehyde inhalation on the junctional proteins of nasal respiratory mucosa of rats. *Exp Toxicol Pathol* 61, 297-305.
- Ather, J.L., Alcorn, J.F., Brown, A.L., Guala, A.S., Suratt, B.T., Janssen-Heininger, Y.M., Poynter, M.E., 2010. Distinct functions of airway epithelial nuclear factor-kappaB activity regulate nitrogen dioxide-induced acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 43, 443-451.
- Aufderheide, M., Knebel, J.W., Ritter, D., 2003. An improved *in vitro* model for testing the pulmonary toxicity of complex mixtures such as cigarette smoke. *Exp Toxicol Pathol* 55, 51-57.
- Bakand, S., Winder, C., Hayes, A., 2007. Comparative *in vitro* cytotoxicity assessment of selected gaseous compounds in human alveolar epithelial cells. *Toxicol In Vitro* 21, 1341-1347.



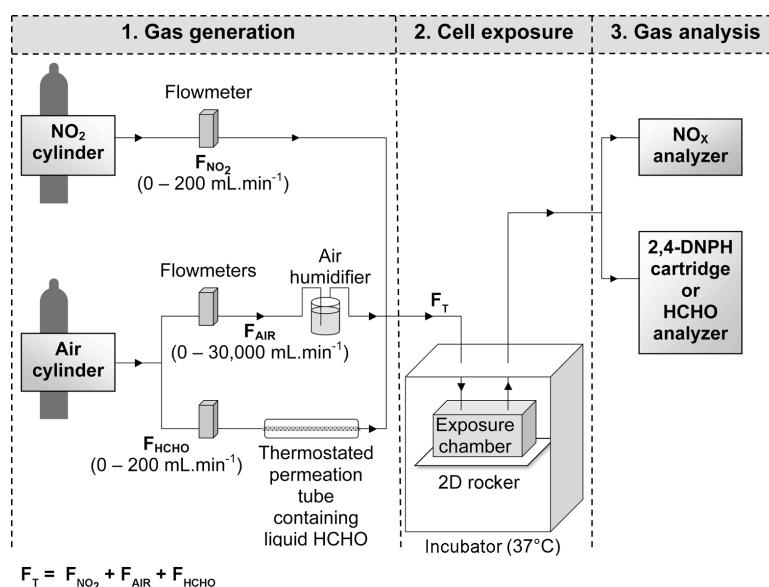
- Bakand, S., Winder, C., Khalil, C., Hayes, A., 2006a. An experimental in vitro model for dynamic direct exposure of human cells to airborne contaminants. *Toxicol Lett* 165, 1-10.
- Bakand, S., Winder, C., Khalil, C., Hayes, A., 2006b. A novel in vitro exposure technique for toxicity testing of selected volatile organic compounds. *J Environ Monit* 8, 100-105.
- Baulig, A., Sourdeval, M., Meyer, M., Marano, F., Baeza-Squiban, A., 2003. Biological effects of atmospheric particles on human bronchial epithelial cells. Comparison with diesel exhaust particles. *Toxicol In Vitro* 17, 567-573.
- Bayram, H., Devalia, J.L., Khair, O.A., Abdelaziz, M.M., Sapsford, R.J., Czarlewski, W., Campbell, A.M., Bousquet, J., Davies, R.J., 1999. Effect of loratadine on nitrogen dioxide-induced changes in electrical resistance and release of inflammatory mediators from cultured human bronchial epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol* 104, 93-99.
- Bernstein, J.A., Alexis, N., Bacchus, H., Bernstein, I.L., Fritz, P., Horner, E., Li, N., Mason, S., Nel, A., Oullette, J., Reijula, K., Reponen, T., Seltzer, J., Smith, A., Tarlo, S.M., 2008. The health effects of non-industrial indoor air pollution. *J Allergy Clin Immunol* 121, 585-591.
- Berube, K., Prytherch, Z., Job, C., Hughes, T., 2010. Human primary bronchial lung cell constructs: The new respiratory models. *Toxicology* 278, 311-318.
