

Des particules au NO₂ comme effecteur toxique principal des émissions de moteurs Diesel, un problème lié à l'évolution des réglementations Euro successives

From particulate matter to NO₂ as Diesel engine emission main toxic trigger : facts linked to successive Euro emission regulations

Jean-Paul MORIN*, David PRETERRE*, **, Stéphane LORIOT*, Virginie HASSON*, **, Frédéric DIONNET**

Résumé

La fraction particulaire des émissions de moteurs Diesel a souvent été déclarée comme principal agent responsable de la dégradation de la qualité de l'air urbain, tout particulièrement en site de proximité du trafic. Cette fraction a été très étudiée au plan toxicologique à l'aide de modèles *in vivo* et *in vitro*, cependant trop souvent extraite de son contexte d'aérosol, de la voie et des doses d'exposition normales par inhalation. Ceci a conduit à amplifier les impacts potentiels susceptibles de se produire, voire à mettre en évidence des effets dont la réalité reste à démontrer en situation réelle. L'évolution de la réglementation Euro a conduit à mettre en place la catalyse d'oxydation puis le filtre à particules pour réduire les émissions de CO, les HC et les particules émis par les moteurs Diesel. Le problème des oxydes d'azote, réglementés dans leur globalité, n'est à ce jour pas résolu avec des technologies matures fiables et durables applicables à grande échelle sur les véhicules légers. L'analyse temporelle, sur les dix dernières années, des teneurs en oxydes d'azote en proximité du trafic montre une évolution remarquablement corrélée à la dissémination des technologies imposées par les réglementations successives de Euro1 vers Euro5. Le phénomène majeur est une élévation du ratio NO₂/NO_x conduisant même, malgré une lente diminution des oxydes d'azote totaux, à une élévation des concentrations en NO₂ ne permettant plus d'atteindre les objectifs de qualité fixés par l'Organisation mondiale de la santé. L'analyse des impacts toxicologiques liés à cette évolution montre que les teneurs élevées en NO₂ sont corrélées au potentiel oxydant des émissions évalué par résonance paramagnétique électronique et à la survenue d'un stress oxydant systémique chez les animaux exposés par inhalation et un stress oxydant sur cultures organotypiques de tissu pulmonaire exposés à un flux continu d'émissions diluées de moteurs Diesel. Dans ces conditions, l'impact toxicologique n'est plus modifié par la filtration des émissions lors de l'échantillonnage, le potentiel oxydant de la phase gazeuse devenant plus toxique que la fraction particulaire des émissions. Nous souhaitons attirer l'attention sur ce nouveau risque sanitaire pour lequel l'épidémiologie commence à apporter les premiers éléments de pré-occupation.

* INSERM U644 – Université de Rouen, 22, boulevard Gambetta, 76183 Rouen Cedex. Contact : jean-paul.morin@univ-rouen.fr – Tél. : 02 35 14 85 38 – Fax : 02 35 14 83 65.

** CERTAM – 1, rue Joseph Fourier, 76800 Saint-Étienne-du-Rouvray. Contact : frederic.dionnet@certam-rouen.com

Abstract

Diesel particulate matter has frequently been claimed as the main trigger of urban air quality degradation in ground transportation traffic vicinity. The toxic impact of Diesel soot has been extensively studied, using as well *in vivo* as *in vitro* biological systems, but too frequently away from its aerosol context and far from the reality in terms of inhalation exposure dosages and routes. This has led to potential erroneous observations and/or impact amplification compared to the real life situation. The time course evolution of Euro regulations led to the onset of oxidation catalysis and Diesel particulate filtration for the attainment of emission limits for CO, HC and particulates. The nitrogen oxides (NO_x) issue is not yet solved with mature, durable and efficient technologies to be widely disseminated on light duty engines. The time scale analysis of atmospheric NO_x over the last decade shows an evolution which is clearly correlated to the dissemination rate of the technologies required for limit attainment. The main feature is the elevation of the NO₂/NO_x ratio leading to increased NO₂ concentrations in the traffic vicinity which represent a hindrance to the attainment of WHO recommendations for NO₂. The study of Diesel emission toxicological impacts show that increased NO₂ levels correlates with increased oxidant potential as measured by electron spin resonance and produce a systemic oxidant stress in rats exposed by inhalation and in lung tissue organotypic cultures exposed to a continuous flow of diluted Diesel emissions. In this situation the filtration of sampled emissions did not modify the toxic response pattern, thus pointing out that the oxidant potential of the gas phase, mainly assignable to NO₂ elevation, becomes the predominant toxic trigger from recent Diesel engine emissions. In conclusion, we intend to draw the attention of the community on this Euro regulation induced new health concern issue for which epidemiological literature recently produced the first evidences.

1. Position du problème

La qualité de l'air fait aujourd'hui partie des toutes premières préoccupations des populations en matière d'environnement et de santé. Outre la pollution due aux activités industrielles, la population est fortement sensibilisée aux problèmes liés à la pollution due aux transports par véhicules terrestres équipés de moteurs à combustion interne. Parmi les polluants émis, les particules Diesel ont tout particulièrement retenu l'attention. De nombreuses études ont été réalisées depuis ces 50 dernières années sur les impacts biologiques des particules Diesel, et principalement sur leur potentiel cancérigène et inflammatoire. En effet, la présence de HAP, connus pour leur activité mutagène et cancérigène, adsorbés sur le noyau carboné constituant la particule, a suscité de nombreux travaux afin de déterminer le potentiel cancérigène de la particule Diesel [Brooks *et al.* 1981 et 1984, Casto *et al.* 1981, Crebelli *et al.* 1995, Lewtas 1983]. Il est important de considérer que la grande majorité de ces travaux a été menée sur ces particules sorties de leur contexte d'aérosol de combustion à la suite de prélèvements sur filtres, les isolant de la fraction gazeuse de l'aérosol.

Plus récemment, de nombreuses études épidémiologiques ont été réalisées pour étayer les liens potentiels entre pollution atmosphérique et santé [Pope *et al.* 2002, Quenel *et al.* 1998, Zmirou 1987, Samoli *et al.* 2006]. Ainsi, il a été montré, en premier lieu aux États-Unis, puis en Europe, que des variations journalières des indicateurs de pollution (dioxyde de soufre, particules-FN (fumée noire) ou PM₁₀, dioxyde d'azote et ozone) peuvent être associées à des pathologies fonctionnelles d'ordre respiratoire et/ou cardiaque. Ce type d'étude consiste à analyser, quotidiennement, l'association entre les indicateurs de pollution, caractérisant l'exposition de la population, et des indicateurs de mortalité et de morbidité hospitalière, caractérisant l'état de santé. Ainsi, une étude

