



INSTITUT NATIONAL DE L'ENVIRONNEMENT INDUSTRIEL ET DES RISQUES

Toxicité des particules émises par la circulation automobile :

Suivi et Synthèse bibliographique

Rapport final

Fiche X

Dr Sylvie TISSOT

*Loi sur l'Air
Convention 13/98*

Décembre 1999

TABLE DES MATIERES

1. OBJECTIFS	3
2. GLOSSAIRE - ABREVIATIONS.....	3
2.1 DEFINITIONS	3
2.2 ABREVIATIONS	5
3. INTRODUCTION	6
4. TOXICOLOGIE ANALYTIQUE.....	7
4.1 DUALITE DE LA NATURE DES EMISSIONS DIESEL	7
4.2 POTENTIALISATION BIOMECHANIQUE DES RISQUES TOXIQUES.....	7
5. TOXICOLOGIE HUMAINE ET EFFETS SUR LA SANTE.....	8
5.1 DONNÉES ÉPIDÉMIOLOGIQUES	8
5.1.1 Données épidémiologiques des effets non cancérigènes	8
5.1.2 Données épidémiologiques de cancérogenèse	9
5.2 DONNÉES CLINIQUES SUR VOLONTAIRES HUMAINS ET POPULATIONS PROFESSIONNELLEMENT EXPOSEES.....	10
5.2.1 Etudes cliniques des effets non cancérigènes	10
5.2.2 Etudes cliniques des effets cancérigènes	10
6. TOXICOLOGIE EXPERIMENTALE : ETUDE DES EFFETS NON TUMORAUX	11
6.1 ETUDE DES EFFETS FONCTIONNELS DIRECTS	12
6.1.1 Effets sur la fonction respiratoire	12
6.1.2 Effets sur les cellules des voies respiratoires	13
6.1.3 Effets sur les cellules inflammatoires	14
6.1.4 Effets sur les protéines cellulaires : activités enzymatiques, « messagers » cellulaires	14
6.2 ETUDE DES EFFETS POTENTIALISATEURS D’AFFECTIONS RESPIRATOIRES	15
6.2.1 Pathogénie des effets immunotoxiques	16
6.2.2 Etude mécanistique de ces effets potentialisateurs	16
6.3 AUTRES EFFETS PATHOLOGIQUES	17

7. TOXICOLOGIE EXPERIMENTALE : ETUDE DES EFFETS TUMORAUX	18
7.1 ETUDE DE MUTAGENESE <i>IN VITRO</i>	18
7.1.1 Etudes de mutations génétiques	18
7.1.2 Etudes de transformation cellulaire	19
7.2 ETUDE DE CANCEROGENESE <i>IN VIVO</i>	20
8. CONCLUSION	21
9. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	22

1. OBJECTIFS

Ce travail vise à compiler les données publiées récemment relatives à la toxicité des émissions des moteurs essence et diesel et en particulier des effets de leur phase particulaire.

La finalité de ce travail est d'offrir une vision synthétique de l'état des connaissances dans ce domaine et de permettre une argumentation scientifique quant à l'évaluation des risques toxicologiques liés à l'exposition à de tels polluants.

Les données recueillies concernent à la fois des études épidémiologiques et des études expérimentales *in vivo* et *in vitro*. Seules les données jugées pertinentes ont été retenues.

2. GLOSSAIRE – ABREVIATIONS

2.1 DEFINITIONS

Allergène : substance (antigène) déterminant une allergie.

Antigène : toute substance qui pénétrant dans un organisme provoque chez celui-ci la formation d'anticorps spécifiques et induit une réaction d'hypersensibilité ou une réaction de tolérance immunitaire.

Atélectasie : affaissement des alvéoles pulmonaires dépourvues de leur ventilation alors que fonctionne la circulation sanguine.

Biotransformations : modifications par des systèmes enzymatiques d'un xénobiotique après pénétration dans l'organisme. Ces réactions permettent l'élimination des toxiques sous forme de métabolites plus ou moins inactifs. Dans quelques cas, les métabolites formés s'avèrent plus toxiques que la molécule-mère.

Cancérogénicité : aptitude d'une substance (cancérogène) à provoquer le développement d'un cancer.

Carcinome : tumeur épithéliale maligne.

Cytokine : protéine sécrétée par une cellule et allant se fixer sur une cellule pour y déclencher divers phénomènes cellulaires. Il existe différentes cytokines en fonction des types cellulaires : les lymphokines, les interleukines, ...

Cytotoxicité : phénomène de destruction cellulaire.

Déposition : terme générique utilisé pour définir la quantité de particules se déposant au niveau des voies aériennes pulmonaires. Elle correspond à un pourcentage de la quantité totale inhalée.

Hème : élément constitutif de l'hémoglobine qui se combine de manière réversible à l'oxygène et permet son transport dans l'organisme.

Immunoglobulines : famille de globulines (protéines) présentes dans le sérum et autres liquides physiologiques, douées de propriétés anticorps. Elles jouent un rôle essentiel dans la défense de l'organisme contre les agressions. Les immunoglobulines de type E sont associées aux réactions de type allergique.

Interleukines : c'est une famille de molécules solubles sécrétées par les macrophages et certains lymphocytes et qui stimulent d'autres cellules intervenant dans les réactions immunitaires et inflammatoires.

Kératinocyte : cellule cutanée se différenciant par accumulation de kératine.

Leucocyte : globule blanc.

Lymphocyte : leucocyte mononucléaire impliqué dans les réactions immunitaires spécifiques à médiation humorale et/ou cellulaire.

Macrophage : cellule dérivée des monocytes sanguins, capable de phagocytose, intervenant dans les réactions inflammatoires et les mécanismes immunitaires.

Mitose : mode de division cellulaire caractérisé par la genèse de deux molécules-filles identiques (clones) à partir d'une même cellule.

Mutagenèse : production d'une mutation (modification plus ou moins étendue de l'information génétique d'un organisme, parfois héréditaire).

Neurohormone : substance protéique sécrétée par certains éléments du système nerveux capable d'agir localement ou à distance.

Neutrophilie : augmentation du nombre de polynucléaires neutrophiles caractérisant une réaction de type inflammatoire.

Oncogène : gène intervenant dans le contrôle de la prolifération cellulaire et capable de provoquer un processus de cancérisation.

Phagocytose : absorption de particules solides par une cellule permettant la capture de ces particules à des fins de nutrition ou d'épuration.

Pneumocyte : grande cellule alvéolaire granuleuse en placard, constituant la paroi des alvéoles pulmonaires.

Rhinorrhée : écoulement de liquide par le nez.

Test d'Ames : tests de mutation reverse sur micro-organismes (différentes souches bactériennes) réalisés pour évaluer le caractère mutagène d'une substance.

Tolérance immunitaire : incapacité pour un sujet adulte de déclencher une réponse immunologique lors de l'introduction dans son organisme d'un antigène.

Xénobiotique : substance chimique étrangère à l'organisme et se comportant comme un toxique ou un allergène vis-à-vis de l'organisme.

2.2 ABREVIATIONS

ADN : Acide DésoxyriboNucléique. Support de l'information génétique.

GM-CSF : GM- Colony Stimulating Factor. Facteur de croissance cellulaire particulier des macrophages.

HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques.

IL- (x) : Interleukines. (x) correspond au numéro particulier affecté à chaque interleukine.

LBA : Lavage broncho-alvéolaire.

TNF α : Tumor Necrosis Factor.

3. INTRODUCTION

La toxicité potentielle des émissions des moteurs à combustion et plus particulièrement des moteurs diesels a donné lieu à de nombreuses expertises par les organismes sanitaires publics des pays industrialisés (INERIS, 1993 ; Société Française de Santé Publique (SFSP), 1996 ; IARC, 1989 ; Health Effects Institute, 1995 ; ...).

A l'époque, la majorité de ces travaux se sont préoccupés des effets mutagènes et cancérigènes éventuels des émanations émises par les moteurs. Expérimentalement, le caractère mutagène de ces résidus de combustion a été prouvé mais certains mécanismes de mutagenèse sont encore à élucider.

Toutefois, si le caractère mutagène permet de soupçonner un effet promoteur tumoral, elle n'implique pas automatiquement la tumorigénèse. Ainsi, la carcinogénicité de telles émanations n'a pu être démontrée que pour certaines espèces animales et pour des concentrations en polluant très supérieures à celles rencontrées dans l'environnement. Chez l'homme, les études épidémiologiques tendent à démontrer une augmentation de l'incidence des carcinomes pulmonaires et de la vessie au sein des populations professionnellement exposées ces émanations. (30).