- Burr, M.L., 1999. Indoor air pollution and the respiratory health of children. *Pediatr Pulmonol Suppl* 18, 3-5.
- Dales, R., Liu, L., Wheeler, A.J., Gilbert, N.L., 2008. Quality of indoor residential air and health. *Can Med Assoc J* 179, 147-152.
- Devalia, J.L., Sapsford, R.J., Cundell, D.R., Rusznak, C., Campbell, A.M., Davies, R.J., 1993. Human bronchial epithelial cell dysfunction following in vitro exposure to nitrogen dioxide. *Eur Respir J* 6, 1308-1316.
- Feigenbrugel, V., Le Calve, S., Mirabel, P., Louis, F., 2004. Henry's law constant measurements for phenol, o-, m-, and p-cresol as a function of temperature. *Atmos Environ* 38, 5577-5588.
- Folinsbee, L.J., 1992. Does nitrogen dioxide exposure increase airways responsiveness? *Toxicol Ind Health* 8, 273-283.
- Fujimaki, H., Kurokawa, Y., Kunugita, N., Kikuchi, M., Sato, F., Arashidani, K., 2004. Differential immunogenic and neurogenic inflammatory responses in an allergic mouse model exposed to low levels of formaldehyde. *Toxicology* 197, 1-13.
- Garcon, G., Dagher, Z., Zerimech, F., Ledoux, F., Courcot, D., Aboukais, A., Puskaric, E., Shirali, P., 2006. Dunkerque City air pollution particulate matter-induced cytotoxicity, oxidative stress and inflammation in human epithelial lung cells (L132) in culture. *Toxicol In Vitro* 20, 519-528.
- Goldstein, B.D., Melia, R.J., Chinn, S., Florey, C.V., Clark, D., John, H.H., 1979. The relation between respiratory illness in primary schoolchildren and the use of gas for cooking--II. Factors affecting nitrogen dioxide levels in the home. *Int J Epidemiol* 8, 339-345.
- Grainger, C.I., Greenwell, L.L., Lockley, D.J., Martin, G.P., Forbes, B., 2006. Culture of Calu-3 cells at the air interface provides a representative model of the airway epithelial barrier. *Pharm Res* 23, 1482-1490.
- Harving, H., Korsgaard, J., Pedersen, O.F., Molhave, L., Dahl, R., 1990. Pulmonary function and bronchial reactivity in asthmatics during low-level formaldehyde exposure. *Lung* 168, 15-21.
- Haswell, L.E., Hewitt, K., Thorne, D., Richter, A., Gaca, M.D., 2010. Cigarette smoke total particulate matter increases mucous secreting cell numbers in vitro: a potential model of goblet cell hyperplasia. *Toxicol In Vitro* 24, 981-987.

- Hesterberg, T.W., Bunn, W.B., McClellan, R.O., Hamade, A.K., Long, C.M., Valberg, P.A., 2009. Critical review of the human data on short-term nitrogen dioxide (NO<sub>2</sub>) exposures: evidence for NO<sub>2</sub> no-effect levels. *Crit Rev Toxicol* 39, 743-781.
- Holgate, S.T., 2008. The airway epithelium is central to the pathogenesis of asthma. *Allergol Int* 57, 1-10.
- Hubbard, A.K., Symanowicz, P.T., Thibodeau, M., Thrall, R.S., Schramm, C.M., Cloutier, M.M., Morris, J.B., 2002. Effect of nitrogen dioxide on ovalbumin-induced allergic airway disease in a murine model. *J Toxicol Environ Health A* 65, 1999-2005.
- Hulin, M., Caillaud, D., Annesi-Maesano, I., 2010. Indoor air pollution and childhood asthma: variations between urban and rural areas. *Indoor Air* 20, 502-514.
- Jung, W.W., Kim, E.M., Lee, E.H., Yun, H.J., Ju, H.R., Jeong, M.J., Hwang, K.W., Sul, D., Kang, H.S., 2007. Formaldehyde exposure induces airway inflammation by increasing eosinophil infiltrations through the regulation of reactive oxygen species production. *Environ Toxicol Pharmacol* 24, 174-182.