multicentrique APHEA [*Air Pollution and Health: European Approach*], réalisée dans 15 villes européennes et conduite sur des données des années 1980 [Anderson *et al.* 1997, Katsouyanni *et al.* 1997, Quenel *et al.* 1998], montre qu'une augmentation de 50 µg/m³ du niveau des indicateurs de pollution s'accompagne dans les jours qui suivent d'un accroissement de 1 à 3 % de la mortalité totale (non accidentelle), et de 4 à 5 % de la mortalité pour cause respiratoire. Cette variation des indicateurs de pollution s'accompagne également d'une augmentation de 1 à 3 % du nombre journalier d'hospitalisations pour causes respiratoires chez des patients âgés de plus de 65 ans, de 1 à 8 % des hospitalisations pour asthme chez l'enfant et enfin, d'une augmentation de 1 à 4 % des hospitalisations pour cause de broncho-pneumopathies chroniques obstructives. Plus récemment, il a été montré que ces effets cardiorespiratoires pouvaient être quantifiés de façon significative pour des incréments de 10 µg/m³ avec une prévalence plus importante pour le NO₂ que pour les PM₁₀ ou les PM_{2,5}. [Samoli *et al.* 2006]. Ainsi, les principaux effets sur la santé à court terme des polluants atmosphériques en milieu urbain concernent essentiellement l'appareil cardiorespiratoire. Bien qu'il existe une très grande variabilité individuelle dans la susceptibilité aux polluants atmosphériques, cette étude a montré que certaines populations sont plus sensibles que d'autres en termes d'effets sur la santé. C'est le cas, en particulier, des personnes âgées et des personnes souffrant de maladies respiratoires chroniques (asthme, bronchite chronique), de maladies cardiaques chroniques [Hoek *et al.* 1999, Von Klot *et al.* 2005], ainsi que des enfants [Quenel *et al.* 1998]. À long terme, les connaissances concernant les effets de la pollution atmosphérique sur la mortalité annuelle, l'espérance de vie et la prévalence de certaines maladies chroniques (bronchites chroniques, cancers du poumon, insuffisance cardiaque) sont encore lacunaires. En effet, les études épidémiologiques nécessitent de

recourir à des protocoles d'étude particuliers, pour lesquels l'estimation de l'exposition des sujets sur une longue période d'étude est difficile à réaliser avec fiabilité. Les entrées des modèles en termes d'évaluation d'exposition sont basées sur des données pour lesquelles les maillages géographiques ainsi que la nature des paramètres évalués par les réseaux de surveillance de la qualité de l'air sont très variables. Ces entrées des modèles ne compilent que très rarement des budgets exposition/temps air extérieur/air intérieur et conduisent à introduire des éléments de pondération de modèles statistiques liés à l'interaction potentielle de facteurs confondants. Les données produites par la grande majorité des études sont essentiellement des corrélations, pour lesquelles le caractère causal et sélectif reste le plus souvent difficile à extraire. Les études de budget personnel d'exposition aux particules et aux oxydes d'azote réalisées par le *Californian Air Resource Board* ont montré que plus de 50 % de l'exposition quotidienne des californiens sont imputables au temps passé dans la circulation automobile, la population étant alors exposée à des émissions de moteurs fraîchement émises, n'ayant subi aucune chimie atmosphérique avant d'être inhalées. Il est vraisemblable que ces chiffres puissent être plus élevés en Europe compte tenu de la forte diésélisation du parc automobile européen comparé à celui de Californie. Ces observations justifient donc pleinement les approches de notre groupe visant à étudier l'impact toxicologique d'aérosols de combustion fraîchement émis de moteurs Diesel.

Il reste donc important par des travaux expérimentaux, basés sur des conditions d'expositions réalistes en termes de concentrations de polluants et

de modalités d'exposition par inhalation d'aérosols fraîchement émis par les systèmes de combustion, d'approfondir les études de causalité directe entre les polluants particulaires et gazeux et leurs impacts potentiels sur l'appareil cardiorespiratoire, cible principale de ces émissions.

2. Émissions par les moteurs à combustion interne et qualité de l'air ambiant

En ce qui concerne les particules (PM₁₀), les données AIRPARIF montrent des valeurs moyennes annuelles de 40 µg/m³ en site de proximité pour des valeurs limites de 41 µg/m³ et un objectif de qualité à 30 µg/m³, valeurs moins préoccupantes que celles rapportées pour les oxydes d'azote que nous discuterons ci-dessous. Les objectifs de qualité semblent pouvoir être atteints pour les PM₁₀ avec la mise en place des filtres à particules sur les motorisations Diesel, jusque-là premières émettrices de particules ultrafines parmi les sources liées aux transports terrestres. Les données urbaines du réseau de mesure AIR NORMAND comparant sites de fond et sites de proximité automobile montrent que l'incrément lié à la circulation automobile en site de proximité représente environ 25 % de la masse des PM₁₀. Alors que la filtration de ces émissions représente en nombre une action majoritaire, il est important de noter qu'elle représente un bras de levier certes intéressant mais d'impact limité sur les concentrations massiques de particules atmosphériques servant de base aux études épidémiologiques.

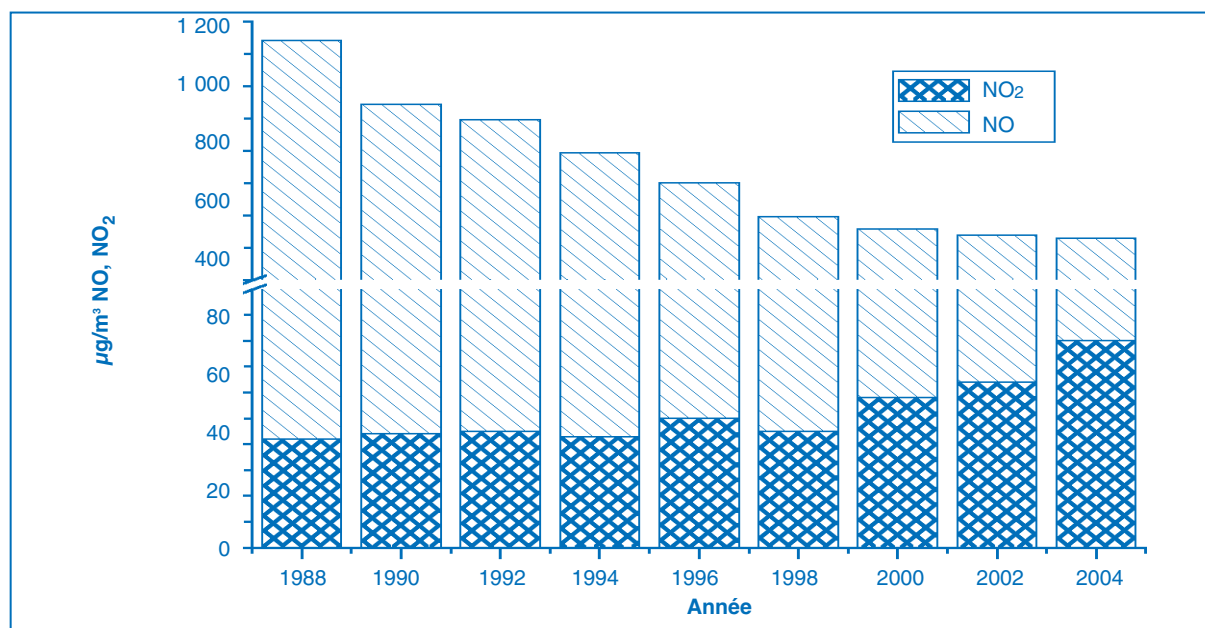


Figure 1.

