

Toxicité respiratoire des particules Diesel : les mécanismes cellulaires et moléculaires

**Sonja Boland
Armelle Baeza-Squiban
Francelyne Marano**

La qualité de l'air est devenue un enjeu majeur dans la politique environnementale des pays industrialisés. En effet, un faisceau de présomptions, à partir des études épidémiologiques réalisées au cours des vingt dernières années, permet d'établir une relation probable entre certains polluants tels que les particules atmosphériques et la mortalité ou morbidité d'origine respiratoire et cardiovasculaire. Cependant, il n'est pas toujours facile d'établir une relation causale claire entre un polluant donné et un effet sanitaire. Les particules Diesel ont été rapidement incriminées dans l'aggravation des maladies respiratoires telles que l'asthme, dans la mesure où leur petite taille leur permet d'accéder au poumon profond. Des études expérimentales récentes ont mis en lumière les mécanismes moléculaires à l'origine de la réponse inflammatoire induite par ces particules. Ceux-ci pourraient passer par la production d'espèces activées de l'oxygène qui jouent un rôle central, actuellement reconnu, dans de nombreuses maladies. Une meilleure compréhension de la participation des différents constituants des particules dans cette réponse inflammatoire devrait permettre de définir des stratégies efficaces de dépollution. Ces recherches sur la réponse cellulaire et moléculaire à des matériaux complexes tels que les particules Diesel illustrent bien les nouvelles orientations de la toxicologie moderne qui vise de plus en plus à donner une base mécanistique aux événements toxiques.

ADRESSE

S. Boland, A. Baeza-Squiban, F. Marano, Laboratoire de cytophysiologie et toxicologie cellulaire, Université Paris 7, Denis-Diderot, Case 7073, tour 53/54, 3^e étage, 2, place Jussieu, 75251 Paris Cedex 05, France.

L'impact de la pollution atmosphérique sur la santé en milieu urbain est devenu au cours des dernières décennies un problème majeur de santé publique. En effet, on assiste à l'augmentation des maladies aller-

giques dans lesquelles les facteurs environnementaux d'origine naturelle ou artificielle sont largement incriminés. Par ailleurs, des études épidémiologiques récentes, qui ont fait grand bruit, associent la pollution atmosphérique, et tout particu-

lièrement la pollution particulaire, à l'augmentation de la mortalité et de la morbidité d'origine respiratoire et cardiovasculaire [1].

Les particules atmosphériques en suspension (PM₁₀ ou particules de diamètre aérodynamique inférieur à 10 µm) semblent donc jouer un rôle important dans les maladies associées à la pollution atmosphérique. Ces particules sont complexes et peuvent provenir de sources fixes d'origine industrielle ou de sources mobiles c'est-à-dire des véhicules du trafic automobile. Parmi ces véhicules, les moteurs Diesel ont été fortement suspectés dans la mesure où ils émettent des particules fines pouvant constituer en France jusqu'à 87 % des émissions particulaires dues au trafic. Les particules Diesel (PDi) sont des particules primaires directement émises, mais certaines particules dites secondaires peuvent résulter de réactions chimiques de condensation entre gaz précurseurs provenant, par exemple, de la combustion de l'essence. Entre 1997 et 1999, pratiquement toutes les stations de mesure urbaines ont connu des dépassements de la valeur limite journalière pour la protection de la santé fixée par la directive européenne 1999/30/CE (50 µg/m³ PM₁₀). Une étude menée en 1999 par l'OMS et l'ONU sur la France, la Suisse et l'Autriche estime qu'environ 50 % de la population française vit dans des zones où les valeurs annuelles de PM₁₀ sont comprises entre 20 et 30 µg/m³, la valeur limite annuelle fixée par la directive européenne étant de 40 µg/m³ [2].

Un effort important de recherche au niveau international permet actuellement de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires induits par les particules Diesel et de donner ainsi une explication aux observations effectuées par les épidémiologistes et par les cliniciens.

Effets de la pollution particulaire sur la santé

Les premières constatations d'une relation existant entre mortalité, morbidité et pollution atmosphérique datent de la première moitié du XX^e siècle lors des épisodes majeurs de pollution tels que celui de Londres en 1952. Depuis cette date, de nombreuses études épidé-

miologiques ont été réalisées avec des résultats souvent difficilement interprétables voire contradictoires. Il est en effet difficile, étant donné la complexité de l'exposition et les nombreux facteurs de confusion potentiels, d'établir une relation causale claire entre un polluant déterminé à une concentration donnée et un effet sanitaire. Cependant, malgré une diminution importante de la pollution acido-particulaire au cours des 20 dernières années, les études épidémiologiques récentes montrent un lien entre la concentration de PM₁₀ et la mortalité ainsi que la morbidité générale non accidentelle. Les études portent essentiellement sur les effets à court terme, c'est-à-dire de quelques heures à quelques jours. Elles prennent en compte la mortalité et les hospitalisations, en particulier pour cause cardiorespiratoire et les manifestations symptomatiques telles que les rhinites, bronchites, toux et manifestations asthmatiques. Des associations significatives bien que faibles sont retrouvées pour la mortalité pour cause respiratoire et cardiovasculaire comme le montrent les synthèses de Momas *et al.* [3] et de Dockery *et al.* [4]. Ainsi, une augmentation du niveau moyen journalier de 10 µg/m³ augmente la mortalité pour cause respiratoire de 3,4 % alors que l'augmentation de la mortalité pour cause cardiovasculaire est évaluée à 1,4 %. Il faut noter, cependant, qu'une augmentation du risque relatif aussi faible a fait poser la question de sa validité. La réanalyse récente de ces travaux, en améliorant l'approche méthodologique, conforte cependant ces résultats [5]. Ceux de l'étude multicentrique APHEA (*Air Pollution and Health, a European Approach*) effectuée dans 15 villes européennes sur une population totale de 25 millions d'habitants vont dans le même sens. La métaanalyse réalisée à partir de ces données sur 12 villes conclut que, pour les villes de l'Ouest de l'Europe, les risques relatifs concernant les particules sont comparables à ceux qui ont été constatés aux États-Unis [6]. Cependant, le lien le plus fort existe entre morbidité respiratoire à caractère allergique ou infectieux et pollution particulaire, surtout chez les enfants et les personnes âgées. En particulier, une augmentation de la fré-