- Kakinoki, Y., Ohashi, Y., Tanaka, A., Washio, Y., Yamada, K., Nakai, Y., Morimoto, K., 1998. Nitrogen dioxide compromises defence functions of the airway epithelium. *Acta Otolaryngol Suppl* 538, 221-226.
- Kastner, P.E., Casset, A., Pons, F., 2011. Formaldehyde interferes with airway epithelium integrity and functions in a dose- and time-dependent manner. *Toxicol Lett* 200, 109-116.
- Kawano, T., Matsuse, H., Fukahori, S., Tsuchida, T., Nishino, T., Fukushima, C., Kohno, S., 2012. Acetaldehyde at a low concentration synergistically exacerbates allergic airway inflammation as an endocrine-disrupting chemical and as a volatile organic compound. *Respiration* 84, 135-141.
- Klein, S.G., Hennen, J., Serchi, T., Blomeke, B., Gutleb, A.C., 2011. Potential of coculture in vitro models to study inflammatory and sensitizing effects of particles on the lung. *Toxicol In Vitro* 25, 1516-1534.
- Krakowiak, A., Gorski, P., Pazdrak, K., Ruta, U., 1998. Airway response to formaldehyde inhalation in asthmatic subjects with suspected respiratory formaldehyde sensitization. *Am J Ind Med* 33, 274-281.
- Lang, I., Bruckner, T., Triebig, G., 2008. Formaldehyde and chemosensory irritation in humans: a controlled human exposure study. *Regul Toxicol Pharmacol* 50, 23-36.
- Larsen, S.T., Hansen, J.S., Hansen, E.W., Clausen, P.A., Nielsen, G.D., 2007. Airway inflammation and adjuvant effect after repeated airborne exposures to di-(2-ethylhexyl)phthalate and ovalbumin in BALB/c mice. *Toxicology* 235, 119-129.
- Le Calvé, S., Zheng, W., Ponche, J.-L., Bernhardt, P. Dispositif et procédé de détermination de la concentration d'un composé dans une phase aqueuse ou gazeuse. French patent No. FR2946751 published December 17, 2010. International extension No. PCT/FR2010/051134 filed June 8, 2010.
- Lino dos Santos Franco, A., Damazo, A.S., Beraldo de Souza, H.R., Domingos, H.V., Oliveira-Filho, R.M., Oliani, S.M., Costa, S.K., Tavares de Lima, W., 2006. Pulmonary neutrophil recruitment and bronchial reactivity in formaldehyde-exposed rats are modulated by mast cells and differentially by neuropeptides and nitric oxide. *Toxicol Appl Pharmacol* 214, 35-42.
- Liu, X.Y., Yang, Z.H., Pan, X.J., Zhu, M.X., Xie, J.P., 2010. Crotonaldehyde induces oxidative stress and caspase-dependent apoptosis in human bronchial epithelial cells. *Toxicol Lett* 195, 90-98.
- Lovschall, H., Eiskjaer, M., Arenholt-Bindslev, D., 2002. Formaldehyde cytotoxicity in three human cell types assessed in three different assays. *Toxicol In Vitro* 16, 63-69.

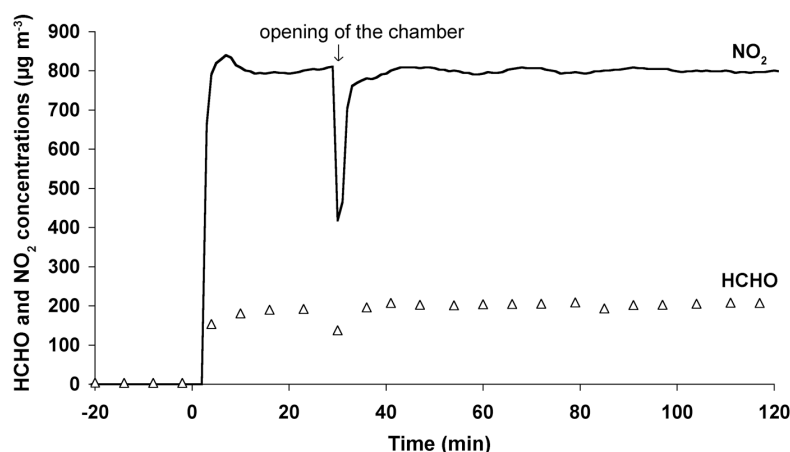
- Marchand, C., Buillot, B., Le Calve, S., Mirabel, P., 2006. Aldehyde measurements in indoor environments in Strasbourg (France). *Atmos Environ* 40, 1336-1345.