Évolution des immissions d'oxydes d'azote entre 1988 et 2004. Valeurs d'immissions entre les voies d'autoroutes en valeurs moyennes annuelles. Données adaptées à partir de sources IFEU 2005 (www.ifeu.de).

Time course pattern of nitrogen oxide immissions from 1988 to 2004 recorded on german highways. Adapted from data of IFEU 2005 (www.ifeu.de).

L'implantation de catalyseurs d'oxydation sur les véhicules Diesel, puis le renforcement de cette activité catalytique pour l'aide à la gestion des filtres à particules dans leur version actuelle de type CRT ou de filtres catalytiques, alors qu'elle est sans impact sur les émissions totales d'oxydes d'azote, laisse entrevoir la possibilité d'une nette aggravation des niveaux d'émissions de NO₂ contribuant aux oxydes d'azote totaux (Figures 3 et 4) [Ayala *et al.* 2002, Morin *et al.*] signant une forte élévation du potentiel oxydant des émissions des moteurs équipés de ces systèmes de post-traitement. Ces nouvelles technologies risquent donc de conduire à une modification de la typologie des immissions et par là même à la survenue de nouveaux impacts sanitaires liés aux propriétés très oxydantes de ces nouvelles émissions. Il conviendra de faire prendre en considération ces nouveaux impacts par les autorités sanitaires et réglementaires à l'aide d'une meilleure information.

Les réseaux de surveillance de la qualité de l'air rapportent une tendance récente en ce qui concerne les évolutions des concentrations en dioxydes d'azote en zones de proximité de trafic telles que le boulevard périphérique parisien [AIRPARIF bilan 2004*], la ville de Londres [Carlslaw *et al.* 2005], les mesures effectuées entre les voies d'autoroutes en Allemagne [Source IFEU 2004**] qui convergent toutes vers une très nette élévation des immissions de NO₂, alors qu'une tendance globale à une diminution des oxydes d'azote totaux est observée (Figure 1). Ce phénomène s'observe à partir de l'année 2000 pour les données allemandes et à partir de 2002 pour les données anglaises. Ces évolutions sont étroitement corrélées au degré d'équipement des véhicules Diesel avec des catalyseurs d'oxydation. Les données rapportées par AIRPARIF en site de proximité du trafic montrent en données moyennes annuelles des valeurs comprises entre 61 et 102 µg/m³ alors que la valeur limite pour 2004 est de 52 µg/m³ et que l'objectif de qualité est de 40 µg/m³. Il s'agit là d'un dépassement permanent, lié essentiellement aux émissions des transports terrestres. Il pourra être facilement admis que, compte tenu de l'évolution négative des NO_x totaux et de l'évolution positive du NO₂, l'évolution du ratio NO₂/NO_x soit en forte élévation comme le montre la figure 2 adaptée à partir des données londonniennes [Carlslaw *et al.* 2006]. Les raisons essentielles de cette évolution résident dans l'effet conjoint de la mise en œuvre, d'une part de systèmes de post-traitement sur les moteurs à allumage commandé tels que la catalyse trois voies qui supprime la quasi totalité des NO_x de ces émissions (Figure 3), et d'autre part de la catalyse d'oxydation des émissions de moteurs Diesel qui est active pour la destruction du CO et des HC, mais augmente très significativement le ratio NO₂/NO_x de ces émissions (Figure 4) par une conversion du NO en NO₂ (Figure 3) particulièrement nette en conditions de roulage urbain.

L'utilisation de filtres à particules et la possibilité de leur régénération en cours de fonctionnement a conduit à assister l'oxydation des particules piégées dans les filtres par une forte activité de catalyse d'oxydation placée soit en amont du filtre pour les systèmes de type CRT ou de filtres assistés, soit par le *washcoating* des filtres à particules ou encore par l'additivation des carburants avec des substances à action catalytique. De nombreux travaux analytiques des émissions ainsi générées montrent une très forte augmentation du ratio NO₂/NO_x en aval des systèmes de type CRT [Ayala *et al.* 2002, Programme VERT Mayer *et al.* 1998] (Figure 5) qui ont conduit les autorités suisses, ainsi que plus récemment le *Californian Air Resource Board*, à prendre des mesures de limitation du ratio NO₂/NO_x des émissions de moteurs Diesel exploités en milieux confinés tels que les mines ou la construction de tunnels, de façon à limiter le potentiel irritant et oxydant de ces émissions pour les personnels travaillant dans ces milieux confinés. Il est aussi important de noter que l'augmentation de l'émission de NO₂ à la source conduit à une augmentation de la cinétique de production d'ozone atmosphérique et de particules de nitrate dont il conviendra de quantifier les impacts environnementaux. L'impact de la catalyse d'oxydation sur les immissions de NO₂ apparaît donc indéniable. Compte tenu de la prospective sur les systèmes de post-traitements Diesel, la situation continuera de s'aggraver tant que les technologies d'élimination des oxydes d'azote n'auront pas atteint un degré de maturité et une dissémination suffisants pour inverser cette tendance.

Si la réduction des émissions de polluants issus de la combustion Diesel est un important objectif à se fixer à terme, il paraît à déconseiller que cet objectif soit atteint au prix d'une élévation des émissions de NO₂ dont les impacts en termes de santé et d'environnement risquent d'être supérieurs à ceux provoqués par les particules, le monoxyde de carbone ou les hydrocarbures tels qu'émis par les moteurs de technologies récentes suite aux importants progrès accomplis dans les domaines de l'injection et de la combustion.

Le potentiel très fortement irritant et la toxicité du NO₂ sont bien connus, et les composés oxydants qui lui sont associés dans les émissions sont susceptibles de générer des atteintes importantes de l'appareil cardiorespiratoire [Ohyama *et al.* 1999, Stone *et al.* 1998]. Il sera donc important de prendre en considération ces observations et de réaliser de façon systématique des études toxicologiques approfondies sur aérosols complets en aval des systèmes de dépollution fonctionnant en modes représentatifs, de façon à mettre en œuvre les meilleures stratégies de dépollution sur des bases d'études d'impact biologique global et non comme essentiellement à ce jour sur la base de l'analyse de quelques polluants réglementés (règlements Euro) dont le NO₂ en tant que tel ne fait pas partie, alors qu'il fait l'objet d'objectifs de qualité de l'air par l'Organisation mondiale de la santé.