quence et de la gravité des crises d'asthme est clairement mise en évidence lors de périodes de forte pollution particulaire [4]. Ces études réalisées principalement en Amérique du Nord montrent une association systématique des effets observés avec les PM₁₀. En France l'étude ERPURS, qui a été réalisée en Île-de-France de 1991 à 1995, montre également un excès de morbidité en relation avec le niveau des particules en suspension mesuré par le réseau AIR-PARIF. Elle met en évidence une augmentation de 15 % des manifestations asthmatiques en hiver corrélée à la pollution particulaire [7]. Cette association se retrouve également pour les admissions à l'hôpital pour troubles cardiaques ou respiratoires observées dans l'étude de 10 villes nord-américaines. L'augmentation du risque peut atteindre 20 % quand le niveau de PM₁₀ atteint 50 µg/m³ [8].

En ce qui concerne l'exposition de longue durée, l'incidence plus élevée des cancers en zones urbaines ou industrielles a fait suspecter un rôle de la pollution atmosphérique. Cependant, il semble être sans commune mesure avec celui du tabac ou de l'exposition professionnelle. Pourtant, les nombreuses études expérimentales de cancérogenèse réalisées chez le rat et les études de mutagenèse ont fait classer les PDi dans le groupe 2A par l'IARC (*International Agency for Research on Cancer*), c'est-à-dire probablement cancérigène pour l'homme. Toutefois, il faut noter que ces expériences de cancérogenèse par inhalation ont été réalisées à des concentrations souvent très élevées et que seules les plus fortes, supérieures à 1 000 µg/m³, induisent un excès de cancers. Ces études ont récemment été revues dans une méta-analyse qui conclut que les expositions à des doses inférieures à 600 µg/m³, c'est-à-dire plus de 15 fois les valeurs limites admises actuellement, n'augmentent pas le risque cancer [9]. En ce qui concerne les études épidémiologiques, leur réévaluation par Stöber et Abel en 1996 [10] pour l'*American Health Effect Institute* concluait à un risque probablement très faible voire négligeable pour la population générale et à un risque faiblement augmenté pour les conducteurs professionnels d'engins Diesel.

Qu'est-ce qu'une particule Diesel?

Les particules Diesel sont constituées d'une partie minérale avec un cœur carboné majoritaire, des sulfates, de l'eau, des traces métalliques et des hydrocarbures adsorbés sur ces particules (figure 1). Ces derniers résultent d'une oxydation incomplète des huiles et du carburant. Cette fraction organique, extractible par des solvants, varie avec le moteur, le type de carburant et le système de post-traitement. Elle représente 10 à 80 % de la masse totale. Elle comprend plus de 1 000 composés différents dont des composés mono-aromatiques et poly-aromatiques en particulier des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) tels que le fluoranthène, le pyrène, le benzo[a]pyrène et le benz[a]anthracène, et des nitro-HAP. Les sulfates résultent de l'oxydation du soufre du gazole en SO_2 et pour une petite fraction en SO_3 (figure 2). Les traces métalliques (zinc, chrome, fer, cuivre et plomb) proviennent des composés métalliques du gazole et de l'huile.

Le cœur carboné des PDi résulte de la décomposition de molécules d'hydrocarbures lors de réactions dites de craquage dues à une répartition hétérogène du combustible dans le moteur. Des particules d'un diamètre de 10 à 80 nm s'agglomèrent ensuite pour aboutir à des agrégats d'une taille moyenne de 0,2 μm de diamètre en sortie d'échappement. Ces particules présentent une très grande surface de 10 à 100 m^2/g .

La petite taille des PDi facilite leur diffusion dans l'atmosphère où elles subissent des modifications. Les substances organiques peuvent subir une dégradation photochimique et interagir avec d'autres composés atmosphériques. Ainsi, l'ozone peut s'adsorber sur ces particules et le carbone élémentaire peut catalyser l'oxydation du SO_2 en acide sulfurique dans l'atmosphère. Enfin, des endotoxines et des allergènes peuvent également s'adsorber sur les PDi [11].

L'appareil respiratoire : cible principale des particules Diesel

Étant donné leur petite taille, les PDi pénètrent profondément dans

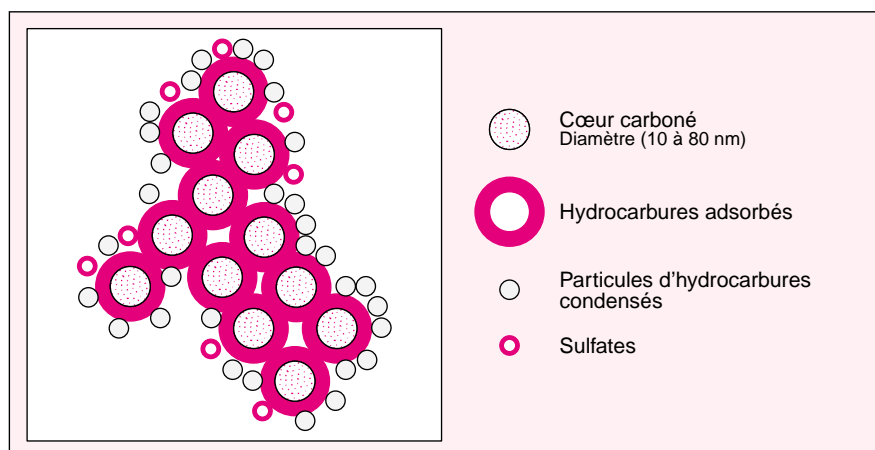


Figure 1. **Schéma des particules Diesel.** Les PDi sont constituées d'un cœur carboné sur lequel s'adsorbent des hydrocarbures et des sulfates. Ces particules s'agglomèrent ensuite pour former des agrégats.