- Marchand, C., Le Calve, S., Mirabel, P., Glasser, N., Casset, A., Schneider, N., de Blay, F., 2008. Concentrations and determinants of gaseous aldehydes in 162 homes in Strasbourg (France). *Atmos Environ* 42, 505-516.
- Mills, P.R., Davies, R.J., Devalia, J.L., 1999. Airway epithelial cells, cytokines, and pollutants. *Am J Respir Crit Care Med* 160, S38-S43.
- Monticello, T.M., Miller, F.J., Morgan, K.T., 1991. Regional increases in rat nasal epithelial cell proliferation following acute and subchronic inhalation of formaldehyde. *Toxicol Appl Pharmacol* 111, 409-421.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63.
- Pariselli, F., Sacco, M.G., Rembges, D., 2006. Set-up of a dynamic in vitro exposure device for the study of indoor air pollutant effects on human derived cells, In: Kungolos, A.G., Brebbia, C.A., Samaras, C.P., Popov, V. (Eds.), *Environmental Toxicology*. WIT press, Southampton, p. 384.
- Pariselli, F., Sacco, M.G., Rembges, D., 2009. An optimized method for in vitro exposure of human derived lung cells to volatile chemicals. *Exp Toxicol Pathol* 61, 33-39.
- Persinger, R.L., Blay, W.M., Heintz, N.H., Hemenway, D.R., Janssen-Heininger, Y.M., 2001. Nitrogen dioxide induces death in lung epithelial cells in a density-dependent manner. *Am J Respir Cell Mol Biol* 24, 583-590.
- Persoz, C., Achard, S., Leleu, C., Momas, I., Seta, N., 2010. An in vitro model to evaluate the inflammatory response after gaseous formaldehyde exposure of lung epithelial cells. *Toxicol Lett* 195, 99-105.
- Persoz, C., Leleu, C., Achard, S., Fasseu, M., Menotti, J., Meneceur, P., Momas, I., Derouin, F., Seta, N., 2011. Sequential air-liquid exposure of human respiratory cells to chemical and biological pollutants. *Toxicol Lett* 207, 53-59.
- Poynter, M.E., Persinger, R.L., Irvin, C.G., Butnor, K.J., van Hirtum, H., Blay, W., Heintz, N.H., Robbins, J., Hemenway, D., Taatjes, D.J., Janssen-Heininger, Y., 2006. Nitrogen dioxide enhances allergic airway inflammation and hyperresponsiveness in the mouse. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290, L144-152.
- Prieto, P., Baird, A.W., Blaauboer, B.J., Castell Ripoll, J.V., Corvi, R., Dekant, W., Dietl, P., Gennari, A., Gribaldo, L., Griffin, J.L., Hartung, T., Heindel, J.J., Hoet, P., Jennings, P., Marocchio, L., Noraberg, J., Pazos, P., Westmoreland, C., Wolf, A., Wright, J., Pfaller, W., 2006. The assessment of repeated dose toxicity in vitro: a proposed approach. The report and recommendations of ECVAM workshop 56. *Altern Lab Anim* 34, 315-341.
- Roda, C., Kousignian, I., Guihenneuc-Jouyau, C., Dassonville, C., Nicolis, I., Just, J., Momas, I., 2011. Formaldehyde exposure and lower respiratory infections in infants: findings from the PARIS cohort study. *Environ Health Perspect* 119, 1653-1658.
- Rusznak, C., Sapsford, R.J., Devalia, J.L., Justin John, R., Hewitt, E.L., Lamont, A.G., Wood, A.J., Shah, S.S., Davies, R.J., Lozewicz, S., 1999. Cigarette smoke potentiates house dust mite allergen-induced increase in the permeability of human bronchial epithelial cells in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20, 1238-1250.