* Site Internet : www.airparif.asso.fr

** Site Internet : www.ifeu.de

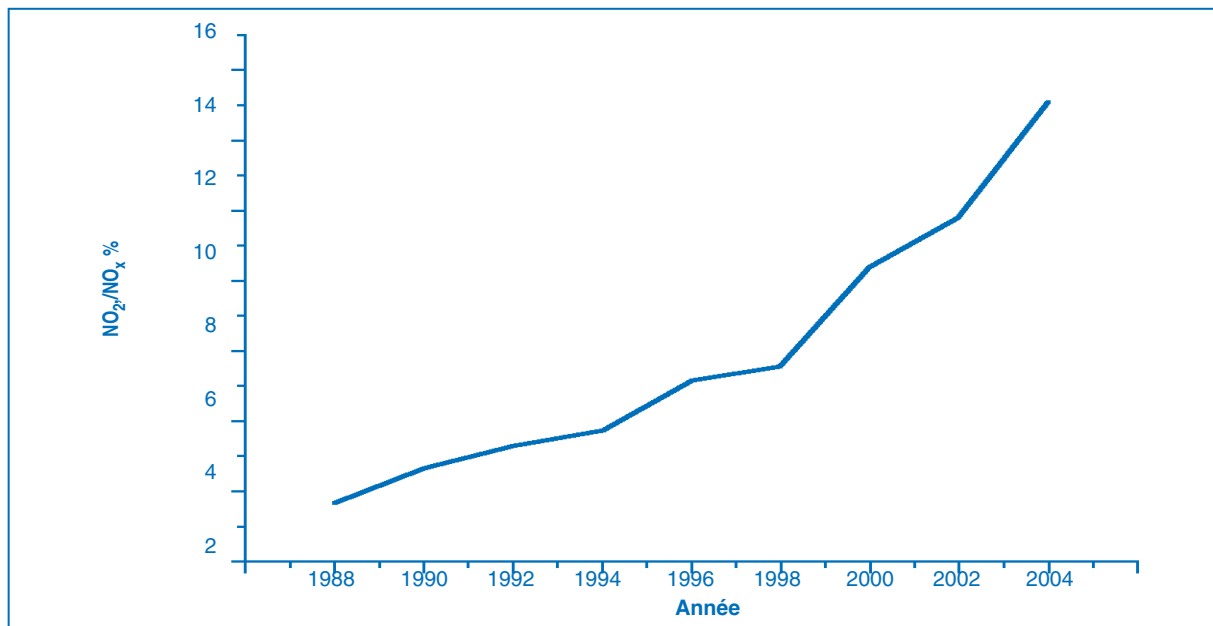


Figure 2.

Évolution du rapport de concentrations NO₂/NO_x entre 1988 et 2004.

Valeurs d'immissions entre les voies d'autoroutes en valeurs moyennes annuelles.

Données adaptées à partir de sources IFEU 2005. Pour mémoire, l'utilisation de la catalyse d'oxydation date de 1993 en Europe. La contribution des véhicules Diesel catalysés devient significative à partir de 1998 et n'a cessé d'augmenter depuis.

Time course pattern of NO₂/NO_x concentration ratios from 1988 to 2004 recorded on german highways.

Adapted from data of IFEU 2005. For memory, DOC was first introduced in 1993.

Significant contribution to light duty vehicle car park started from 1998 and further increased.

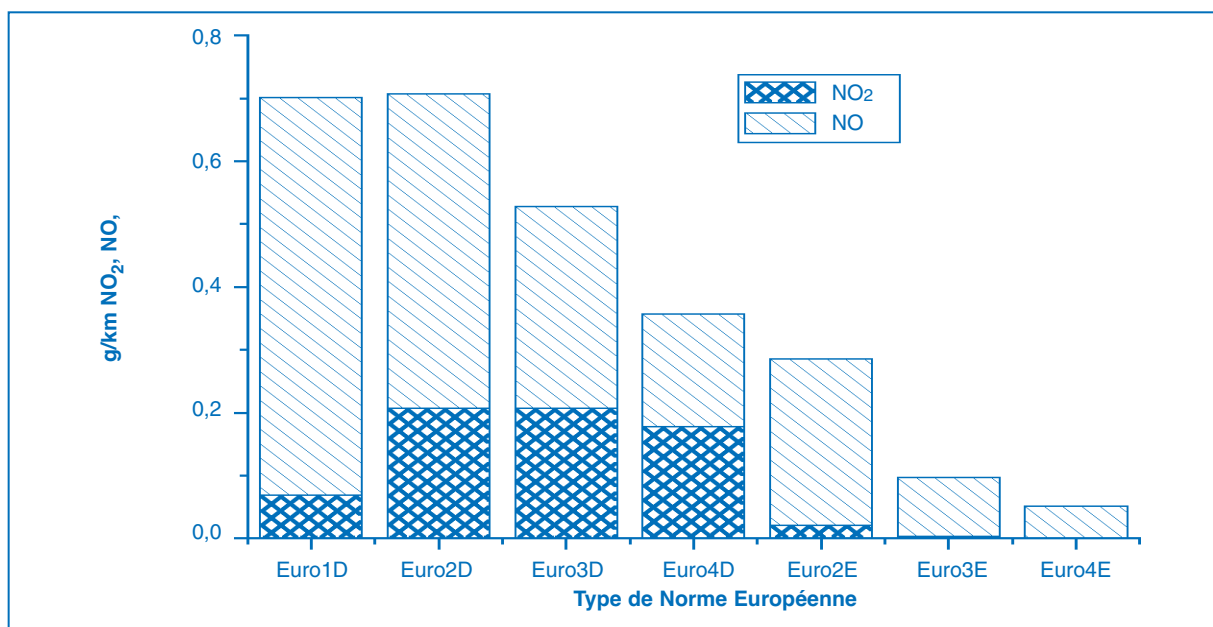


Figure 3.

Impact de l'évolution de la norme européenne sur les émissions d'oxydes d'azote par les véhicules légers Diesel (D) et à allumage commandé (E).

Une diminution importante des émissions de NO_x totaux est observée pour les deux types de motorisation.

Par contre, une forte augmentation des émissions de NO₂ est observée entre Euro1D et Euro2D, liée à l'apparition de la catalyse d'oxydation sur les moteurs Diesel, qui persiste avec l'évolution de la norme.

Ce phénomène n'est pas observé avec les moteurs à allumage commandé équipés de catalyse 3 voies.

Ces données sont adaptées à partir des données IFEU (im Auftrag des UVM 2004).

Impact of European regulation on NO_x emissions by light duty vehicles (Diesel D and Gasoline E).

A significant reduction of NO_x was achieved for both Diesel and gasoline while a marked increase in NO₂ is only observed for Diesel due to the use of oxidation catalysis.