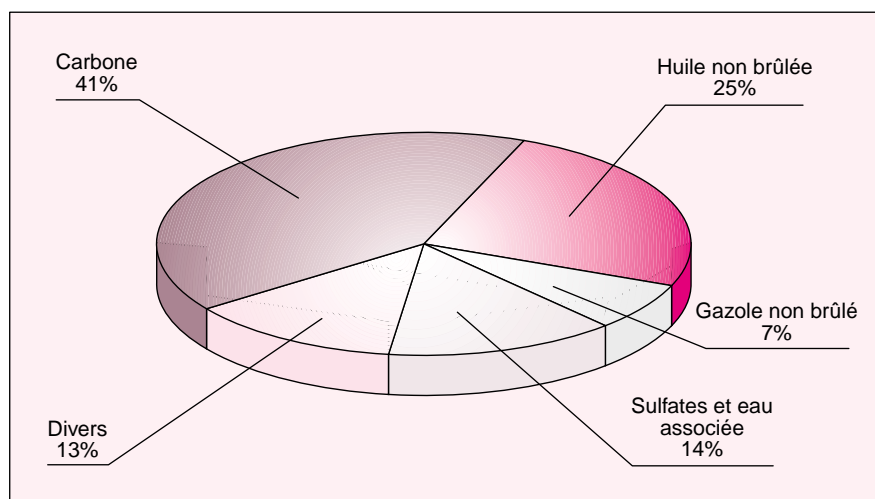


Figure 2. **Composition des particules Diesel** (d'après Kittelson [46]).

l'appareil respiratoire jusqu'au niveau alvéolaire. Ainsi, chez le chien, environ 30 % des particules inhalées de 0,1 μm se déposent dans l'appareil respiratoire dont les deux tiers dans les alvéoles, le reste se répartissant entre le naso-pharynx et la région trachéobronchique [12].

Un mécanisme de clairance en deux phases permet l'élimination des particules. Une phase d'élimination rapide évaluée à moins de 36 heures est assurée par l'épithélium mucociliaire qui tapisse les voies aériennes (clairance mucociliaire). Une phase d'élimination plus lente de plusieurs mois, voire années, est effectuée par les macrophages alvéolaires (clairance alvéolaire). Toute altération de ces mécanismes d'épu-

ration (infections, asthme, autres polluants) conduit à l'accumulation des particules dans l'appareil respiratoire. Les particules pourraient alors être phagocytées par les cellules épithéliales comme observé *in vitro* [13]. Des autopsies de poumons humains révèlent ainsi une accumulation de particules notamment au niveau des bronchioles [14].

Un effet majeur : la réponse inflammatoire

La réponse inflammatoire est l'une des manifestations les plus claires de l'exposition contrôlée aux PDi chez l'homme ou chez l'animal (figure 3). L'exposition de volontaires sains à des PDi par instillation nasale, induit,

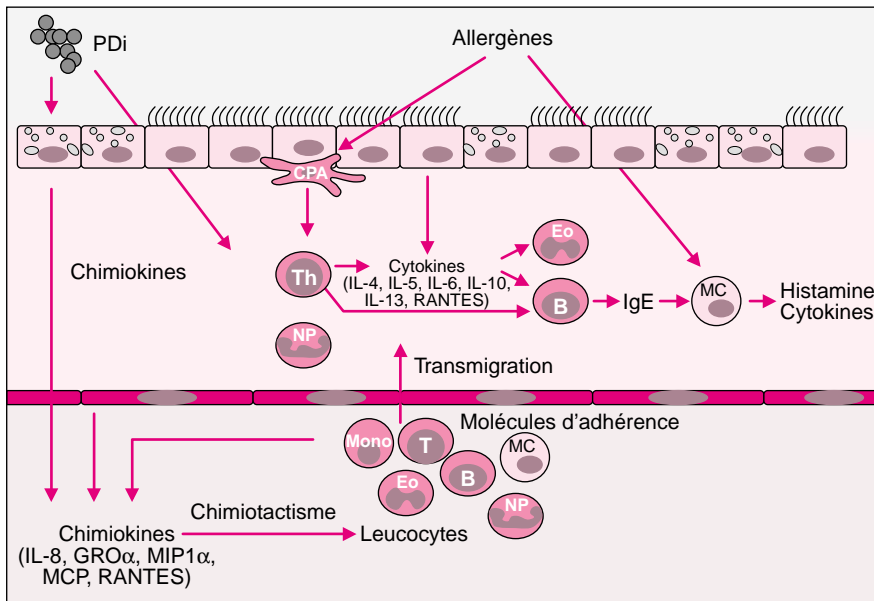


Figure 3. **Schéma de la réaction inflammatoire induite par les particules Diesel (PDi) au niveau de la muqueuse bronchique.** Le dépôt des PDi dans les voies respiratoires induit le relargage de cytokines, dont des chimiokines, notamment par leurs cellules cibles que sont les cellules épithéliales. Les chimiokines peuvent attirer des cellules de l'inflammation et l'expression de molécules d'adhérence permet la transmigration des leucocytes. L'activation de ces cellules peut alors induire la sécrétion d'autres cytokines impliquées dans l'activation des éosinophiles et des lymphocytes B. Le relargage accru des IgE qui en résulte peut, en présence d'allergènes, provoquer l'activation de mastocytes aboutissant au relargage d'histamine, responsable d'une contraction du muscle lisse bronchique et d'une augmentation de la sécrétion de mucus, deux facteurs contribuant à l'obstruction bronchique. B: Lymphocyte B; CPA: cellule présentatrice d'antigènes; Eo: éosinophile; MC: mastocyte; mono: monocyte; NP: neutrophile; Th: lymphocyte T helper.