- Sakai, K., Norback, D., Mi, Y.H., Shibata, E., Kamijima, M., Yamada, T., Takeuchi, Y., 2004. A comparison of indoor air pollutants in Japan and Sweden: formaldehyde, nitrogen dioxide, and chlorinated volatile organic compounds. *Environ Res* 94, 75-85.
- Salthammer, T., Mentese, S., Marutzky, R., 2010. Formaldehyde in the Indoor Environment. *Chem Rev* 110, 2536-2572.

- Sandstrom, T., 1995. Respiratory effects of air pollutants: experimental studies in humans. *Eur Respir J* 8, 976-995.
- Sarigiannis, D.A., Karakitsios, S.P., Gotti, A., Liakos, I.L., Katsoyiannis, A., 2011. Exposure to major volatile organic compounds and carbonyls in European indoor environments and associated health risk. *Environ Int* 37, 743-765.
- Speizer, F.E., Ferris, B., Jr., Bishop, Y.M., Spengler, J., 1980. Respiratory disease rates and pulmonary function in children associated with NO<sub>2</sub> exposure. *Am Rev Respir Dis* 121, 3-10.
- Tunnicliffe, W.S., Burge, P.S., Ayres, J.G., 1994. Effect of domestic concentrations of nitrogen dioxide on airway responses to inhaled allergen in asthmatic patients. *Lancet* 344, 1733-1736.
- Verstraelen, S., Bloemen, K., Nelissen, I., Witters, H., Schoeters, G., Van Den Heuvel, R., 2008. Cell types involved in allergic asthma and their use in in vitro models to assess respiratory sensitization. *Toxicol In Vitro* 22, 1419-1431.
- Wan, H., Winton, H.L., Soeller, C., Stewart, G.A., Thompson, P.J., Gruenert, D.C., Cannell, M.B., Garrod, D.R., Robinson, C., 2000. Tight junction properties of the immortalized human bronchial epithelial cell lines Calu-3 and 16HBE14o. *Eur Respir J* 15, 1058-1068.