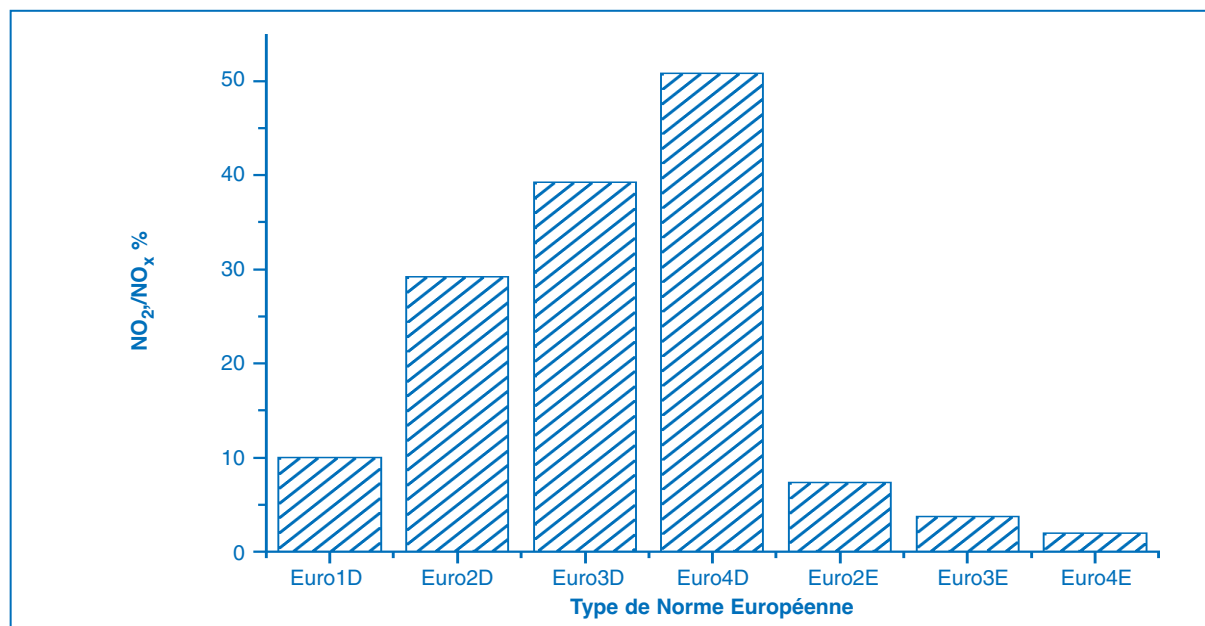


Figure 4.

Impact de l'évolution de la norme européenne sur le rapport NO₂/NO_x dans les émissions des véhicules légers Diesel (D) et à allumage commandé (E). Une constante élévation de ce rapport est observée avec l'évolution de la norme pour la motorisation Diesel, alors qu'une diminution de ce rapport est observée dans les émissions de moteurs à allumage commandé. Ces données sont adaptées à partir des données IFEU (im Auftrag des UVM 2004).

Impact of European regulation on NO₂/NO_x concentration ratios by light duty vehicles (Diesel D and Gasoline E).

A significant reduction of this ratio was observed with gasoline while a constant increase of NO₂/NO_x ratio was achieved for Diesel to the use of increased oxidation catalysis strength.

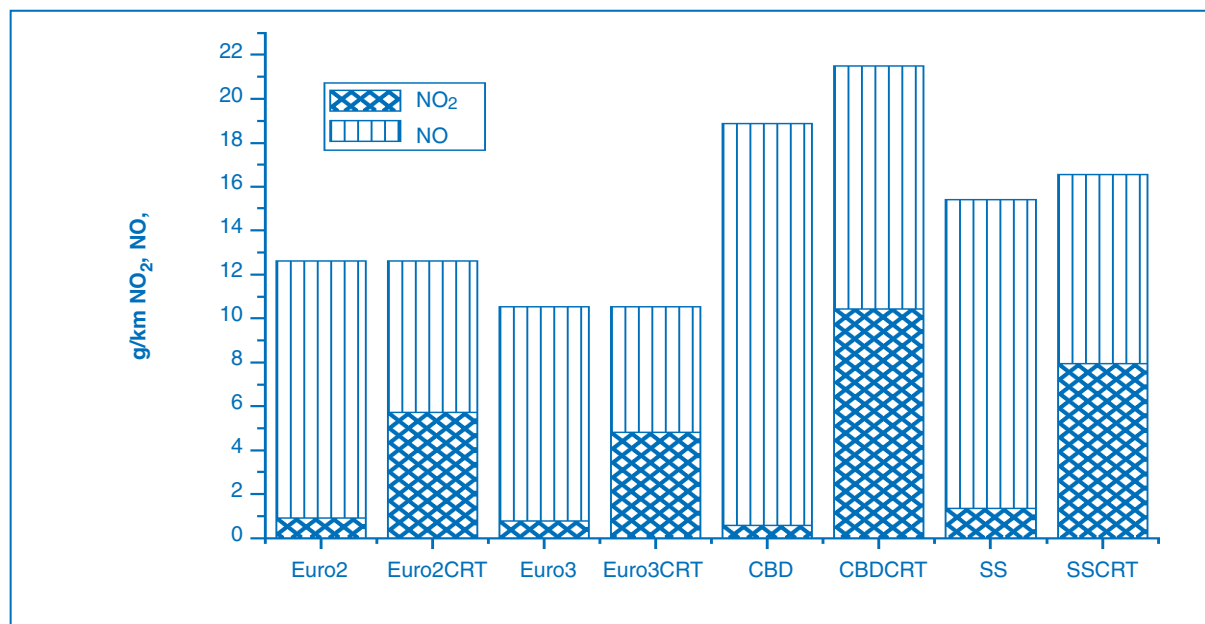


Figure 5.

Impact de la norme et du système de post-traitement par catalyse d'oxydation et filtre à particules (CRT) sur des moteurs de bus (transports en commun urbains) en Europe (Euro2 et Euro3) (données IFEU 2004) et aux USA (cycles CBD et SS) d'après Ayala *et al.* (2002) sur les émissions d'oxydes d'azote. Il est important de noter que pour chaque type de norme, l'adjonction d'un CRT ne modifie pas les émissions de NO_x totaux, mais par contre induit une forte élévation des émissions de NO₂. L'adjonction d'un CRT provoque une importante augmentation du rapport NO₂/NO_x. La comparaison des émissions de NO₂ exprimées en g/km montre qu'un bus Euro3CRT émet 30 fois plus de NO₂ qu'un véhicule léger de type Euro3D avec un ratio NO₂/NO_x équivalent.

Impact of regulation and after-treatment devices (CRT) on heavy duty Diesel engines (urban buses) in Europe (data IFEU 2004) and in the USA (CBD and SS driving cycles) (Ayala *et al.* 2002) on nitrogen oxide emissions.

It is important to notice that total NO_x emissions are barely affected by CRT after treatment. However with CRT, NO₂ emissions greatly enhanced. On a mass/km basis, a Euro3 CRT equipped city bus appears to be ca. 30 times higher emitter than a medium class Euro3 complying personal car with a similar NO₂/NO_x ratio.

3. Développements toxicologiques expérimentaux

C'est dans cet esprit que différents travaux ont été réalisés depuis six ans au sein de notre groupe de recherche (INSERM U644/CERTAM) concernant l'approche globale des aérosols d'émissions de moteurs à combustion interne. Ces travaux ont permis de montrer que le système d'exposition des cibles biologiques développé était fiable et reproductible, tant pour les polluants particuliers que pour les polluants gazeux [Morin *et al.* 1999, Bion *et al.* 2002]. En effet, il existe une bonne corrélation entre les facteurs de dilutions imposés par le système d'échantillonnage et les concentrations de CO et de

particules mesurées en aval des chambres d'exposition. Par ailleurs, les résultats de cytotoxicité montrent que la culture organotypique en chambre d'exposition n'entraîne aucune modification du taux d'ATP intracellulaire par rapport à des conditions de mise en culture classiques (incubateur).