dans les liquides de lavage de nez, une augmentation du nombre de cellules inflammatoires, des cytokines de type Th1 et Th2, des chimiokines et d'immunoglobulines E (IgE) [15]. Le résultat d'un processus inflammatoire est également observé dans des liquides de lavage bronchoalvéolaire réalisés chez des volontaires sains après exposition à des échappements Diesel dilués [16]. L'infiltrat inflammatoire provoqué par l'exposition aux PDi contient des neutrophiles, cellules impliquées dans la physiopathologie des bronchites chroniques mais également dans l'asthme et les rhinites allergiques. Or les échappements Diesel induisent une augmentation des chimiokines IL-8 (interleukine-8) et GRO α (*growth-regulated oncogene*), qui exercent un effet chimio-attractif sur les neutrophiles et stimulent également leur dégranulation [17]. D'autres chimiokines telles que RANTES (*regulated on activation normal*

T cell expressed and secreted), MIP1 α (*macrophage inflammatory protein*), et MCP (*monocyte chemoattractant protein*), abondamment présentes dans les liquides de lavage nasal d'individus exposés aux PDi, interviennent probablement dans l'attraction d'autres cellules de l'inflammation dans les voies aériennes telles que les granulocytes et les lymphocytes [18]. Les études *in vitro* sur cultures cellulaires ont montré que cette production accrue de médiateurs était associée aux cellules cibles des PDi, c'est-à-dire les cellules épithéliales nasales, bronchiques et alvéolaires ainsi que les macrophages [13, 19-22].

L'infiltration leucocytaire des voies aériennes nécessite la transmigration des cellules de l'inflammation qui fait intervenir des molécules d'adhérence. Or, les échappements Diesel augmentent, dans le tissu bronchique, l'expression de molécules d'adhérence ICAM-1 (*intercellular*

adhesion molecule) et VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule*) chez l'homme [16]. De plus, les études *in vitro* ont montré que l'augmentation de l'expression membranaire d'ICAM-1 dans les cellules épithéliales bronchiques exposées aux PDi est corrélée à l'augmentation de l'attachement des neutrophiles aux cellules épithéliales [23].

D'autres cytokines pro-inflammatoires telles que le GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) ou l'IL1 β sont également induites par les PDi dans des cellules épithéliales d'origine nasale ou bronchique exposées *in vitro* [13, 19]. Or, ces cytokines sont connues pour leur action déterminante sur la différenciation et la maturation des cellules de Langerhans, cellules présentatrices d'antigène qui interagissent étroitement avec les cellules épithéliales des voies aériennes.

Les études expérimentales réalisées chez l'homme tendent également à prouver que les PDi auraient, en présence d'allergènes, un effet adjuvant et provoqueraient une activation lymphocytaire de type Th2 ainsi qu'une réponse spécifique des IgE. En effet, l'instillation intranasale de PDi associées à l'allergène *Ambal* de l'ambrosie augmente fortement la réponse IgE spécifique de l'allergène. Celle-ci est associée à une augmentation des ARNm des cytokines de type Th2 et à une baisse des ARNm des cytokines de type Th1 [15]. La production d'IgE joue un rôle important dans le déclenchement de la réaction allergique immédiate en induisant la dégranulation des mastocytes libérant l'histamine. L'instillation nasale de PDi associées à un allergène augmente effectivement l'histamine dans le liquide de lavage de nez [18].

A partir de ces études, on peut donc proposer une hypothèse explicative des aggravations des maladies respiratoires et plus particulièrement des crises d'asthme observées lors d'une augmentation de la pollution particulaire. La petite taille des PDi les rend facilement inhalables et aptes à atteindre le poumon profond. Par ailleurs, elles sont souvent associées à des allergènes qui s'adsorbent à la surface des particules. Les PDi pourraient alors provoquer, chez les asthmatiques en particulier, l'apparition de crises à des niveaux d'exposition

plus faibles aux allergènes auxquels ils sont sensibilisés. De la même façon, les PDi, en induisant une réponse inflammatoire après inhalation, seraient susceptibles d'induire ou d'accentuer les troubles respiratoires dans des populations sensibles telles que les enfants ou les insuffisants respiratoires.

Quels sont les mécanismes d'action ?

L'observation de cette réponse inflammatoire chez les sujets exposés a conduit à s'interroger sur le rôle respectif des différents composants des PDi dans les mécanismes cellulaires et moléculaires induits par les particules au niveau de leurs principales cellules cibles.

Propriétés des PDi responsables des effets biologiques

Les premières études réalisées *in vivo* chez la souris lors d'administrations intratrachéales de PDi ont suggéré une implication du stress oxydant. En effet, une diminution des activités enzymatiques anti-oxydantes (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase et glutathion-S-transférase) a été observée dans les poumons et le taux de mortalité est diminué si les animaux sont prétraités par de la superoxyde dismutase conjuguée à du polyéthylène glycol [24].

• Rôle des composés organiques

Les composés organiques adsorbés à la surface des PDi peuvent être à l'origine de la production d'espèces activées de l'oxygène (EAO). En effet, parmi ceux-ci se trouvent des quinones qui pourraient être responsables de la production de radicaux (O_2^- et $\cdot OH$) par les PDi mesurés par résonance paramagnétique électronique dans des conditions abiotiques [24]. A cette production directe, s'ajoute une production enzymatique liée à l'activité de réductases NADPH dépendantes telles que la NADPH-cytochrome P450 réductase qui, lors de la réduction des quinones, engendre des radicaux semi-quinones. Ces derniers, par autooxydation, régénèrent les quinones et produisent conjointement des anions superoxydes [25].