- Wolkoff, P., Nielsen, G.D., 2010. Non-cancer effects of formaldehyde and relevance for setting an indoor air guideline. *Environ Int* 36, 788-799.
- World Health Organization, 2010. WHO guidelines for indoor air quality: selected pollutants. World Health Organization, Regional Office for Europe, Copenhagen.
- Zhu, Y., Chidekel, A., Shaffer, T.H., 2010. Cultured human airway epithelial cells (calu-3): a model of human respiratory function, structure, and inflammatory responses. *Crit Care Res Pract* 2010, 394578.

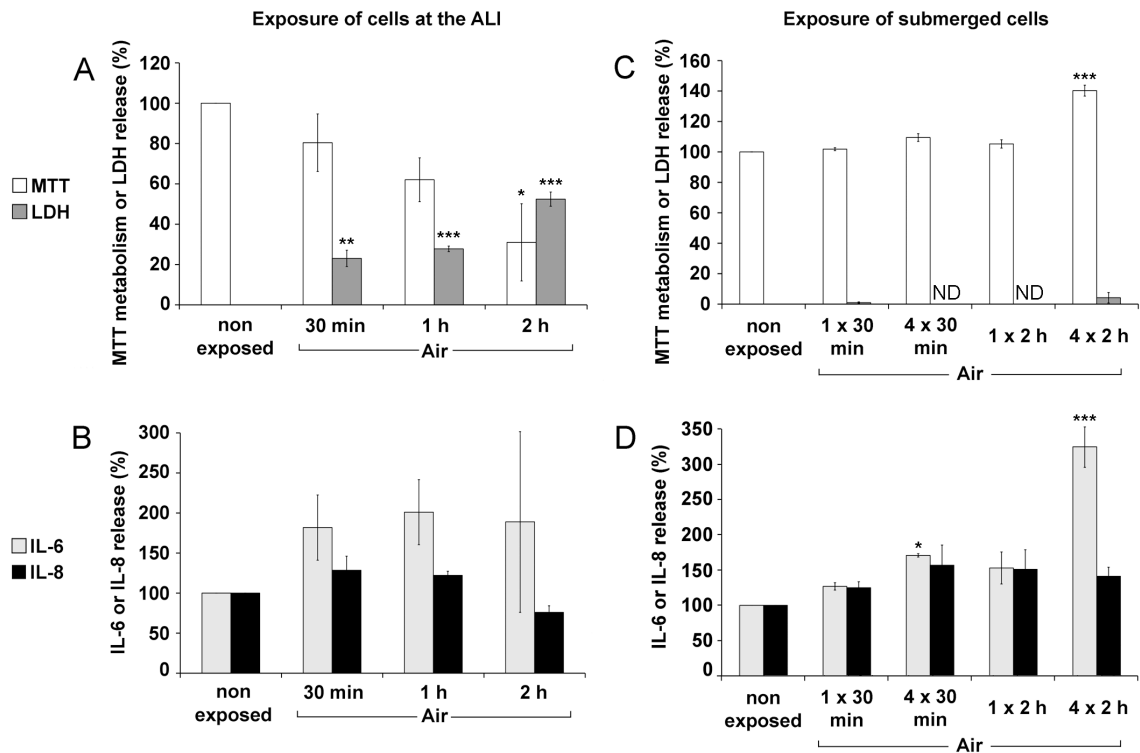
## Figures



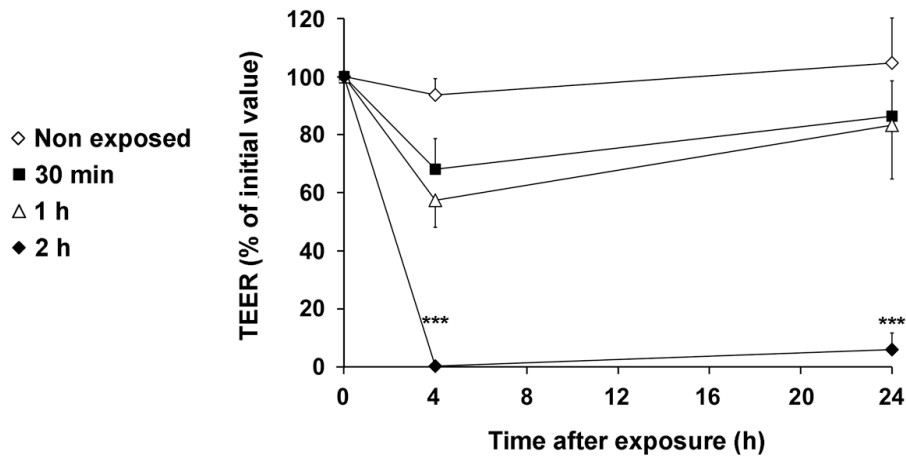
**Fig.1** System for exposure of cell cultures to controlled concentrations of gaseous HCHO and NO<sub>2</sub>. In the gas generation device (1), NO<sub>2</sub> is obtained from a commercial gas cylinder, and gaseous HCHO is obtained from an HCHO aqueous solution, using a permeation tube. Both pollutants are diluted in humidified synthetic air and introduced in the cell exposure device (2). The NO<sub>2</sub>, HCHO and air flows ( $F_{NO_2}$ ,  $F_{HCHO}$  and  $F_{AIR}$ , respectively) are controlled using mass flowmeters. The cell exposure device (2) is composed of an exposure chamber placed in an incubator thermostated at 37 °C. A 2D-rocker is used to expose cells submerged by culture medium to pollutants. Atmosphere is sampled near the culture plates for analysis. In the gas analysis device (3), NO<sub>x</sub> concentrations are measured using a commercial NO<sub>x</sub> analyzer, and HCHO concentrations are measured using both the classical 2,4-DNPH derivative technique and an HCHO analyzer developed in our laboratory.