Plus récemment, les émissions des moteurs (plus particulièrement diesel) ont été impliquées en tant que facteur aggravant de certaines affections respiratoires telles que l'asthme ou encore dans la survenue d'accidents cardio-vasculaires chez des sujets à risque. (59, 10, 24, 12).

Le rôle nocif probable des émissions particulaires et gazeuses des moteurs à combustion ainsi que l'augmentation non négligeable de ces émissions en milieu urbain ont amené à la réalisation de nombreux travaux. Certaines études se sont focalisées :

- (i) sur la nature physico-chimique de ces émissions et sur les conséquences biomécaniques qu'elles impliquent ;
- (ii) sur les répercussions épidémiologiques à plus ou moins grande échelle ;
- (iii) sur l'influence de ces émanations dans la physiopathogénie des affections tumorales ou inflammatoires.

4. TOXICOLOGIE ANALYTIQUE

La toxicologie analytique est un des éléments nécessaires à l'évaluation des risques toxicologiques pour l'homme. Elle consiste à étudier la composition chimique d'un mélange et à en déduire le risque encouru d'après les connaissances sur la toxicité des composés. Cette évaluation est difficile car les synergies entre les différents produits d'un mélange sont souvent mal connues.

La toxicité des émissions des moteurs liée à la combustion des hydrocarbures est d'autant plus complexe que les produits qui les composent sont multiples.

4.1 DUALITE DE LA NATURE DES EMISSIONS DIESEL

La qualité de la combustion d'un carburant diesel dépend beaucoup des propriétés de celui-ci, du type et du réglage du moteur. Elle conditionne la formation des polluants particulaires et gazeux. Contrairement au moteur essence, le mélange air-gazole brûlé est très hétérogène.

Ce type de combustion réunit les conditions favorables à la formation de carbone libre ou de produits solides très riches en carbone, désignés sous le terme de particules ou suies.

Des composés volatils sont également formés lors de cette combustion. Il s'agit principalement de monoxyde de carbone (CO), d'oxydes d'azote (NOx), d'anhydride sulfureux (SO₂) et ses dérivés, des hydrocarbures polycycliques aromatiques (HAP). Ces derniers ainsi que des hydrocarbures imbrûlés et des composés organiques oxygénés (aldéhydes, cétones, phénols, alcools, ...) s'adsorbent sur la fraction particulaire carbonée. Les quantités et les proportions de composés émis sont fonction des conditions d'oxygénation et de température.

Les particules diesel retrouvées dans l'atmosphère sont en général de petite taille, de l'ordre du micron (1 µm). Elles proviennent de l'agrégation de particules primaires carbonées sous forme de grappe ou chapelet. Ce squelette de carbone à surface irrégulière permet l'adsorption ou la condensation de divers composés et plus particulièrement des HAP.

4.2 POTENTIALISATION BIOMECHANIQUE DES RISQUES TOXIQUES

La toxicité des émissions des moteurs diesel est liée à leur phase particulaire et à leur phase gazeuse, source de composés volatils se solubilisant dans les voies aériennes pulmonaires.

Les particules en suspension dans l'air et de taille inférieure à 2 µm (cas des particules diesel) sont capables d'atteindre le parenchyme pulmonaire profond (étage alvéolaire). La « déposition » de ces particules s'effectue majoritairement au niveau trachéo-bronchique et alvéolaire. La déposition au niveau du rhinopharynx est plus faible. Pour des particules de taille supérieure (> 10 µm), une majorité des éléments reste piégée dans les voies respiratoires hautes. Ainsi, les particules diesel constituent un véhicule aérodynamique qui délivre au plus profond de l'arbre respiratoire les composés adsorbés à leur surface.

La clairance (élimination) particulaire est la capacité de l'organisme à éliminer les particules déposées. Elle détermine la fraction retenue par l'organisme. Cette fraction est biologiquement active et responsable des effets toxiques potentiels.

Une étude récente (53) comparant certains effets biologiques d'émanations diesel filtrées (débarrassées de leur phase particulaire) ou non, confirme que les effets nocifs observés sont essentiellement liés à la phase particulaire (/à la phase gazeuse) de ces émissions. Les composés adsorbés (32, 42) sur les particules semblent être responsables de la plus grande part des effets observés.

La complexité et la diversité des molécules et métaux présents à la surface des particules diesel rend difficile la détermination précise de l'origine de l'inflammation. L'étude de la physiopathologie de cette exposition doit tenir compte de ce caractère hétéroclite.

5. TOXICOLOGIE HUMAINE ET EFFETS SUR LA SANTE

Pour des raisons éthiques évidentes, la majorité des données de toxicologie humaine sont des études épidémiologiques. Quelques études expérimentales ont toutefois été réalisées sur des volontaires sains.

5.1 DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES

5.1.1 Données épidémiologiques des effets non cancérogènes

Au cours des 30 dernières années, en Europe et aux USA, une augmentation du nombre de sujets allergiques est observé et ceci malgré une diminution des saisons pollinifères. Ces changements semblent trop rapides pour être liés à des altérations du patrimoine génétique des individus. Une association possible avec des facteurs environnementaux est plutôt suspectée. A ce titre, des études épidémiologiques suggèrent une interaction entre les maladies allergiques (rhinites allergiques, asthme) et la pollution due à la circulation automobile. Des investigations de laboratoire confortent ces interactions en indiquant une exacerbation de la sensibilité des individus aux allergènes liée aux particules diesel. (12, 52, 24).

Des études de plus en plus nombreuses examinent le lien entre l'asthme et la pollution atmosphérique, en particulier la pollution par les moteurs diesel. Ainsi, une augmentation des admissions hospitalières pour crises d'asthme est observée lors de forts pics de pollution et ceci indépendamment des conditions climatiques. (11).

Le rôle potentiel de la pollution diesel dans l'induction ou la potentialisation d'allergies préexistantes ou non, est un axe majeur de recherche. Chez des populations professionnellement exposées aux émissions diesel (conducteurs de locomotives diesel), on observe le développement d'asthme allergique alors que ces individus sont non fumeurs et non pas d'antécédents de pathologies respiratoires allergiques. (76). De nombreux travaux expérimentaux sont menés afin d'élucider les mécanismes impliqués mais tout n'est pas encore connu.

Par exemple, chez des individus asthmatiques, une intensification des crises d'asthme liées aux pollens est observée. (24). Or, quelques études montrent que les particules diesel peuvent adsorber à leur surface des allergènes spécifiques de ces pollens et leur servir de véhicule. (25). Ainsi, les particules diesel facilitent la pénétration profonde des allergènes dans l'arbre respiratoire et donc la réaction immunologique consécutive : augmentation significative des taux sériques d'immunoglobulines de type E chez des individus exposés à une association de pollens et de particules diesel. (24).

Une étude étiologique des consultations pour crises d'asthme chez des enfants et des adolescents montre une association nette avec la qualité de l'air. Il existe une corrélation positive entre des teneurs élevées en NO₂ et en particules suspendues dans l'air et une augmentation des crises d'asthme chez les enfants (3-12 ans). Aucun lien n'a pu être démontré pour les adolescents examinés. (10).

5.1.2 Données épidémiologiques de cancérogène

Un rapport (Lafon, 1993), compilant une soixantaine d'enquêtes épidémiologiques menées dans des populations professionnellement exposées aux émanations de moteurs (notamment les conducteurs de poids lourds, autobus, engins de chantier, ...) concluait à une augmentation faible mais sensible des cancers pulmonaires et de la vessie. Toutefois, ces enquêtes épidémiologiques ne permettaient pas d'éliminer certains facteurs de confusion, comme le tabagisme, et d'imputer indubitablement l'accroissement de la prévalence de telles affections aux seules émissions de moteurs. (30).

Plus récemment, plusieurs études ont permis de confirmer la corrélation entre une exposition chronique à des émanations diesel et un risque accru de cancer des voies respiratoires. (5). Steenland et al. (1998) ont tenté d'intégrer le paramètre du tabagisme. Leurs travaux indiquent que des individus professionnellement exposés, non fumeurs, présentent un risque de cancer pulmonaire 10 fois supérieur à celui d'individus non exposés. (60).