Le modèle d'exposition et les outils d'évaluation toxicologique ayant été caractérisés, nous avons, dans le cadre du programme Européen MAAPHRI (*Multidisciplinary Approaches to Airborne Pollutant Health Related Issues*), réalisé une étude visant à établir le profil de réponse toxicologique à l'exposition aux émissions d'un moteur Diesel exploité dans différentes conditions de carburant (teneur en soufre), de vitesse de rotation, de charge, et en présence ou non

Tableau 1.

Mesures des polluants et de l'impact toxicologique d'émissions issues d'un moteur de cylindrée 2 l, injection directe, common rail, intercooled conforme à la norme Euro3. Carburant soufré 50 ppm. Oxycat = catalyseur d'oxydation, FAP = filtre à particules carbure de silicium placé en aval du catalyseur d'oxydation. Exploitation du moteur en conditions stabilisées.

ATP = marqueur de viabilité cellulaire ; GSH, Catalase, GPx, GST, SOD = mesure du stress oxydant et de l'activité de détoxication cellulaire ; TNFa = mesure de la réaction inflammatoire.

La situation la plus défavorable au plan de l'impact toxicologique est observée pour la catalyse d'oxydation seule pour laquelle l'impact oxydant est le plus fort tel que le montre le ratio NO_2/NO_x (> 70 %). Dans ces conditions la filtration de l'aérosol échantillonné ne permet pas de modifier l'impact toxicologique, attribuant donc la toxicité à la phase gazeuse de l'aérosol émis.

Il est intéressant de noter que, dans notre configuration, la présence du FAP permet de réduire le potentiel oxydant des émissions tracé par le ratio NO_2/NO_x de façon d'autant plus marquée que le FAP est plus chargé. Ceci est vraisemblablement lié à une oxydation partielle des particules contenues dans le FAP par le NO_2 produit par la catalyse d'oxydation. Cette réduction du potentiel oxydant de la phase gazeuse de l'émission se traduit par un impact toxique légèrement réduit.

Summary of regulated emissions and toxicological impacts of emissions from a 2 liters common rail direct injection intercooled Euro 3 Diesel engine. Fuel sulphur content 50 ppm, steady state run. Amont post-traitement = sampling before the after-treatment device, Aval Oxycat = sampling downstream oxycat, Aval Oxycat FAP = downstream oxycat + DPF in a CRT type configuration after mid max soot load.

ATP = tissue viability marker, GSH (glutathione), Catalase, GPx (glutathione peroxidase), SOD (Superoxide dismutase) are markers for oxidant stress defenses and injuries, TNFa = inflammation marker.

The worse situation is described for emissions sampled downstream the Oxycat with NO_2/NO_x ratio > 70%, and highest ROS transfer thus inducing the strongest tissular oxidant stress. Under these circumstances, sample line emission filtration did not modify the oxidant impact of the emission thus assigning the toxic potential to the gas phase and not to the particulate matter fraction.

Interestingly, when the DPF is partially loaded with soot a reduction of the oxidant potential is observed which is related to DPF soot loading extent. This is most presumably correlated to partial soot oxidation by NO_2 as a so called "CRT effect". This reduction in oxidant potential is related to decreased tissular injury.

	Physico-chimie des émissions					
	Amont Post-traitement		Aval Oxycat		Aval Oxycat FAP	
	T = 0	T = 3 h	T = 0	T = 3 h	T = 1 h	T = 3 h
CO	236	237	0	0	2	11
NO_x	214	232	247	260	208	231
NO	184	191	70	70	79	158
NO_2	30	40	181	188	129	73
NO_2/NO_x	14,0	17,4	73,2	72,3	62,0	31,6
T Ech°	334	336	334	336	332	335
ΔP mBar					50	78
U Bosch	2,05	2,05	2,0	2,0	ND	ND
Paramètres Toxicologiques						
ATP		↘		↘↘↘		↘↘
GSH		↘		↘↘↘		↘↘
Catalase		→		↗		→
GST		↗		↗		→
GPx		→		→		→
SOD		→		↘↘		↘↘
TNFa		→↗		↘↘		↘

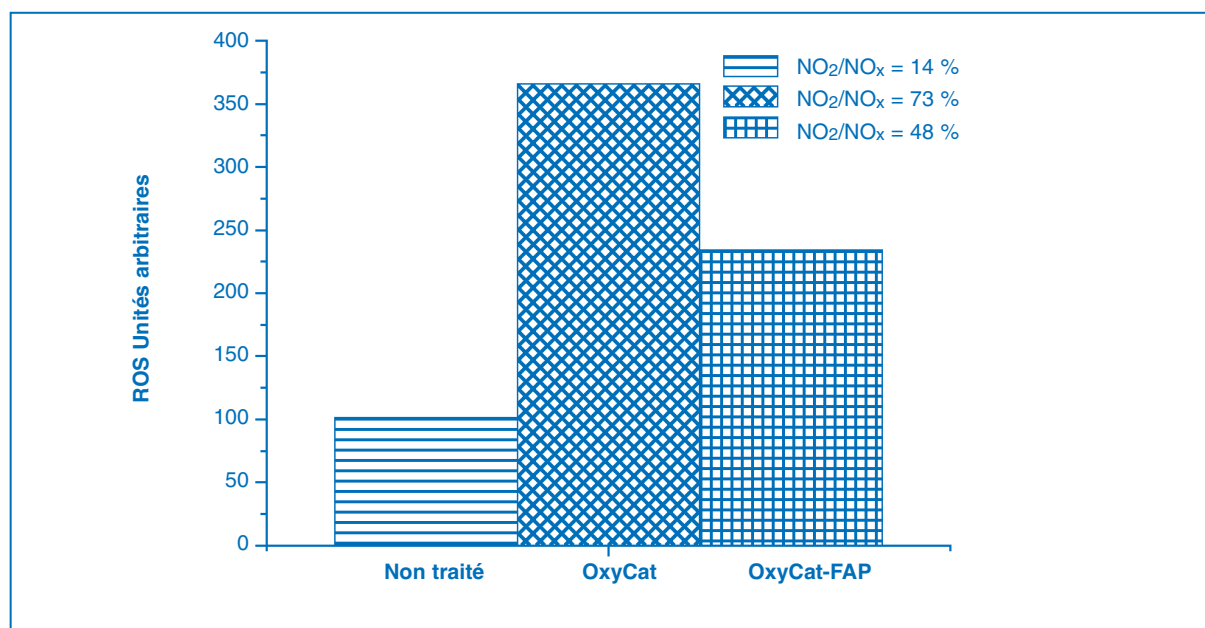


Figure 6.