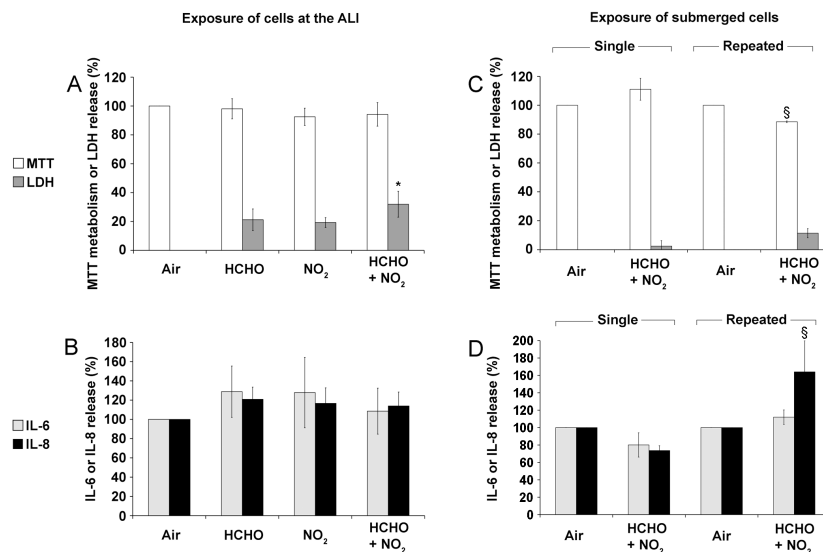
**Fig.2** Time-course of NO<sub>2</sub> (black line) and HCHO (open triangles) concentrations, as monitored during the generation of a mixture of HCHO and NO<sub>2</sub>. Gaseous pollutant generation started at t=0 min. Stability of desired concentrations (800 µg m<sup>-3</sup> for NO<sub>2</sub> and 200 µg m<sup>-3</sup> for HCHO) were reached in less than 10 min. The chamber was opened for 4 s at t=30 min to insert cell culture plates, provoking a decrease in concentrations. The target concentrations were reached again in less than 5 min, and were stable during the whole exposure and up to 2 h.



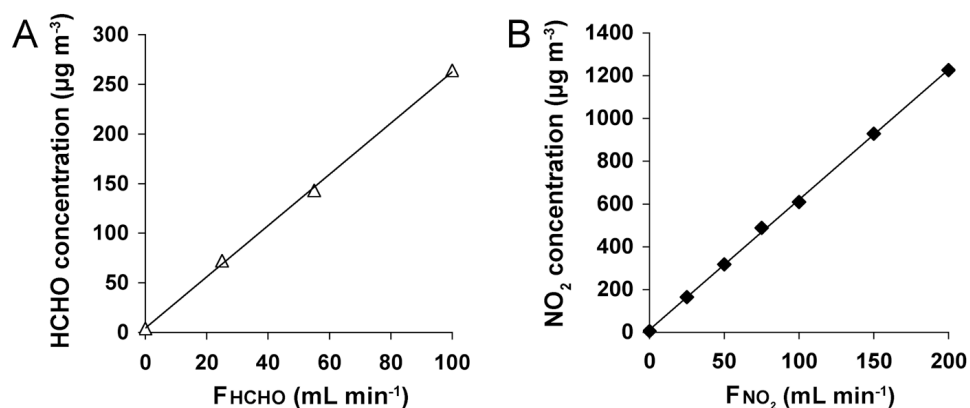
**Fig.3** MTT metabolism, LDH release, and IL-6 and IL-8 secretion by Calu-3 cells after single or repeated exposures to synthetic air. A, B: Cells were cultured on inserts until maximal TEER values were reached and were exposed once to synthetic air at the ALI for 30 min, 1 h or 2 h. C, D: Cells were cultured in 12-well plates until confluence was reached, and were exposed once, or once a day for 4 consecutive days to synthetic air for 30 min or 2 h. In both exposure protocols, non-exposed cells were used as controls. MTT metabolism (A and C, white bars), LDH release (A and C, dark grey bars) and IL-6 (B and D, light grey bars) and IL-8 (B and D, black bars) secretions were assessed 24 h after the beginning of the single or the last repeated exposure, as described in the material and methods section. Results are expressed as percentage of non-exposed cells. Data are mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$  vs controls (non exposed cells). ND, non detected.