Toutefois, une étude menée à partir de 47 études épidémiologiques et tenant compte de l'étiologie plurifactorielle des tumeurs pulmonaires (39 paramètres différents recueillis) indique qu'il existe une corrélation positive entre la survenue d'une tumeur pulmonaire et l'exposition aux émanations diesel ; mais que cette corrélation est beaucoup moins importante qu'entre ce même cancer et le tabagisme. (34).

Par ailleurs, une étude expérimentale de mutagenèse comparée entre les particules diesel et la fumée de cigarette a permis de constater que l'effet mutagène d'une unique cigarette équivaut à celui consécutif à une exposition quotidienne de 12 heures aux émanations diesel (à la dose de 1,5 µg/m³) pendant environ 10 ans. (73). Ainsi, si le caractère potentiellement génotoxique des émanations diesel existe, il reste difficile à évaluer objectivement.

5.2 DONNEES CLINIQUES SUR VOLONTAIRES HUMAINS ET POPULATIONS PROFESSIONNELLEMENT EXPOSEES

5.2.1 Etudes cliniques des effets non cancérogènes

Quelques études ont été menées afin de mettre en évidence certains effets toxiques des particules diesel sur des volontaires sains.

De plus, de nombreuses études ont été menées dans divers milieux professionnels afin d'évaluer une éventuelle diminution des capacités ventilatoires. Un certain nombre ont montré une diminution de la capacité respiratoire et une augmentation des bronchites chroniques et des symptômes pulmonaires tels que de la toux. Toutefois, une relation directe de causes à effets n'a pas pu être clairement mise en évidence à cause d'un tabagisme concomitant. (39).

Des études d'exposition aiguë à des concentrations importantes d'émanations diesel ont été réalisées. Les volontaires exposés ont présenté des irritations nasales et oculaires réversibles ainsi qu'une diminution transitoire de la capacité ventilatoire pulmonaire. (39).

Il existe un lien épidémiologique évident entre des taux de particules atmosphériques élevés (surtout des particules diesel) et une exacerbation de troubles respiratoires tels que des affections pulmonaires infectieuses ou de l'asthme (cf. §5.1.). Une recherche d'une relation de causes à effets inflammatoires a été menée par Salvi et *al.* (1999). Une exposition courte (1 heure) à des particules diesel sur volontaires sains a été suivie de lavages bronchoalvéolaires (LBA) et de dosages sanguins. Chez ces individus, l'étude des LBA a montré une réponse inflammatoire aiguë : augmentation des cellules inflammatoires (macrophages, polynucléaires neutrophiles) et des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8, GM-CSF). La neutrophilie pulmonaire est également associée à une neutrophilie sanguine. Ces données confirment les signes cliniques précédemment observés. (59).

5.2.2 Etudes cliniques des effets cancérogènes

Les études cliniques prospectives concernant les maladies tumorales sont difficiles. En effet, elles exigent un suivi long (sur plusieurs dizaines d'années) des patients surveillés, ce qui est, sauf conditions particulières et dans la plupart des cas, impossible.

Toutefois, des études ponctuelles basées sur la détection de métabolites de résidus d'émissions de moteurs (HAP, nitro-HAP et benzène) chez des personnes particulièrement exposées (45 conducteurs de bus) dans les fluides biologiques ont permis de constater une accumulation de ces polluants et de leurs métabolites dans l'organisme. Le pouvoir carcinogène des particules diesel semble en grande partie lié à ces HAP, nitro-HAP et résidus benzéniques adsorbés à la surface des particules. Une telle constatation permet de légitimement suspecter un risque accru de tumeurs directement liées à l'environnement chez ces catégories de personnes. (44).

Par ailleurs, cette même étude a mis en évidence l'existence d'altérations des cellules sanguines circulantes chez ces personnes. Leurs lymphocytes accumulent une quantité anormale de métabolites liés à la formation de l'hème. Ce phénomène est consécutif à une diminution de l'activité ferrochélatase intracellulaire lymphocytaire. Les HAP et le benzène sont connus pour perturber le métabolisme de l'hème et induire une accumulation de ses métabolites intermédiaires par altération des synthèses enzymatiques. (44). L'accumulation de tels métabolites pourrait servir de biomarqueur permettant de déceler une exposition prolongée et anormalement élevée aux émanations des moteurs.

Dans le même esprit, le dosage des nitro-HAP chélatés à l'hémoglobine érythrocytaire est une méthode également envisageable. Des dosages réalisés chez des travailleurs de bord des routes ont montré des concentrations sensiblement augmentées de ces produits. (83).

Des tests urinaires de détection et de dosage des HAP et/ou de leurs métabolites sont également possibles. (74). Ils sont parfois réalisés chez les individus manipulant des produits génotoxiques dans le cadre de leur activité professionnelle. Ces dosages pourraient être étendus aux professions exposées à de fortes concentrations en particules diesel. La pertinence de ce moyen de dépistage reste à évaluer.

Si la recherche de biomarqueurs liés aux HAP et nitro-HAP semble intéressante dans l'évaluation quantitative de l'exposition aux particules diesel et pourrait représenter une méthode épidémiologique utile dans l'évaluation du risque tumoral à long terme pour les populations fortement exposées, certaines limites doivent demeurer à l'esprit :

- (i) les sources de HAP sont nombreuses dans l'environnement et les émanations issues des moteurs n'en représentent qu'une fraction par ailleurs difficile à évaluer ;
- (ii) la sensibilité et la spécificité d'un tel outil restent à évaluer.

6. TOXICOLOGIE EXPERIMENTALE : ETUDE DES EFFETS NON TUMORAUX

La toxicologie expérimentale regroupe toutes les études qui sont faites sur animaux ainsi que sur cellules, micro-organismes, et fractions cellulaires. Ces études ont pour but de montrer un effet, une pathologie et /ou d'en expliquer les mécanismes. Il existe deux grands types d'études : études *in vivo* et études *in vitro*.

La plupart des études de toxicité sont relatives aux effets inflammatoires pulmonaires. Ces études seront largement développées dans cette partie. Quelques études ont porté sur des effets toxiques sur d'autres organes que l'arbre respiratoire. Elles seront rapportées brièvement en fin de ce chapitre.

6.1 ETUDE DES EFFETS FONCTIONNELS DIRECTS

Les études sur l'animal des effets toxiques de l'inhalation d'émissions diesel sont très nombreuses. Il s'agit à la fois d'études *in vivo* et d'études *ex vivo* concernant les différents niveaux d'atteinte pulmonaire possibles.

La voie principale de pénétration dans l'organisme des particules diesel est l'inhalation. Ces particules provoquent à la fois une réaction de type irritative (nature particulaire) et une réaction inflammatoire (molécules adsorbées, métaux) qui se manifestent aux différents étages de l'arbre respiratoire.

6.1.1 Effets sur la fonction respiratoire

Kobayashi et *al.* (1997, 1998) ont étudié les effets d'expositions par inhalation à des émissions diesel (particules + éléments gazeux) et à des particules diesel seules. Ces tests ont été réalisés à court (3 jours) et long (28 jours) termes chez des cobayes. Les particules diesel n'induisent pas par elles-mêmes de signes respiratoires particuliers. Néanmoins, l'exposition à ces particules provoque aussi bien à court terme qu'à long terme, une augmentation de la réponse à l'histamine (perméabilité vasculaire et épithéliale) de la muqueuse nasale. Ceci se manifeste par de la congestion nasale, des éternuements et de la rhinorrhée. Le passage à la chronicité se caractérise par une hyperréactivité (figure caractéristique de réactions allergiques) de la muqueuse nasale à l'histamine de façon dose et temps dépendante. Il s'accompagne également d'une augmentation de la résistance des voies aériennes à l'inhalation. (26, 27).

Les particules diesel semblent donc jouer un rôle dans la promotion de l'hyperréactivité nasale et participer à l'aggravation de cette hyperréactivité. Les particules favoriseraient ainsi l'expression de rhinites allergiques. Ces résultats sont confirmés par Hiruma et *al.* (1999). De plus, ils ont montré un rôle important des particules diesel dans l'exacerbation du recrutement des polynucléaires éosinophiles au niveau de la muqueuse nasale. (21).

Des études de chronicité par inhalation de particules diesel chez des rats ont été réalisées. Les résultats biochimiques (dosages dans les lavages bronchoalvéolaires) et ultrastructuraux (histologie sur coupes de poumons) montrent :

- un accroissement de l'activité anti-élastase à une semaine,
- une élévation du taux de protéines totales à partir d'une semaine d'exposition, maximale à deux semaines,
- une augmentation de la quantité de macrophages alvéolaires à une semaine suivie d'un développement de tissu conjonctif interstitiel à trois semaines. (31).