Les HAP constituent une autre caté-

gorie de composés organiques représentés sur les PDi et qui sont connus pour leurs propriétés cancérogènes. Leur participation aux effets cellulaires induits par les PDi implique leur désorption des PDi suivie de leur bioactivation par les enzymes de métabolisation telles que les mono-oxygénases à cytochromes P450. L'activité catalytique des cytochromes est connue pour s'accompagner de la production d'EAO. Par ailleurs, la métabolisation des HAP produit des métabolites réactifs comme des HAP α -quinones qui peuvent engendrer des EAO par des cycles redox ou être prises en charge par les enzymes de conjugaison. Ainsi, la fraction organique des PDi, et plus particulièrement la fraction polaire, induit une enzyme anti-oxydante, la hème oxygénase *via* l'ARE (*antioxydant response element*) présent dans le promoteur de son gène [26].

• Rôle des métaux

Les PDi sont à l'origine pauvres en métaux. Cependant, au cours de leur « maturation » dans l'environnement, elles peuvent adsorber de nombreux métaux qu'on retrouve ensuite dans les PM_{10} (Fe, Cu, Ni). Par ailleurs, dans l'organisme et notamment dans les voies aériennes, les PDi semblent capables de perturber le métabolisme normal du fer. En effet, l'instillation trachéale de PDi chez le rat conduit à une augmentation de la concentration en fer total dans les liquides de lavage [27].

Comme il est bien établi que les métaux, et plus particulièrement les métaux de transition, exercent leur toxicité par leur capacité d'engendrer des EAO, ils peuvent être une source supplémentaire d'EAO participant ainsi aux effets cellulaires induits par les PDi.

• Rôle du cœur carboné

La taille, le nombre et la réactivité de surface des particules sont des propriétés physico-chimiques qui peuvent influencer le dépôt de celles-ci dans les poumons, leur biodisponibilité et leur toxicité intrinsèque. Ainsi, plusieurs études récentes utilisant des particules de noir de carbone (comme modèle de cœur carboné présent dans les PDi), ont montré qu'à masse égale, plus les particules sont fines (14 à 21 nm) et donc plus

leur surface est importante, plus elles induisent des inflammations aiguës et persistantes chez le rat [28]. Ces effets seraient liés à leurs propriétés oxydantes mises en évidence par leur capacité d'induire, dans un ADN plasmidique, des coupures qui sont prévenues en présence d'anti-oxydants [29] et de dépléter, notamment en glutathion (GSH), les réserves anti-oxydantes du fluide recouvrant les cellules épithéliales respiratoires [30].

Mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les dommages induits par les PDi

Cette production d'EAO permettrait l'activation de voies de signalisation intracellulaire qui, elles-mêmes, activeraient des facteurs de transcription nucléaires qui règlent l'expression de gènes impliqués dans une variété de processus cellulaires comme la croissance, l'apoptose, l'inflammation et les réponses au stress. Les résultats obtenus *in vivo* et *in vitro* confortent cette hypothèse (figure 4).

• Facteurs de transcription

De nombreux gènes impliqués dans la réponse cellulaire aux PDi sont réglés par NF- κ B, un facteur de transcription qui contrôle la transcription de gènes de la réponse immunitaire et inflammatoire, tels que les gènes des cytokines et des chimiokines. Son activation, qui peut être obtenue par une grande variété de signaux, nécessite la phosphorylation, l'ubiquitination et la dégradation dans le cytoplasme par le protéasome d'une sous-unité inhibitrice, I κ B. NF- κ B peut alors être transloqué vers le noyau et se lier aux séquences κ B consensus situées dans le promoteur des gènes sous son contrôle. Les PDi sont capables d'activer NF- κ B dans des cellules épithéliales bronchiques humaines *in vitro* (BEAS-2B et 16HBE) [20, 31] et les composés organiques extraits des PDi contribuent fortement à cette réponse [32]. L'activation de NF- κ B induite par les PDi et leurs extraits est inhibée en présence d'anti-oxydants mettant en évidence une étape sensible aux EAO dans l'activation de ce facteur de transcription [20]. Cette implication des EAO dans l'activation

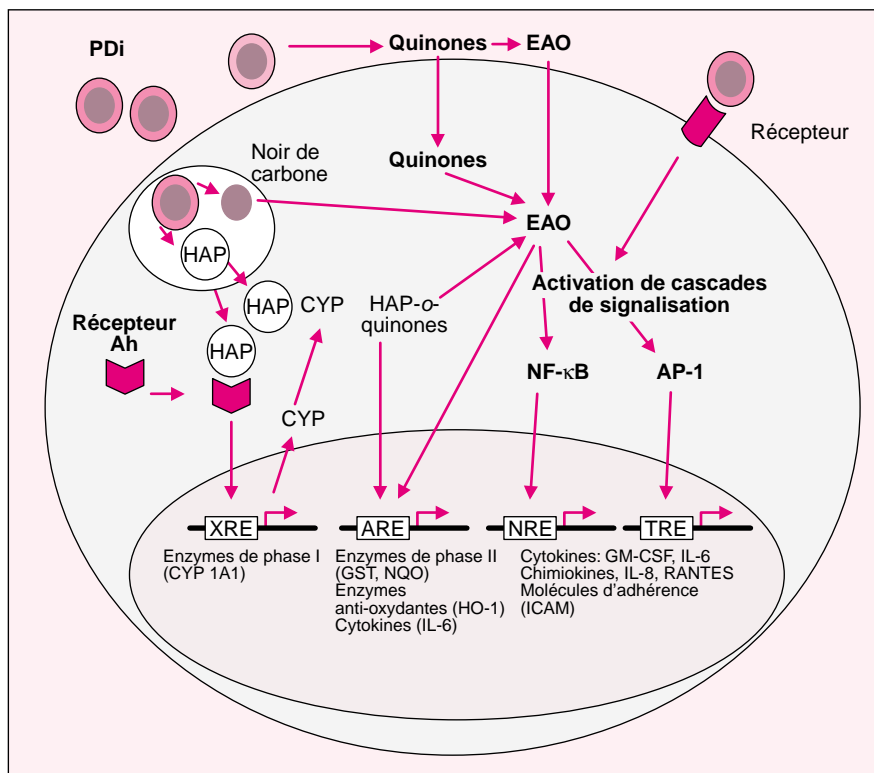


Figure 4. **Schéma des voies métaboliques pouvant être activées par les particules Diesel.** PDi: particules Diesel; HAP: hydrocarbures aromatiques polycycliques; EAO: espèces actives de l'oxygène; Ah: Aryl hydrocarbure; CYP: cytochrome P450; XRE: élément de réponse aux xénobiotiques; ARE: élément de réponse aux anti-oxydants; NRE: élément de réponse à NF-κB; TRE: élément de réponse au TPA.