Dosage des espèces réactives de l'oxygène, piégées à partir d'aérosols de combustion fraîchement générés, par résonance magnétique électronique ESR.

Moteur de cylindrée 2 l, injection directe, common rail, intercoolé conforme à la norme Euro3. Carburant soufré 0ppm.

Oxycat = catalyseur d'oxydation, FAP = filtre à particules carbure de silicium placé en aval du catalyseur d'oxydation.

Il n'est pas noté d'impact significatif sur les émissions de NO_x qui dans les conditions stabilisées au cours de ces expériences étaient de 245 ppm.

Reactive oxygen species assay by ESR from media exposed to diluted freshly emitted combustion aerosols issued from a 2 liters common rail direct injection intercooled Euro3 Diesel engine.

Fuel sulphur 0ppm, Oxycat = Diesel oxidation catalysis, FAP = Diesel particulate filter with 50% of max soot load.

It has not been noted any impact on total NO_x which in these experiments were 245 ppm.

High variations of NO₂/NO_x ratio are noticed which correlates well with reactive oxygen species amounts.

de systèmes de post-traitement. Ces différentes situations expérimentales, pour lesquelles le moteur était exploité en conditions stationnaires reproductibles, ont permis de faire varier de façon importante les propriétés physicochimiques de ces émissions, et par voie de conséquence le profil de la réponse toxique.

Cette étude (Tableau 1) a mis en évidence des profils de réponses biologiques distincts selon le caractère pro-oxydant de l'atmosphère à laquelle les échantillons pulmonaires sont soumis. Ainsi, les effluents moteurs pour lesquels le ratio NO₂/NO_x (pris comme traceur du caractère pro-oxydant) est faible (émissions non post-traitées), entraînent un stress oxydant associé à une réponse inflammatoire (production de TNFalpha et expression d'ICAM-1 augmentées) et à des dommages à l'ADN. La filtration des émissions sur la ligne d'échantillonnage permettait alors de réduire (stress oxydant) voire de supprimer (impact sur l'ADN) les effets observés, attribuant donc la majeure partie des effets observés à la phase particulaire. À l'opposé, les effluents moteur pour lesquels le ratio NO₂/NO_x est élevé (catalyse d'oxydation avec ou sans FAP) entraînent une perte de viabilité tissulaire et des dommages oxy-

datifs importants. Cet impact est plus modéré lors de la présence d'un FAP en aval du catalyseur d'oxydation qui semble, en conditions stabilisées, diminuer le potentiel oxydant des émissions d'une façon d'autant plus efficace que le FAP se charge de suies. Dans ces dernières situations, les effets n'étaient plus modulés par la filtration des émissions sur la ligne d'échantillonnage, incriminant ainsi la phase gazeuse des émissions comme étant responsable des effets observés. Ces résultats suggèrent que la nature oxydante des émissions moteur, caractérisée dans nos conditions expérimentales par le ratio NO₂/NO_x ou tout simplement le NO₂, pourrait être à l'origine des différences de profils biologiques obtenus.

Nous avons tout récemment développé une méthode de piégeage global des espèces réactives de l'oxygène (ROS) susceptibles d'être formées lors de l'interaction d'un aérosol de combustion avec un milieu liquide contenant un « spinprobe » (le CPH). Lorsque le CPH réagit avec une ROS il est transformé en CP* dont la fréquence de résonance magnétique change. Cette réaction est alors mesurée par ESR (*Electron Spin Resonance*). En utilisant cette technique, nous avons pu démontrer l'existence d'une étroite corrélation entre la quantité globale de

ROS mesurée et le contenu en NO₂ observé dans les émissions, confirmant ainsi le caractère fortement pro-oxydant de ces émissions à fort contenu en NO₂ (Figure 6). Dans un espoir de meilleure compréhension de ces phénomènes, nous tentons actuellement de développer des outils analytiques des espèces réactives de l'oxygène, de façon à affiner leur identification et leurs contributions respectives au potentiel oxydant global actuellement quantifié.

Nos résultats ont clairement montré que les modifications des paramètres biologiques étudiés peuvent être initiées par les particules Diesel, tel qu'il est fait mention dans la littérature [Vogel et Eltsner 1989], mais également par la phase gazeuse des émissions lors de l'élévation de son potentiel oxydant. Il est intéressant de noter que l'effet des particules n'a pu être observé qu'en présence d'émissions moteur présentant un très faible ratio NO₂/NO_x, montrant ainsi qu'une atmosphère très oxydante ne permet plus d'individualiser l'effet potentiel des particules Diesel de celui de la phase gazeuse des émissions, ce dernier devenant alors prépondérant. La réaction inflammatoire induite par les particules est connue pour provoquer un stress oxydant ; il semble que l'élévation du potentiel oxydant des émissions soit capable de shunter la cascade inflammatoire pour provoquer de façon directe un stress oxydant de plus forte amplitude que celui induit par les particules contenues dans l'aérosol de combustion. Nous avons pu reproduire une partie importante des effets décrits avec une exposition des cultures organotypiques au NO₂. L'état actuel de nos travaux ne permet pas d'incriminer le NO₂ comme seul responsable de ces effets. Par contre, nous considérons le NO₂, ou le ratio NO₂/NO_x comme traceurs du caractère pro-oxydant de l'émission et comme d'excellents marqueurs prospectifs de cet impact toxicologique, apportant ainsi un éclairage expérimental sur le rôle potentiel du NO₂ évoqué dans les études épidémiologiques les plus récentes [Von Klot *et al.* 2005, Samoli *et al.* 2006].

Dans le cadre du programme PRIMEQUAL, nos récents travaux développés *in vivo* après inhalation d'émissions diluées, confirment l'existence d'un stress oxydant systémique marqué, après post-traitement par catalyse d'oxydation. Ce stress oxydant se traduit par l'induction enzymatique de la SOD et de la GPx au niveau pulmonaire et cardiaque, ainsi que des

impacts marqués sur la survenue d'une variabilité de la fréquence cardiaque chez les rats sains et insuffisants cardiaques, ainsi que sur la survenue d'épisodes d'arythmies sévères chez les rats insuffisants cardiaques. Ces événements sont beaucoup plus sévères en aval qu'en amont de la catalyse d'oxydation.

4. Conclusion

En conclusion, nos travaux ont pu démontrer toute l'importance qu'il y aura à l'avenir d'étudier l'innocuité potentielle des stratégies de dépollution des émissions de moteurs Diesel et à ne pas s'attacher exclusivement à la réduction de l'impact de la fraction particulaire mais à prendre en compte les éventuelles modifications induites des impacts de la phase gazeuse des émissions. La prise en compte du « potentiel toxique » de la phase gazeuse par une approche globale de l'émission paraît désormais devenir un concept incontournable compte tenu de l'évolution attendue des techniques de post-traitement et de leur impact sur la chimie des émissions, particulièrement en ce qui concerne leur potentiel pro-oxydant. De notre expérience actuelle, il ressort que la diminution de la teneur en soufre du gazole et le renforcement de la catalyse d'oxydation sont les deux principales causes de l'augmentation du potentiel oxydant des émissions de moteurs Diesel. Ces deux stratégies sont actuellement incontournables pour atteindre les objectifs fixés par la réglementation sur les émissions de moteurs Diesel qui n'ont pas nécessairement anticipé la survenue de ces nouveaux types d'impacts biologiques aigus susceptibles de conduire à de nouveaux risques pour la santé humaine.