L'inflammation primaire induite par les particules diesel peut passer à un stade d'inflammation chronique en cas d'expositions réitérées. Ceci se confirme par une étude comparative des effets des particules diesel avec ceux induits par la silice. Les particules de silice sont connues pour induire des réactions inflammatoires pulmonaires chroniques ayant des répercussions histologiques caractéristiques (fibrose). Cette étude comparative montre que les particules diesel peuvent provoquer ce type d'altérations de l'épithélium respiratoire mais avec une intensité moindre. (42).

A la surface des alvéoles pulmonaires, il existe un film très mince sécrété par les cellules alvéolaires, présentant des propriétés tensioactives : le surfactant. La tension superficielle de ce surfactant permet des variations de la distension des alvéoles et empêche l'atélectasie. Son rôle dans la mécanique ventilatoire est très important en modifiant l'élasticité et la rétraction pulmonaire. Toute altération de ce surfactant a des répercussions pathologiques. Les particules diesel exercent une action directe sur le surfactant en provoquant une accumulation de ses phospholipides et protéines constitutifs. Ainsi, ces particules altèrent les activités biologiques du surfactant et essentiellement son rôle de tensioactif. (41).

6.1.2 Effets sur les cellules des voies respiratoires

De nombreuses études *in vitro* portent sur l'ensemble des effets des émanations diesel sur les cellules des voies respiratoires.

L'exposition aux particules diesel de cellules épithéliales se caractérise par une diminution de la fréquence des battements ciliaires et donc une altération de la fonction protectrice de l'Escalator muco-ciliaire. (3, 13). L'atteinte de ce système d'épuration peut expliquer en partie l'augmentation de la sensibilité aux infections pulmonaires observée chez des individus exposés à la pollution diesel.

Murphy et *al.* (1999) ont mené une étude visant à caractériser les effets toxiques des particules diesel et de noir de carbone en fonction de leur taille et de leur forme. Ces effets ont été étudiés *in vitro* sur deux types cellulaires : des cellules épithéliales (pneumocytes) de type II et des cellules de CLARA. Les seuils de cytotoxicité obtenus sont fonction de la granulométrie des particules : les particules diesel qui sont les plus fines (1 μm) s'avèrent plus toxiques que les particules de noir de carbone (20 à 50 μm). Cependant, les particules de carbone testées se sont révélées être plus bioréactives car elles présentaient une complexité de surface supérieure à celle des particules diesel. (43).

Après inhalation, les constituants des émanations diesel sont en premier lieu en contact avec les cellules épithéliales des voies respiratoires. Au niveau de ces cellules, les particules diesel peuvent subir un passage transmembranaire passif qui entraîne une cascade de réactions cellulaires. Il est donc suivi d'une expression accrue de protéines membranaires spécifiques telles que le récepteur à l'histamine et des molécules d'adhésion cellulaire (ICAM-1). Il provoque également la synthèse et la sécrétion par ces cellules de médiateurs de l'inflammation tels que l'IL-6, l'IL-8 et le GM-CSF (facteur de croissance des macrophages), de manière dose et temps dépendante. Cette synthèse de médiateurs inflammatoires est démontrée aussi bien *in vitro* qu'*ex vivo*. (4, 6, 58, 59, 61, 62, 68, 69).

L'activation de la synthèse de ces médiateurs peut s'expliquer par un mécanisme de régulation supragénique (cf. 6.1.4). Les particules diesel auraient un rôle de promoteur des gènes de synthèse des médiateurs de l'inflammation. (48).

Les cellules épithéliales sont donc à la base de la réaction inflammatoire induite par les émissions diesel. De plus, le passage et l'activation de ces cellules entraînent une réaction des cellules endothéliales vasculaires. Ces cellules vasculaires sous l'effet des particules diesel expriment diverses molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1) et leur production d'IL-8 est augmentée. Ces transformations participent à une augmentation de la perméabilité vasculaire et à un afflux de cellules circulantes telles que les polynucléaires neutrophiles et éosinophiles, les monocytes. Les phénomènes d'adhésion des polynucléaires au niveau des cellules épithéliales entraînent alors un mécanisme d'amplification, augmentant l'afflux de cellules inflammatoires. (69, 57-59).

6.1.3 Effets sur les cellules inflammatoires

L'exposition aux émissions diesel est connue pour induire une inflammation des voies respiratoires. Elle se traduit par un recrutement accru des cellules inflammatoires. (29, 37).

Les cellules inflammatoires impliquées sont nombreuses : des macrophages, des polynucléaires neutrophiles (marqueurs d'une réponse inflammatoire), des mastocytes, des lymphocytes B et T. Chacune de ces cellules intervient dans la genèse des effets délétères. En fonction de la composition des émissions diesel (variations importantes possibles), la représentation cellulaire peut varier. Les différences les plus significatives concernent la teneur en particules. Lorsque celle-ci est élevée, les macrophages sont recrutés en plus grand nombre. En effet, leur activité phagocytaire permet l'épuration et l'élimination des particules. (53).

Ainsi, l'étude de lavages bronchoalvéolaires suite à des expositions aux particules diesel montre dans ces LBA une augmentation du nombre de macrophages présents et de leur activité oxydante. (19, 31, 35-38). Les macrophages stimulés participent à la réaction inflammatoire par une augmentation de leur production en IL-8, MIP 2 (protéine inflammatoire macrophagique 2) et TNF α . Ces derniers interviennent dans l'activité oxydante des macrophages, responsables d'effets cytotoxiques. (19, 20).

Les autres cellules inflammatoires présentent également des synthèses augmentées de diverses cytokines (fonction du type cellulaire) et participent donc à une amplification de l'inflammation locale. (57, 58).

6.1.4 Effets sur les protéines cellulaires : activités enzymatiques, « messagers » cellulaires

6.1.4.1 Effets sur les « messagers » cellulaires

L'afflux des cellules inflammatoires et l'augmentation de la synthèse de leurs médiateurs et des récepteurs à l'histamine semblent mettre en jeu des facteurs de transcription intracellulaires (« messagers »). Ces facteurs : NF- κ B, AP-1, NF-IL6 sont des activateurs de la transcription de gènes dont ceux des cytokines et du récepteur à l'histamine. Ils sont donc à la base des augmentations des synthèses protéiques observées. (2, 29).

L'activation du facteur NF- κ B par les particules diesel est un élément clé de la réponse inflammatoire car elle conditionne l'augmentation de production des médiateurs inflammatoires. Le mécanisme d'activation du NF- κ B est encore à déterminer. (67).

BaezaSquiban et *al.* (1999) en travaillant sur l'activation du NF- κ B ont montré que les particules diesel *in vitro* peuvent induire l'expression du proto-oncogène Fos-c. Or, ce proto-oncogène est un des éléments essentiels de la régulation du cycle cellulaire. Il intervient dans l'initiation de figures de mitose. Ceci suggère que les particules diesel pourraient initier la prolifération cellulaire et provoquer un mécanisme de cancérisation. (2).

6.1.4.2 Effets sur les activités enzymatiques

Morin et *al.* (1999) ont mené une étude sur des « slices » (fragments de tissu pulmonaire maintenus en survie) qui sont exposés différenciellement aux gaz et aux particules des émissions diesel. Les concentrations obtenues pour les éléments gazeux dans les chambres d'exposition correspondent aux teneurs émises par un moteur d'un véhicule léger. Suite à des expositions d'une heure, les activités cellulaires sont dosées. Il est observé une diminution de l'activité Glutathion peroxydase et une inhibition de l'activité Superoxyde Dismutase qui correspondent à l'expression d'un stress oxydatif pour les cellules. Les variations de ces activités enzymatiques sont plus intenses lors d'une exposition aux gaz seuls. L'intérêt de ce système complexe est de permettre une étude proche du vivant, sans toutefois tenir compte de la filtration nasale et bronchique qui épurent une partie de l'air inhalé. (40).

D'autres études se sont intéressées aux activités enzymatiques pulmonaires afin de mettre en évidence un stress oxydatif cellulaire. Ainsi, des instillations intratrachéales répétées à des souris de particules diesel provoquent un doublement de la quantité de NO (oxyde nitrique) exhalée. Ceci se traduit par une augmentation de l'activité NO-synthétase constitutive (enzyme des cellules épithéliales) et de l'activité NO-synthétase inductible (enzyme macrophagique).