de NF-κB a été également rapportée pour d'autres polluants particulaires aux propriétés physico-chimiques différentes telles que les PM_{2.5} dans des macrophages alvéolaires murins [33] et des particules riches en métaux (ROFA: *residual oil fly ash*) dans les cellules BEAS-2B [34, 35]. Le facteur de transcription AP-1, décrit comme étant également sensible aux EAO et qui peut être activé par les PM₁₀ [36], ne semble pas l'être par les PDi [20, 32]. Une autre voie métabolique semble également activée par les HAP extraits des PDi [37]. Cette voie aboutit à l'activation de l'ARE, élément de réponse impliqué dans le contrôle des enzymes de phase II (UDP-GT: UDP-glucuronyl transférase, NQO1: NADPH: quinone oxydoréductase, GST: glutathion-S-transférase), d'enzymes anti-oxydantes (hème oxygénase, γ-glutamyl synthétase) et de certaines cytokines (IL-6) et chimiokines (MIP-1α).

• Voies de transduction

La régulation des facteurs de transcription passe par l'activation de voies de transduction situées en amont. Les voies des MAP kinases sont impliquées dans la réponse aux polluants particulaires. Ainsi, les PDi induisent une augmentation de la phosphorylation de la p38 et de Erk 1/2 dans les cellules épithéliales bronchiques [38, 39]. Ces activations sont également produites par des extraits organiques de PDi dans les cellules épithéliales et les macrophages [22, 41], suggérant leur rôle dans la mise en route de la transduction. Ces voies sont également impliquées dans les réponses induites par les PM₁₀ et les ROFA [36, 41].

Elles pourraient être activées pendant ou après la phagocytose ou bien dès le niveau membranaire, soit par interaction directe de la particule avec des récepteurs membranaires, soit par l'intermédiaire de composés

solubles. En effet, pour certaines particules comme l'amiante et des particules riches en métaux qui se solubilisent facilement, il a été montré une activation de certains récepteurs membranaires et plus particulièrement une activation du récepteur de l'EGF (*epidermal growth factor*) [42, 43]. En ce qui concerne la composante organique des PDi, leur implication dans les effets observés suppose leur biodisponibilité. Or, une induction du gène du cytochrome P450 1A1 a été récemment montrée *in vivo* au niveau de poumons de rat [44] et, par nous, *in vitro* dans des cellules épithéliales bronchiques humaines, suggérant que ces composés, en particulier les HAP, peuvent être désorbés des PDi phagocytées par les cellules et pourraient être ensuite métabolisés. Les HAP se lient à un récepteur cytosolique, le récepteur Ah (AhR: *aryl hydrocarbon receptor*). Le complexe ainsi formé a une forte affinité pour un second récepteur: ARNt (*AhR-Nucleus translocator*) qui transporte le complexe HAP-AhR vers le noyau. Le complexe HAP-AhR-ARNt agit alors comme un activateur de la transcription des gènes contenant une séquence régulatrice XRE (élément de réponse aux xénobiotiques), notamment présent dans le gène du CYP 1A1.

Ces derniers résultats montrent l'importance potentielle de la partie organique des PDi dans les mécanismes de toxicité. Ils sont confortés par la mise en évidence du rôle essentiel des extraits organiques dans l'activation de la sécrétion des cytokines et des chimiokines pro-inflammatoires telle que GM-CSF, IL-8 ou RANTES [13, 20, 22]. Il est à noter que des particules provenant de véhicules équipés de pot catalytique et présentant une diminution de 60% des HAP ont une activité pro-inflammatoire beaucoup plus faible que celle des particules provenant de véhicules non catalysés [13].

Conclusions

Ces recherches récentes sur les mécanismes d'action des PDi éclairent la relation entre pollution particulaire et troubles respiratoires établie par les épidémiologistes. Les cellules épithéliales de l'appareil respiratoire sont les principales cellules cibles des

PDi et participent directement au déclenchement de la réponse inflammatoire en relargant des médiateurs responsables du développement des maladies observées *in vivo*. Cette réponse est liée à l'activation de l'expression de certains gènes qui pourrait résulter de la production directe ou indirecte d'EAO par les différents composants des PDi. Ces mécanismes, ainsi que les réponses cellulaires qui en résultent, ne sont pas spécifiques des PDi. En effet, on les retrouve également dans les mécanismes de toxicité des fibres, en particulier minérales, ainsi que des gaz oxydants tels que l'ozone. Les voies de signalisation impliquées sont en général celles des MAP kinases et les facteurs de transcription activés sont ceux qui, tel NF- κ B, sont sensibles aux EAO. Cependant une particularité des PDi est d'associer au stress oxydant une toxicité liée à la présence de molécules organiques telles que les HAP capables elles-mêmes d'induire des réponses spécifiques.