Remerciements

Ces travaux ont été réalisés avec le soutien financier de EC QLK4-CT62002-02357 MAAPHRI program, du programme Primequal/PRÉDIT (ADEME, Direction Générale de la Santé) et du Contrat de plan État-Région Haute-Normandie (Action TOPAASE : Toxicologie Pollution Atmosphérique Aérothermochimie Santé Environnement).

Mots clés

Émissions Diesel. NO₂. Pollution atmosphérique. Toxicité. Potentiel oxydant. Réglementation. Santé.

Keywords

Diesel emissions. NO₂. Airborne pollution. Toxicity. Oxidant potential. Regulation. Health.

Références

- Anderson HR, Spix C, Medina S, Schouten JP, Castellsague J, Rossi G, Zmirou D, Touloumi G, Wojtyniak B, Ponka A, Bacharova L, Schwartz J, Katsouyanni K. Air pollution and daily admissions for chronic obstructive pulmonary disease in 6 European cities : results from the APHEA project. *Eur Respir J* 1997 ; 10 (5) : 1064-71.
- Bion A. Évaluation de l'impact toxicologique d'effluents moteur sur des cultures organotypiques de tranches de poumon de rat (cas d'un moteur Diesel et d'un moteur à allumage commandé). Thèse de Doctorat de l'université de Rouen, avril 2003.
- Bion A, Fall M, Gouriou F, Le Prieur E, Dionnet F, Morin JP. Biphasic culture of rat lung slices for pharmacological evaluation of complex atmospheres. *Cell Biol Toxicol* 2002 ; 18 : 301-4.
- Brooks AL, Wolff RK, Royer RE, Clark CR, Sanchez A, McClellan RO. Deposition and biological availability of Diesel particles and their associated mutagenic chemicals. *Environ Int* 1981 ; 5 : 263-7.
- Brooks AL, Li AP, Dutcher JS, Clark CR, Rothenberg SJ, Kiyoura R, Bechtold WE, McClellan RO. A comparison of genotoxicity of automobile exhaust particles from laboratory and environmental sources. *Environ Mutagen* 1984 ; 6 : 651-68.
- Casto BC, Hatch CG, Huang SL. Mutagenic and carcinogenic potency of extracts of Diesel and related environmental emissions : in vitro mutagenesis and oncogenic transformation. *Environ Int* 1981 ; 5 : 403-9.
- Crebelli R, Conti L, Crochi B, Carere A, Bertoli C, Del Giacomo N. The effect of fuel composition on the mutagenesis of Diesel engine exhaust. *Mutat Res* 1995 ; 346 : 167-72.
- Hoek G, Brunekreef B, Goldbohm S, Fischer P, van den Brandt PA. Association between mortality and indicators of traffic-related air pollution in the Netherlands: a cohort study. *Lancet* 2002 ; 360 (9341) : 1203-9.
- Katsouyanni K, Touloumi G, Spix C, Schwartz J, Balducci F, Medina S, Rossi G, Wojtyniak B, Sunyer J, Bacharova L, Schouten JP, Ponka A, Anderson HR. Short term effects of ambient sulphur dioxide and particulate matter on mortality in 12 European cities : results from time series data from the APHEA project. *BMJ* 1997 ; 314 : 1658-63.
- Le Prieur E, Morin JP, Bion A, Dionnet F. Toxicity of Diesel engine exhaust : induction of pro-inflammatory response and apoptosis in an in vitro model of lung slices in bi-phasic organotypic culture. *Arch Toxicol* 2000 ; 74 : 460-6.
- Lewtas J. Evaluation of the mutagenesis and carcinogenicity of motor vehicle emissions in short-term bioassays. *Environ Health Perspect* 1983 ; 47 : 141-52.
- Mayer A *et al.* VERT : Diesel nano-particles emissions : properties and reduction strategies. SAE technical paper series, 1998 ; 980539 : 12 p.
- Morin JP, Fouquet F, Monteil C, Le Prieur E, Vaz E, Dionnet F. Development of a new in vitro system for continuous in vitro exposure of lung tissue to complex atmospheres : application to Diesel exhaust toxicology. *Cell Biol Toxicol* (1999a) 15 : 143-152.
- Morin JP, Le Prieur E, Dionnet F, Robin L. The influence of particulate trap of the in vitro lung toxicity response to continuous exposure to Diesel exhaust emission. *SAE Technical Paper* (1999b).
- Ohyama K, Ito T, Kanisawa M. The roles of diesel exhaust particle extracts and the promotive effects of NO₂ and/or SO₂ exposure on rat lung tumorigenesis. *Cancer Lett* 1999 ; 147 (1-2) : 229.
- Osier M, Oberdörster G. Intratracheal Inhalation vs Intratracheal Instillation : differences in particle effects. *Fundam Appl Toxicol* 1997 ; 40 : 200-27.
- Pope CA, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K, Thurston GD. Lung cancer, cardiopulmonary mortality and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA* 2002 ; 288 (7) : 830.
- Quenel P, Zmirou D, Medina S, Le Tertre A, Balducci F, Le Moullec Y, Ritter P, Barumandzadeh T, Dab W. Impact sur la santé de la pollution atmosphérique en milieu urbain : synthèse des résultats de l'étude APHEA (Air Pollution and Health : a European Approach). *Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire* 1998 ; 2.
- Samoli E, Aga E, Touloumi G, Nisiotis K, Forsberg B, Lefranc A, Pekkanen J, Wojtyniak B, Schindler C, Niciu E, Brunstein R, Dodic Fikfak M, Schwartz J, Katsouyanni K. Short-term effects of nitrogen dioxide on mortality : an analysis within the APHEA project. *Eur Respir J*, 15 mars 2006.
- Stone V, Shaw J, Brown DM, MacNee W, Faux SP, Donaldson K. 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.
- Vogl G, Elstner EF. Diesel soot particles catalyse the production of oxy-radicals. *Toxicol Letters* 1989 ; 47 : 17-23.
- Von Klot S, Peters A, Aalto P, Bellander T, Berglind N, D'Ippoliti D, Elosua R, Hormann A, Kulmala M, Lanki T, Lowel H, Pekkanen J, Picciotto S, Sunyer J, Forastiere F. Health effects of particles on susceptible sub-populations (HEAPSS) study Group. Ambient air pollution is associated with increased risk of hospital cardiac readmissions of myocardial infarction survivors in five European cities. *Circulation* 2005 ; 112 (20) : 3073-9. Erratum in : *Circulation* 2006 ; 113(5) : e71.
- Zmirou D. Approches épidémiologiques appliquées à la pollution de l'air. *Pollution atmosphérique* 1987 ; 23 : 155-62.