De plus, l'inhibition de l'activité NO-synthétase réduit de manière significative l'hyperréactivité bronchique induite par les particules diesel. Ces résultats semblent indiquer que la production de NO est augmentée (par induction enzymatique) lors d'exposition aux particules diesel. Or, le NO est connu pour être un composé inflammatoire, vasodilatateur et myorelaxant (fibres musculaires lisses). Il contribue ainsi à accroître l'inflammation primaire des voies respiratoires, liée au pouvoir purement irritant des particules. (33).

6.2 ETUDE DES EFFETS POTENTIALISATEURS D'AFFECTIONS RESPIRATOIRES

Les émissions des moteurs diesel sont suspectés d'avoir un effet potentialisateur dans les réactions allergiques respiratoires. Chez des sujets sensibilisés à un aéroallergène, l'exposition simultanée aux particules diesel et à l'allergène accroît de façon significative la réponse en immunoglobulines de type E de ces individus. (17).

En plus de l'effet potentialisateur, un rôle adjuvant des particules diesel dans les manifestations allergiques a été montré chez l'homme sur des sujets sains et sensibilisés. (14).

De nombreux travaux expérimentaux se penchent actuellement sur ces effets et leurs mécanismes. Ces études sont étroitement liées à celles sur les mécanismes inflammatoires.

6.2.1 Pathogénie des effets immunotoxiques

Des réactions d'hypersensibilité pulmonaire ont également été mis en évidence chez des souris et des cobayes. L'exposition à des particules diesel de souris saines n'entraîne pas de modifications de la synthèse des immunoglobulines (Ig) G1 et E (seulement une augmentation de l'IL-5). Cette même exposition mais chez des souris sensibilisées se caractérise par une augmentation de la production des Ig E et G1 et ceci en liaison avec un recrutement amplifié des polynucléaires éosinophiliques. (23, 35, 36).

Toutefois, des différences d'intensité dans la production d'Ig G1 et de cytokines spécifiques s'observent en fonction des races de souris lorsqu'elles sont placées dans les mêmes conditions de sensibilisation et d'exposition aux particules. (38). Des différences interindividuelles sont donc à prendre en compte au sein d'une même espèce.

Ces effets peuvent s'expliquer par un transport non spécifique des aéro-allergènes par les particules (élément porteur) et une meilleure pénétration de l'arbre respiratoire par ces allergènes jusqu'aux sites de développement des réactions immunitaires. Le meilleur exemple est celui des allergènes polliniques adsorbés à la surface des particules. (25, 50).

Les particules diesel induisent un afflux de cellules inflammatoires dont les macrophages. La phagocytose des particules par les macrophages permet l'internalisation des allergènes adsorbés à leur surface. Or, les macrophages sont également des cellules présentatrices d'antigènes. Ils transforment donc les allergènes en multiples antigènes, présentés à leur surface ; ce qui permet la mise en place de réactions immunitaires. Le développement d'une réaction immunitaire peut ensuite être mis en évidence par le dosage d'immunoglobulines spécifiques.

De récentes études suggèrent également que chez la souris, l'exposition aux émanations diesel pourrait provoquer la mise en place de réactions de tolérance immunitaire dont les mécanismes sont à éclaircir. (80, 81, 82).

6.2.2 Etude mécanistique de ces effets potentialisateurs

Takano *et al.* (1997, 1998) ont mené des études intéressantes dans la recherche de relations entre les particules diesel et les réactions allergiques dont l'asthme. Des études d'exposition par instillation intratrachéale et par inhalation ont été effectuées sur des souris sensibilisées ou non.

Les lavages broncho-alvéolaires réalisés sur ces animaux montrent que les particules diesel provoquent un afflux significatif des polynucléaires neutrophiles (inflammation) et éosinophiles (marqueur de réponse allergique). Cette augmentation de la cellularité est associée à un accroissement de cytokines telles que l'IL-4 et l'IL-5. Ces dernières ont un rôle essentiel dans la pathogénie des réactions éosinophiliques dépendantes d'un antigène. Ces cytokines influencent la balance immunitaire entre les lymphocytes Th1 et Th 2. Or, selon le type de lymphocytes prépondérants, la réponse de l'organisme est variable. L'IL-4 et l'IL-5 sont des cytokines Th 2 dépendantes ce qui se traduit par une activation de la production d'immunoglobulines de type E et G. Ces deux immunoglobulines sont les marqueurs sanguins d'une réponse allergique car elles interviennent dans le recrutement des polynucléaires éosinophiliques. (65, 66).

De nombreux travaux sont en cours sur les mécanismes d'action des particules diesel dans les réactions allergiques. Le système immunitaire met en jeu un panel de réactions complexes plus ou moins inter-dépendantes, ce qui accroît la complexité de compréhension de ces mécanismes.

Le rôle des particules diesel dans l'exacerbation des réactions allergiques démontré épidémiologiquement semble actuellement être également une certitude expérimentale.

6.3 AUTRES EFFETS PATHOLOGIQUES

Quelques études se penchent sur des effets autres que respiratoires des particules diesel. Les organes concernés sont l'appareil reproducteur, le système cardio-vasculaire et la peau.

Watanabe *et al.* (1999) ont étudié les effets sur la spermatogenèse de l'exposition de jeunes rats en croissance aux particules diesel. Les animaux ont été traités pendant leurs 3 premiers mois de vie et la fonction reproductrice a été étudiée. Ils ont observé une diminution significative des neuro-hormones hypophysaires (FSH, LH) et une augmentation des hormones sexuelles (testostérone, oestradiol). Au niveau testiculaire, ils ont mis en évidence une diminution de la production de sperme ainsi qu'une immaturité des spermatozoïdes. L'exposition aux émissions diesel s'est donc traduite par une altération de la fonction de reproduction au cours du développement pouvant entraîner une stérilité. L'augmentation des hormones sexuelles correspond en fait à un relais de sécrétion assuré par les glandes surrénales visant à maintenir la croissance testiculaire sans acquisition de maturité sexuelle. Les émissions diesel induiraient un feed-back négatif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire selon un mécanisme encore inconnu. (79).

D'autres effets sur la reproduction sont suspectés. Une étude épidémiologique menée en Pologne sur des femmes enceintes exposées à une forte pollution (particules diesel, HAP, fumées de cigarette) montre que le placenta est capable de concentrer des toxiques tels que les HAP. Ce passage transplacentaire important se répercute sur le fœtus. Les enfants nés de ces mères présentent tous une diminution significative du poids à la naissance et de la circonférence du crâne. Or, une diminution de la boîte crânienne est souvent associée à une diminution des performances scolaires et des fonctions cognitives. Les résultats de cette étude sont discutables car de nombreux autres paramètres tel que la sous-nutrition n'ont pas été envisagés. De plus, une discrimination entre les polluants mesurés et les effets n'a pas été effectuée. (51).

D'autres travaux ont porté sur l'étude de la peau. Ushio et *al.* (1999) ont testé l'action de particules diesel sur des kératinocytes en culture. De fortes concentrations en particules diesel sont responsables d'altérations de la croissance de ces cellules et de leur migration. Les particules auraient donc une action directe sur l'intégrité cutanée. De plus, cette exposition provoque une augmentation de la sécrétion en IL-8. Or, cette cytokine est incriminée dans les réactions cutanées inflammatoires. Cette étude semble suggérer que les particules diesel pourraient jouer un rôle dans l'initiation et/ou la pathogenèse de troubles cutanés inflammatoires tels que l'eczéma, la dermatite allergique ou le psoriasis. (71).

Les particules diesel sont également suspectées pour avoir un rôle dans la potentialisation d'affections cardio-vasculaires chez des sujets prédisposés.

Cheng (9) a exposé des cellules cardiaques (fragments aortiques en culture) à des particules émises par des moteurs de motocyclettes. Ses résultats montrent que ces particules interfèreraient avec la vasoconstriction aortique à médiation chimique et sur la vasodilatation induite par l'acétylcholine ! Bien que les conditions expérimentales soient valables, l'intérêt d'une telle étude se discute. En effet, les cellules cardiaques ne peuvent pas être exposées de manière directe à des particules diesel et les effets potentiels du NO n'ont pas été évalués.