La nature complexe des particules nécessite donc de poursuivre l'étude du rôle respectif du cœur carboné et des composés organiques dans l'activation des réponses cellulaires. En effet, ces données sont importantes pour les constructeurs automobiles car elles leur permettront de décider des évolutions technologiques de dépollution : soit la réduction des composés organiques grâce à l'utilisation des catalyseurs d'oxydation qui réduisent les teneurs des particules en fraction organique soluble, soit la mise en place de filtres à particules pour réduire de façon importante l'émission des particules. L'idéal serait sans doute de diminuer au maximum les deux. Cependant, il faut rappeler que d'autres sources particulières existent et que le rôle des PDi dans la prévalence de l'asthme et dans l'aggravation ou le déclenchement des maladies cardiovasculaires n'est pas prouvé. Elles peuvent intervenir comme vecteurs d'agents biologiques tels que des allergènes ou des endotoxines, dont les effets biologiques seraient alors déterminants. Les métaux adsorbés sont également susceptibles de jouer un rôle important.

Il reste donc encore beaucoup de questions en suspens. Cependant,

une prise de conscience des effets de la pollution atmosphérique sur les maladies respiratoires commence à se développer dans le milieu médical [46]. Les avancées conjointes des études épidémiologiques et expérimentales donnent des éléments objectifs permettant d'établir de façon plus claire une politique de santé. Son cadre réglementaire est défini par la loi sur l'air dont l'article 3 précise que « l'État assure, avec le concours des collectivités locales, la surveillance de la qualité de l'air et de ses effets sur la santé et l'environnement » ■

RÉFÉRENCES

1. Künzli N, Kaiser R, Studnicka M, *et al*. Public health impact of outdoor and traffic-related air pollution: a European assessment. *Lancet* 2000; 356: 795-801.
2. Ba M, Colosio J. Qualité de l'air: une surveillance accrue des particules, mais des concentrations à réduire d'ici l'an 2005. *Les Données de l'Environnement* 2000; 58: 1-4.
3. Momas I, Pirard P, Quénel P, *et al*. Pollution atmosphérique urbaine et mortalité: une synthèse des études épidémiologiques publiées entre 1980 et 1991. *Rev Epidemiol Santé Publ* 1993; 41: 30-43.
4. Dockery DW, Pope C. Acute respiratory effects of particulate air pollution. *Annu Rev Publ Health* 1994; 15: 107-32.
5. Schwartz J, Zanobetti A. Using meta-smoothing to estimate dose-response trends across multiple studies with application to air pollution and daily death. *Epidemiology* 2000; 11: 666-72.
6. Katsouyanni K, Touloumi C, Spix C, *et al*. Short term effects of ambient sulfur dioxide and particulate matter on mortality in 12 European cities: results from times series data from the APHEA project. *Br Med J* 1997; 314: 1658-63.
7. Medina S, Le Tertre A, Dusseux E, *et al*. ERPUR: analyse des liens à court terme entre pollution atmosphérique et santé. Paris: ORS Île-de-France, 1997.
8. Zanobetti A, Schwartz J, Dockery DW. Airborne particles are a risk factor for hospital admissions for heart and lung disease. *Environ Health Perspect* 2000; 108: 1071-7.
9. Valberg PA, Crouch EAC. Meta-analysis of rat lung tumors from lifetime inhalation of diesel exhaust. *Environ Health Perspect* 1999; 107: 693-9.
10. Stöber W, Abel UR. Lung cancer due to diesel soot particles in ambient air? A critical appraisal of epidemiological studies addressing this question. *Int Arch Occup Environ Health* 1996; S3-61.
11. Ormstad H, Johansen BV, Gaarder PI. Airborne house dust particles and diesel exhaust particles as allergen carriers. *Clin Exp Allergy* 1998; 28: 702-8.
12. Wolff RK, Kanapilly GM, De Nee PB, *et al*. Deposition of 0.1 μ m chain aggregate aerosols in beagle dogs. *J Aerosol Sci* 1981; 12: 119-29.
13. Boland S, Baeza-Squiban A, Fournier T, *et al*. Diesel exhaust particles are taken up by human airway epithelial cells *in vitro* and alter cytokine production. *Am J Physiol* 1999; 276: L604-13.
14. Pinkerton KE, Green FH, Saiki C, *et al*. Distribution of particulate matter and tissue remodeling in the human lung. *Environ Health Perspect* 2000; 108: 1063-9.
15. Diaz-Sanchez D, Tsien A, Fleming J, *et al*. Combined diesel exhaust particulate and ragweed allergen challenge markedly enhances human *in vivo* nasal ragweed-specific IgE and skews cytokine production to a T helper cell 2-type pattern. *J Immunol* 1997; 158: 2406-13.
16. Salvi S, Blomberg A, Rudell B, *et al*. Acute inflammatory responses in the airways and peripheral blood after short-term exposure to diesel exhaust in healthy human volunteers. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 702-9.
17. Salvi SS, Nordenhall C, Blomberg A, *et al*. Acute exposure to diesel exhaust increases IL-8 and GRO-alpha production in healthy human airways. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 550-7.
18. Diaz-Sanchez D, Penichet-Garcia M, Saxon A. Diesel exhaust particles directly induce activated mast cells to degranulate and increase histamine levels and symptom severity. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106: 1140-6.
19. Bayram H, Devalia JL, Sapsford RJ, *et al*. 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* 1998; 18: 441-8.
20. Takizawa H, Ohtoshi T, Kawasaki S, *et al*. Diesel exhaust particles induce NF- κ B activation in human bronchial epithelial cells *in vitro*: importance in cytokine transcription. *J Immunol* 1999; 162: 4705-11.
21. Juvin P, Fournier T, Boland S, *et al*. Diesel particles are taken up by type II tumor cells and alter cytokine secretion. *Arch Environ Health* 2001 (sous presse).
22. Fahy O, Hammad H, Sénéchal S, *et al*. Synergistic effect of diesel organic extracts and allergen Der p 1 on the release of chemokines by peripheral blood mononuclear cells from allergic subjects. Involvement of the MAP kinase pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 23: 247-54.
23. Takizawa H, Abe S, Ohtoshi T, *et al*. Diesel exhaust particles up-regulate expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in human bronchial epithelial cells. *Clin Exp Immunol* 2000; 120: 356-62.