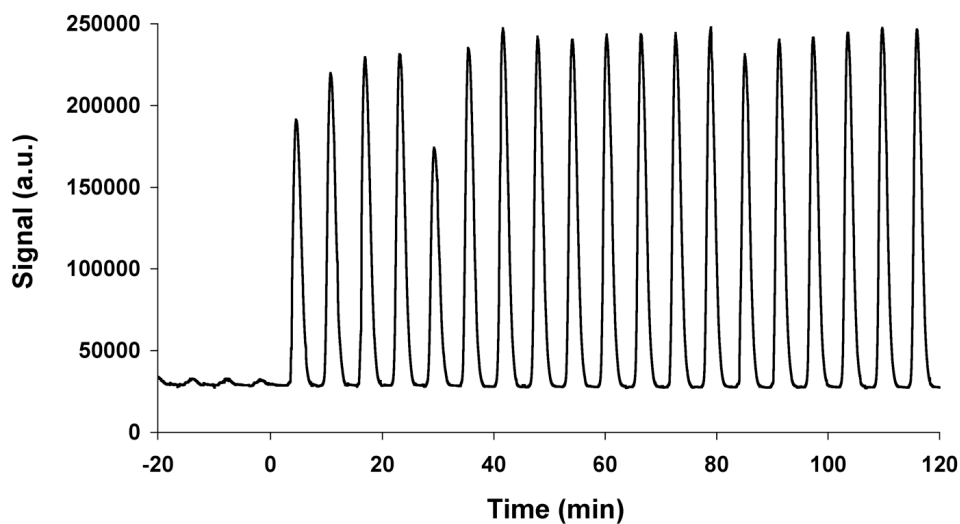
**Fig.4** TEER of Calu-3 cell monolayers after exposure to synthetic air at the ALI. Cells were cultured on inserts until maximal TEER values were reached and were exposed to synthetic air for 30 min, 1 h or 2 h. TEER was monitored just before the exposures (t=0 h), at t=4 h and at t=24 h.  $\diamond$  non-exposed cells (control),  $\blacksquare$  cells exposed for 30 min,  $\triangle$  cells exposed for 1 h,  $\blacklozenge$  cells exposed for 2 h. Results are expressed as percentage of the initial value (t=0 h) for each exposure condition. Data are mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. \*\*\*  $p < 0.001$  vs controls.



**Fig.5** MTT metabolism, LDH release, and IL-6 and IL-8 secretion by Calu-3 cells after single or repeated exposures to gaseous pollutants. A, B: Cells were cultured on inserts until maximal TEER values were reached, and were exposed once for 30 min to synthetic air, to 200  $\mu\text{m}^{-3}$  HCHO and/or 800  $\mu\text{m}^{-3}$  NO<sub>2</sub> at the ALI. C, D: Cells were cultured in 12-well plates until confluence was reached, and were exposed for 30 min at once, or once a day for 4 consecutive days to synthetic air or to 200  $\mu\text{m}^{-3}$  HCHO and 800  $\mu\text{m}^{-3}$  NO<sub>2</sub>. In both exposure protocols, air-exposed cells were used as controls. MTT metabolism (A and C, white bars), LDH release (A and C, dark grey bars) and IL-6 (B and D, light grey bars) and IL-8 (B and D, black bars) secretions were assessed 24 h after the beginning of the single or the last repeated exposure, as described in the material and methods section. Results are expressed as percentage of air-exposed cells. Data are mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. \*  $p < 0.05$  vs controls (air-exposed cells) and  $\S$   $p < 0.05$  vs single exposure to pollutants.



**Supplementary fig.1** Generation of gaseous HCHO (A) and NO<sub>2</sub> (B) concentrations. Target pollutant concentrations were reached by varying the HCHO and NO<sub>2</sub> gas flows ( $F_{\text{HCHO}}$  and  $F_{\text{NO}_2}$ ), respectively.



**Supplementary fig.2** Typical tracing of HCHO monitoring using the real-time HCHO analyzer developed in our laboratory. This analyzer provides one measurement every 6 min, resulting in a peak whose height and area are proportional to the HCHO concentration.