7. TOXICOLOGIE EXPERIMENTALE : ETUDE DES EFFETS TUMORAUX

7.1 ETUDE DE MUTAGENESE *IN VITRO*

7.1.1 Etudes de mutations génétiques

Des tests de recombinaisons géniques réalisés sur bactéries (*Salmonella typhimurium*) ou test d'Ames, ont permis d'établir un effet mutagène statistiquement significatif des émissions diesel et plus particulièrement de leurs particules. Les constituants des émissions diesel incriminés sont principalement les HAP. Ce groupe rassemble un grand nombre de molécules dont les sources sont diverses et variées. Le caractère mutagène d'un produit indique simplement sa capacité à altérer le génome (molécule d'ADN). Si de telles altérations sont indispensables à la promotion de la tumorigénération cellulaire, elles ne débouchent pas forcément sur le développement de cancers.

Une étude de mutagenèse comparée a été menée pour évaluer les effets du diesel fossile et du biodiesel (RME). Les résultats obtenus sur tests d'Ames révèlent que le diesel fossile est plus mutagène que le biodiesel. Ceci semble lié à une teneur en HAP du diesel fossile plus forte que pour le biodiesel. Toutefois ces résultats sont discutables en regard de conditions expérimentales différentes et de résultats positifs partiels concernant uniquement certaines souches bactériennes. (8).

Des tests de Ames ont été réalisés sur quatre HAP extraits de particules diesel. Ces hydrocarbures ont été testés individuellement, en association entre eux et avec des particules, sur quatre souches bactériennes, avec et sans adjonction de fraction S9 (activation métabolique). Les résultats de cette étude montrent des résultats positifs lors d'exposition bactérienne en présence de la fraction S9. Une activation métabolique serait donc nécessaire pour que les HAP exercent leur pouvoir mutagène. De plus, ce pouvoir serait d'autant plus élevé lorsque ces HAP sont associés entre eux, les particules leur servant de véhicule favorable. (7).

Fu et *al.* (1999) ont mené une étude comparative du pouvoir mutagène des HAP et nitro-HAP. Les nitro-HAP sont des molécules ubiquitaires issues de la combustion de fuel, de kérozène, de gazole, des aliments, ... Les effets de la nitro-substitution ont été testés sur tests d'Ames et sur microflore humaine. Les résultats obtenus sont insuffisants pour évaluer correctement le risque lié aux nitro-HAP. Les seules certitudes résident dans la capacité des nitro-HAP à former des adduits avec l'ADN, responsables de leur activité mutagène et tumorigène. (16).

Tsudurome et *al.* se sont intéressés aux mécanismes de réparation des mutations géniques induites par les particules diesel. Ils ont utilisé la 8-hydroxyguanine (8-OHG) comme marqueur de lésions majeures de l'ADN. L'exposition de souris à des particules diesel se traduit par une augmentation de la 8-OHG de manière dose dépendante. Les activités enzymatiques réparatrices des lésions géniques ont ensuite été étudiées. Ces activités ne sont normales voire induites qu'environ 7 jours après l'exposition. Les particules diesel inhiberaient les activités réparatrices de l'ADN (d'où l'augmentation de la 8-OHG) mais par un mécanisme encore inconnu. (70).

7.1.2 Etudes de transformation cellulaire

Les études de transformation cellulaire semblent apporter des résultats beaucoup plus pertinents que celles de mutagenèse.

Ces essais de transformation cellulaire évaluent la capacité d'un toxique à transformer des cellules mammifères en cellules indifférenciées à potentiel néoplasique. Ce processus implique l'activation de proto-oncogènes et/ou l'inactivation des gènes suppresseurs tumoraux.

Une étude *in vivo* et *in vitro* sur cellules épithéliales de rat a montré que seule l'exposition *in vivo* aux particules diesel permet d'obtenir des résultats positifs. Ces résultats sont confirmés *in vitro* mais une activation métabolique est nécessaire (adjonction de fraction S9). Après extraction de la surface particulaire, le 1-nitropyrene (HAP prépondérant) serait le responsable de la positivité constatée. Toutefois, les lignées cellulaires transformées ainsi créées n'acquiescent pas de caractère « immortel », c'est-à-dire la capacité à se reproduire à l'infini, nécessaire au développement tumoral.

Les particules diesel seraient donc responsables *in vivo* de transformations cellulaires non héréditaires (non permanentes) nécessitant une bioactivation enzymatique. L'absence d'immortalisation de ces cellules remet toutefois en cause le pouvoir tumoral des particules diesel. Elles auraient donc un rôle de promoteur plutôt que d'initiateur (absence d'altérations irréversibles). (15).

7.2 ETUDE DE CANCEROGENESE *IN VIVO*

Des études de cancérogenèse expérimentales ont été menées sur des rats. Valberg et *al.* ont ainsi montré qu'il n'existe pas d'association statistique entre l'exposition à de faibles concentrations (0-3 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) en particules diesel et le développement de tumeurs. Le seuil théorique calculé se situe à 600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. Si l'on se rapporte aux valeurs environnementales et aux doses journalières admissibles, il faudrait une exposition d'une durée supérieure à celle d'une vie humaine (en moyenne) pour observer un effet cancérogène. (72).

Une autre étude de cancérogenèse conclut que les particules diesel sont responsables de lésions du génome des cellules épithéliales alvéolaires et de leur prolifération mais que ce serait le NO_2 et le SO_2 présents dans la phase gazeuse des émissions diesel qui induiraient le développement tumoral. Les résultats et les hypothèses avancés dans cette étude sont néanmoins discutables. (49).

8. CONCLUSION

Cette synthèse bibliographique récente montre que de nombreuses études toxicologiques sont en cours sur les particules diesel mais qu'une nouvelle orientation est prise depuis le milieu des années 1990 avec de nouvelles conclusions sur les effets inflammatoires des particules et notamment leur impact sur l'asthme.

La complexité des émissions des moteurs diesel entraîne une diversité d'effets biologiques, essentiellement au niveau de l'arbre respiratoire. Leur rôle potentialisateur de réactions allergiques respiratoires (rhinites, asthme) suspecté chez l'homme est maintenant de mieux en mieux appréhendé expérimentalement. Des travaux sont encore nécessaires pour la compréhension des mécanismes intervenant dans les réactions inflammatoires mais surtout allergiques induites par ce type de pollution.

Outre ces nouvelles orientations prises par les travaux sur les émissions diesel, leurs effets cancérigènes font toujours l'objet de quelques études épidémiologiques dont les résultats confirment un risque accru de cancers pulmonaires pour des populations professionnellement exposées aux émissions des moteurs à combustion. Ces effets semblent se confirmer également expérimentalement mais certains résultats sont parfois contradictoires.

Il apparaît toutefois, que des effets sur d'autres organes que l'appareil respiratoire puissent être imputables aux émanations diesel. Quelques rares études semblent montrer des effets sur la fonction de reproduction ainsi que sur le système cardio-vasculaire. Ces premiers résultats ouvrent de nouvelles pistes de recherche dans le domaine des émissions diesel qui ne sont pas négligeables.

Enfin, un intérêt tout particulier doit être porté sur la recherche de biomarqueurs d'exposition aux émanations des moteurs. Quelques résultats sont actuellement disponibles pour les HAP et les nitro-HAP (marqueurs sanguins et urinaires) mais il serait utile de les approfondir.

9. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Autrup, H., B. Daneshvar, et al. (1999).** “Biomarkers for exposure to ambient air pollution--comparison of carcinogen-DNA adduct levels with other exposure markers and markers for oxidative stress.” Environ Health Perspect **107**(3): 233-8.
2. **BaezaSquiban, A., V. Bonvallot, et al. (1999).** “Diesel exhaust particles increase NF-kappa B DNA binding activity and C-FOS proto-oncogene expression in human bronchial epithelial cells.” Toxicology in Vitro **13**(4-5): 817-822.
3. **Bayram, H., J. L. Devalia, et al. (1998).** “Comparison of ciliary activity and inflammatory mediator release from bronchial epithelial cells of nonatopic nonasthmatic subjects and atopic asthmatic patients and the effect of diesel exhaust particles in vitro.” J Allergy Clin Immunol **102**(5): 771-82.
4. **Bayram, H., J. L. Devalia, et al. (1998).** “The effect of diesel exhaust particles on cell function and release of inflammatory mediators from human bronchial epithelial cells in vitro.” Am J Respir Cell Mol Biol **18**(3): 441-8.
5. **Bhatia, R., P. Lopipero, et al. (1998).** “Diesel exhaust exposure and lung cancer [see comments].” Epidemiology **9**(1): 84-91.
6. **Boland, S., A. BaezaSquiban, et al. (1999).** “Diesel exhaust particles are taken up by human airway epithelial cells in vitro and alter cytokine production.” American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology **20**(4): L604-L613.
7. **Bostrom, E., S. Engen, et al. (1998).** “Mutagenicity testing of organic extracts of diesel exhaust particles after spiking with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH).” Arch Toxicol **72**(10): 645-9.
8. **Bunger, J., J. Krahl, et al. (1998).** “Mutagenic and cytotoxic effects of exhaust particulate matter of biodiesel compared to fossil diesel fuel.” Mutat Res **415**(1-2): 13-23.
9. **Cheng, Y. W. and J. J. Kang (1999).** “Inhibition of agonist-induced vasoconstriction and impairment of endothelium-dependent vasorelaxation by extract of motorcycle exhaust particles in vitro.” J Toxicol Environ Health **57**(2): 75-87.