RÉFÉRENCES

24. Sagai M, Saito H, Ichinose T, *et al.* Biological effects of diesel exhaust particles. I. *In vitro* production of superoxide and *in vivo* toxicity in mouse. *Free Rad Biol Med* 1993; 14: 37-47.
25. Kumagai Y, Arimoto T, Shinyashiki M, *et al.* Generation of reactive oxygen species during interaction of diesel exhaust particle components with NADPH-cytochrome P450 reductase and involvement of the bioactivation in the DNA damage. *Free Rad Biol Med* 1997; 22: 479-87.
26. Li N, Venkatesan MI, Miguel A, *et al.* Induction of heme oxygenase-1 expression in macrophages by diesel exhaust particle chemicals and quinones *via* the antioxidant-responsive element. *J Immunol* 2000; 165: 3393-401.
27. Ghio AJ, Richards JH, Carter JD, *et al.* Accumulation of iron in the rat lung after tracheal instillation of diesel particles. *Toxicol Pathol* 2000; 28: 619-27.
28. Li XY, Brown D, Smith S, *et al.* Short-term inflammatory responses following intratracheal instillation of fine and ultrafine carbon black in rats. *Inhal Toxicol* 1999; 11: 709-31.
29. Stone V, Shaw J, Brown DM, *et al.* The role of oxidative stress in the prolonged inhibitory effect of ultrafine carbon black on epithelial cell function. *Toxicol In Vitro* 1998; 12: 649-59.
30. Zielinski H, Mudway IS, Bérubé KA, *et al.* Modeling the interactions of particulates with epithelial lining fluid antioxidants. *Am J Physiol* 1999; 277: L719-26.
31. Baeza-Squiban A, Bonvalot V, Boland S, *et al.* Diesel exhaust particles increase NF- κ B DNA-binding and c-fos proto-oncogene expression in human bronchial epithelial cells. *Toxicol In Vitro* 1999; 13: 817-22.
32. Bonvalot V, Baeza-Squiban A, Boland S, *et al.* Activation of transcription factors by diesel exhaust particles in human bronchial epithelial cells *in vitro*. *Inhal Toxicol* 2000; 12: 359-64.
33. Shukla A, Timblin C, Berube K, *et al.* Inhaled particulate matter causes expression of nuclear factor (NF)- κ B-related genes and oxidant-dependent NF- κ B activation *in vitro*. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 23: 182-7.
34. Quay JL, Reed W, Samet J, *et al.* Air pollution particles induce IL-6 gene expression in human airway epithelial cells *via* NF- κ B activation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 19: 98-106.
35. Kennedy T, Ghio AJ, Reed W, *et al.* Copper-dependent inflammation and nuclear factor- κ B activation by particulate air pollution. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 19: 366-78.
36. Timblin C, Berube K, Churg A, *et al.* Ambient particulate matter causes activation of the c-jun kinase/stress-activated protein kinase cascade and DNA synthesis in lung epithelial cells. *Cancer Res* 1998; 58: 4543-7.
37. Ng D, Kokot N, Hiura T, *et al.* Macrophage activation by polycyclic aromatic hydrocarbons: evidence for the involvement of stress-activated protein kinases, activator protein-1, and antioxidant response elements. *J Immunol* 1998; 161: 942-51.
38. Hashimoto S, Gon Y, Takeshita I, *et al.* Diesel exhaust particles activate p38 MAP kinase to produce interleukin-8 and RANTES by human bronchial epithelial cells and N-acetylcysteine attenuates p38 MAP kinase activation. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 280-5.
39. Boland S, Bonvalot V, Fournier T, *et al.* Mechanisms of GM-CSF increase by diesel exhaust particles in human airway epithelial cells. *Am J Physiol* 2000; 278: L25-32.
40. Hiura TS, Kaszubowski MP, Li N, *et al.* Chemicals in diesel exhaust particles generate reactive oxygen radicals and induce apoptosis in macrophages. *J Immunol* 1999; 163: 5582-91.
41. Silbajoris R, Ghio AJ, Jaskot R, *et al.* *In vivo* and *in vitro* correlation of pulmonary MAPK kinase activation following metallic exposure. *Inhal Toxicol* 2000; 12: 453-68.
42. Wu W, Graves LM, Jaspers I, *et al.* Activation of the EGF receptor signaling pathway in human airway epithelial cells exposed to metals. *Am J Physiol* 1999; 277: L924-31.
43. Zanella CL, Posada J, Tritton TR, *et al.* Asbestos causes stimulation of the ERK-1 mitogen activated protein kinase cascade after phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res* 1996; 56: 5334-8.
44. Sato H, Sone H, Sagai M, *et al.* Increase in mutation frequency in lung of Big Blue rat by exposure to diesel exhaust. *Carcinogenesis* 2000; 21: 653-61.
45. Contribution de la pollution atmosphérique extérieure en pathologie respiratoire. *Rev Mal Respir* 1997; 14: 6809-55.
46. Kittelson DB. Engines and nanoparticles: a review. *J Aerosol Sci* 1998; 29: 575-88.

Summary

Respiratory toxicity of Diesel exhaust particles: cellular and molecular mechanisms

Particulate air pollution has been incriminated by epidemiologists to be responsible for increased mortality and morbidity due to cardiovascular and respiratory disorders. Diesel exhaust particles (DEP) are one of the main contributors to atmospheric particles. In this article we review the effects of DEP on the cells of the respiratory tract, especially the inflammatory response elicited by these particles. DEP increase the release of proinflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules, responsible for the recruitment and the activation of inflammatory cells. Furthermore DEP act as an adjuvant which may enhance allergic inflammation. These responses are linked to the activation of the expression of certain genes. They may result from the direct or indirect production of reactive oxygen species by the different components of DEP which are the carbonaceous core, the adsorbed organics and metallic contaminants. We discuss the different molecular and cellular mechanisms involved in this inflammatory response which may include the metabolic activation of DEP.

TIRÉS À PART

F. Marano.