10. **Chew, F. T., D. Y. Goh, et al. (1999).** “Association of ambient air-pollution levels with acute asthma exacerbation among children in Singapore .” Allergy **54**(4): 320-9.
11. **Damia, A. D., M. L. Fabregas, et al. (1999).** “Effects of air pollution and weather conditions on asthma exacerbation.” Respiration **66**(1): 52-58.
12. **Davies, R. J., C. Rusznak, et al. (1998).** “Why is allergy increasing?--environmental factors.” Clin Exp Allergy **28 Suppl 6**: 8-14.
13. **Devalia, J. L., H. Bayram, et al. (1999).** “Differences between cytokine release from bronchial epithelial cells of asthmatic patients and non-asthmatic subjects: Effect of exposure to diesel exhaust particles.” International Archives of Allergy and Immunology **118**(2-4): 437-439.
14. **Diaz-Sanchez, D., A. Tsien, et al. (1999).** “Effect of topical fluticasone propionate on the mucosal allergic response induced by ragweed allergen and diesel exhaust particle challenge.” Clin Immunol **90**(3): 313-22.
15. **Ensell, M. X., W. Z. Whong, et al. (1998).** “In vitro and in vivo transformation in rat tracheal epithelial cells exposed to diesel emission particles and related compounds.” Mutat Res **412**(3): 283-91.
16. **Fu, P. P. (1999).** “Nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons: a class of genotoxic environmental pollutants.” Environ Carcinog Ecotox Eev **17**(1): 1-43.
17. **Fujieda, S., D. Diaz-Sanchez, et al. (1998).** “Combined nasal challenge with diesel exhaust particles and allergen induces In vivo IgE isotype switching.” Am J Respir Cell Mol Biol **19**(3): 507-12.
18. **Georgiadis, P. and S. A. Kyrtopoulos (1999).** “Molecular epidemiological approaches to the study of the genotoxic effects of urban air pollution.” Mutation Research Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis **428**(1-2): 91-98.
19. **Goldsmith, C. A., A. Imrich, et al. (1998).** “Analysis of air pollution particulate-mediated oxidant stress in alveolar macrophages.” J Toxicol Environ Health **54**(7): 529-45.
20. **Halinen, A. J., H. Komulainen, et al. (1999).** “Diesel particles induce nitric oxide production in murine alveolar macrophages and rat airways.” Environmental Toxicology and Pharmacology **7**(1): 11-18.

21. **Hiruma, K., N. Terada, et al. (1999).** “Effect of diesel exhaust on guinea pig nasal mucosa.” Ann Otol Rhinol Laryngol **108**(6): 582-8 .
22. **Hou, M., Y. Morishita, et al. (1998).** “The implication of anthracosis in the development of pulmonary adenocarcinoma.” Japanese Journal of Cancer Research **89**(12): 1251-1256.
23. **Ichinose, T., H. Takano, et al. (1998).** “Long-term exposure to diesel exhaust enhances antigen-induced eosinophilic inflammation and epithelial damage in the murine airway.” Toxicol Sci **44**(1): 70-9.
24. **Kimber, I. (1998).** “Allergy, asthma and the environment: an introduction.” Toxicology Letters **103**: 301-306.
25. **Knox, R. B., C. Suphioglu, et al. (1997).** “Major grass pollen allergen Lol p 1 binds to diesel exhaust particles: implications for asthma and air pollution.” Clin Exp Allergy **27**(3): 246-51.
26. **Kobayashi, T., T. Ikeue, et al. (1998).** “Four-week exposure to diesel exhaust induces nasal mucosal hyperresponsiveness to histamine in guinea pigs.” Toxicol Sci **45**(1): 106-12.
27. **Kobayashi, T., T. Ikeue, et al. (1997).** “Short-term exposure to diesel exhaust induces nasal mucosal hyperresponsiveness to histamine in guinea pigs.” Fundam Appl Toxicol **38**(2): 166-72.
28. **Koren, H. and M. O'Neill (1998).** “Experimental assessment of the influence of atmospheric pollutants on respiratory disease.” Toxicology Letters **103**: 317-321.
29. **Krishna, M. T., A. J. Chauhan, et al. (1998).** “Toxicological mechanisms underlying oxidant pollutant-induced airway injury.” Rev Environ Health **13**(1-2): 59-71.
30. **Lafon, D. (1993).** " Toxicité des émissions des moteurs diesel et des moteurs essence. Rapport INERIS.
31. **Lall, S. B., N. Das, et al. (1998).** “Biochemical and histopathological changes in respiratory system of rats following exposure to diesel exhaust.” Indian J Exp Biol **36**(1): 55-9.

32. **Lay, J. C., W. D. Bennett, et al. (1999).** “Cellular and biochemical response of the human lung after intrapulmonary instillation of ferric oxide particles.” Am J Respir Cell Mol Biol **20**(4): 631-42.
33. **Lim, H. B., T. Ichinose, et al. (1998).** “Involvement of superoxide and nitric oxide on airway inflammation and hyperresponsiveness induced by diesel exhaust particles in mice.” Free Radic Biol Med **25**(6): 635-44.
34. **Lipsett, M. and S. Campleman (1999).** “Occupational exposure to diesel exhaust and lung cancer: a meta- analysis.” Am J Public Health **89**(7): 1009-17.
35. **Miyabara, Y., T. Ichinose, et al. (1998).** “Effects of diesel exhaust on allergic airway inflammation in mice.” J Allergy Clin Immunol **102**(5): 805-12.
36. **Miyabara, Y., T. Ichinose, et al. (1998).** “Diesel exhaust inhalation enhances airway hyperresponsiveness in mice.” Int Arch Allergy Immunol **116**(2): 124-31.
37. **Miyabara, Y., H. Takano, et al. (1998).** “Diesel exhaust enhances allergic airway inflammation and hyperresponsiveness in mice.” Am J Respir Crit Care Med **157**(4 Pt 1): 1138-44.
38. **Miyabara, Y., R. Yanagisawa, et al. (1998).** “Murine strain differences in airway inflammation caused by diesel exhaust particles.” Eur Respir J **11**(2): 291-8.
39. **Morgan, W. K., R. B. Reger, et al. (1997).** “Health effects of diesel emissions .” Ann Occup Hyg **41**(6): 643-58.
40. **Morin, J. P., F. Fouquet, et al. (1999).** “Development of a new in vitro system for continuous in vitro exposure of lung tissue to complex atmospheres: Application to diesel exhaust toxicology.” Cell Biology and Toxicology **15**(3): 143-152.
41. **Muller, B., C. Seifart, et al. (1998).** “Effect of air pollutants on the pulmonary surfactant system.” Eur J Clin Invest **28**(9): 762-77.
42. **Murphy, S. A., K. A. Berube, et al. (1998).** “The response of lung epithelium to well characterised fine particles.” Life Sci **62**(19): 1789-99.
43. **Murphy, S. A. M., K. A. Berube, et al. (1999).** “Bioreactivity of carbon black and diesel exhaust particles to primary Clara and type II epithelial cell cultures.” Occup. Environ. Med **56**: 813-819.

44. **Muzyka, V., S. Veimer, et al. (1998).** “On the carcinogenic risk evaluation of diesel exhaust: benzene in airborne particles and alterations of heme metabolism in lymphocytes as markers of exposure.” Sci Total Environ **217**(1-2): 103-11.
45. **Nel, A. E., D. Diaz-Sanchez, et al. (1998).** “Enhancement of allergic inflammation by the interaction between diesel exhaust particles and the immune system.” J Allergy Clin Immunol **102**(4 Pt 1): 539-54.
46. **Nessel, C. S. (1999).** “A comprehensive evaluation of the carcinogenic potential of middle distillate fuels.” Drug Chem Toxicol **22**(1): 165-80.
47. **Nilsen, A., T. Tronnes, et al. (1999).** “Short-term exposure of rodents to diesel exhausts: usefulness for studies of genotoxic and immunotoxic effects.” Chemico Biological Interactions **118**(1): 19-38.
48. **Ohtoshi, T., H. Takizawa, et al. (1998).** “Diesel exhaust particles stimulate human airway epithelial cells to produce cytokines relevant to airway inflammation in vitro.” J Allergy Clin Immunol **101**(6 Pt 1): 778-85.
49. **Ohyama, K., T. Ito, et al. (1999).** “The roles of diesel exhaust particle extracts and the promotive effects of NO₂ and/or SO₂ exposure on rat lung tumorigenesis.” Cancer Lett **139**(2): 189-97.
50. **Ormstad, H., B. V. Johansen, et al. (1998).** “Airborne house dust particles and diesel exhaust particles as allergen carriers.” Clin Exp Allergy **28**(6): 702-8.
51. **Perera, F. P., W. Jedrychowski, et al. (1999).** “Molecular Epidemiologic Research on the Effects of Environmental Pollutants on the Fetus.” Environ Health Perspect **107** Suppl 3: 451-460.
52. **Peterson, B. and A. Saxon (1996).** “Global increases in allergic respiratory disease: the possible role of diesel exhaust particles.” Ann Allergy Asthma Immunol **77**(4): 263-8; quiz 269-70.
53. **Rudell, B., A. Blomberg, et al. (1999).** “Bronchoalveolar inflammation after exposure to diesel exhaust: comparison between unfiltered and particle trapfiltered exhaust.” Occup. Environ. Med **56**: 527-534.

54. **Saez, M., A. Tobias, et al. (1999).** “A GEE moving average analysis of the relationship between air pollution and mortality for asthma in Barcelona, Spain.” Statistics in Medicine **18**(16): 2077-2086.
55. **Sagai, M., A. Furuyama, et al. (1996).** “Biological effects of diesel exhaust particles (DEP). III. Pathogenesis of asthma like symptoms in mice.” Free Radic Biol Med **21**(2): 199-209.
56. **Sagai, M., H. B. Lim, et al. (1998).** “Biological effects of diesel exhaust particles (DEP). III. Pathogenesis of asthma like symptoms in mice.” Pathophysiology of Lipid Peroxydes and Related Free Radicals: 43-55.
57. **Salvi, S., A. Blomberg, et al. (1999).** “Acute inflammatory responses in the airways and peripheral blood after short-term exposure to diesel exhaust in healthy human volunteers.” American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine **159**(3): 702-709.
58. **Salvi, S. and S. T. Holgate (1999).** “Mechanisms of particulate matter toxicity.” Clinical and Experimental Allergy **29**(9): 1187-1194.
59. **Salvi, S. S., A. Frew, et al. (1999).** “Is diesel exhaust a cause for increasing allergies?” Clinical and Experimental Allergy **29**(1): 4-8.
60. **Steenland, K., J. Deddens, et al. (1998).** “Diesel exhaust and lung cancer in the trucking industry: exposure- response analyses and risk assessment.” Am J Ind Med **34**(3): 220-8.
61. **Steerenberg, P. A., J. A. Zonnenberg, et al. (1998).** “Diesel exhaust particles induced release of interleukin 6 and 8 by (primed) human bronchial epithelial cells (BEAS 2B) in vitro.” Exp Lung Res **24**(1): 85-100.
62. **Stringer, B. and L. Kobzik (1998).** “Environmental particulate-mediated cytokine production in lung epithelial cells (A549): role of preexisting inflammation and oxidant stress.” J Toxicol Environ Health **55**(1): 31-44.
63. **Suphioglu, C. (1998).** “Thunderstorm asthma due to grass pollen.” Int Arch Allergy Immunol **116**(4): 253-60.
64. **Suzuki, T., T. Kanoh, et al. (1996).** “Adjuvant activity of diesel exhaust particulates (DEP) in production of anti-IgE and anti-IgG1 antibodies to mite allergen in mice.” J Clin Lab Immunol **48**(5): 187-99.

65. **Takano, H., T. Ichinose, et al. (1998).** “Inhalation of diesel exhaust enhances allergen-related eosinophil recruitment and airway hyperresponsiveness in mice.” Toxicol Appl Pharmacol **150**(2): 328-37.

66. **Takano, H., T. Yoshikawa, et al. (1997).** “Diesel exhaust particles enhance antigen-induced airway inflammation and local cytokine expression in mice.” Am J Respir Crit Care Med **156**(1): 36-42.

67. **Takizawa, H., T. Ohtoshi, et al. (1999).** “Diesel exhaust particles induce NF-kappa B activation in human bronchial epithelial cells in vitro: importance in cytokine transcription.” J Immunol **162**(8): 4705-11.

68. **Terada, N., N. Hamano, et al. (1999).** “Diesel exhaust particulates upregulate histamine receptor mRNA and increase histamine-induced IL-8 and GM-CSF production in nasal epithelial cells and endothelial cells.” Clin Exp Allergy **29**(1): 52-9.

69. **Terada, N., K. Maesako, et al. (1997).** “Diesel exhaust particulates enhance eosinophil adhesion to nasal epithelial cells and cause degranulation.” Int Arch Allergy Immunol **114**(2): 167-74.

70. **Tsurudome, Y., T. Hirano, et al. (1999).** “Changes in levels of 8-hydroxyguanine in DNA, its repair and OGG1 mRNA in rat lungs after intratracheal administration of diesel exhaust particles.” Carcinogenesis **20**(8): 1573-1576.

71. **Ushio, H., K. Nohara, et al. (1999).** “Effect of environmental pollutants on the production of pro-inflammatory cytokines by normal human dermal keratinocytes.” Toxicol Lett **105**(1): 17-24.

72. **Valberg, P. A. and E. A. C. Crouch (1999).** “Meta-analysis of rat lung tumors from lifetime inhalation of diesel exhaust.” Environmental Health Perspectives **107**(9): 693-699.

73. **Valberg, P. A. and A. Y. Watson (1999).** “Comparative mutagenic dose of ambient diesel engine exhaust.” Inhalation Toxicology **11**(3): 215-228.

74. **Van Bekkum, Y. M., P. H. van den Broek, et al. (1998).** “Sensitive and selective detection of urinary 1-nitropyrene metabolites following administration of a single intragastric dose of diesel exhaust particles (SRM 2975) to rats.” Chem Res Toxicol **11**(11): 1382-90.

75. **Verma, D. K., L. Shaw, et al. (1999).** “A comparison of sampling and analytical methods for assessing occupational exposure to diesel exhaust in a railroad work environment.” Appl Occup Environ Hyg **14**(10): 701-14.
76. **Wade, J. F. d. and L. S. Newman (1993).** “Diesel asthma. Reactive airways disease following overexposure to locomotive exhaust.” J Occup Med **35**(2): 149-54.
77. **Wang, M., A. Saxon, et al. (1999).** “Early IL-4 production driving Th2 differentiation in a human in vivo allergic model is mast cell derived.” Clin Immunol **90**(1): 47-54.
78. **Wasserkort, R., A. Hartmann, et al. (1998).** “Correlation between On-Line PAH Detection in Airborne Particle Samples and Their Bacterial Genotoxicity.” Ecotoxicol Environ Saf **40**(1/2): 126-36.
79. **Watanabe, N. and Y. Oonuki (1999).** “Inhalation of diesel engine exhaust affects spermatogenesis in growing male rats.” Environmental Health Perspectives **107**(7): 539-544.
80. **Yoshino, S., M. Ohsawa, et al. (1998).** “Diesel exhaust particles block induction of oral tolerance in mice.” J Pharmacol Exp Ther **287**(2): 679-83.
81. **Yoshino, S. and M. Sagai (1999).** “Enhancement of collagen-induced arthritis in mice by diesel exhaust particles.” Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **290**(2): 524-529.
82. **Yoshino, S. and M. Sagai (1999).** “Induction of systemic Th1 and Th2 immune responses by oral administration of soluble antigen and diesel exhaust particles.” Cellular Immunology **192**(1): 72-78.
83. **Zwirner-Baier, I. and H. G. Neumann (1999).** “Polycyclic nitroarenes (nitro-PAHs) as biomarkers of exposure to diesel exhaust.” Mutat Res **441**(1): 135-44 .