

Ce rapport final n'a pas reçu l'approbation du Conseil scientifique du programme  
PRIMEQUAL,  
les propos tenus n'engagent que son auteur

## PRIMEQUAL2/PREDIT 2004-2006

Impacts de l'Exposition par Inhalation d'Aérosols Complexes  
Contenant des Particules Ultra-Fines sur le cœur, le rein et le  
système reproducteur chez le Rat et le Cobaye Sains et  
Insuffisants Cardiaques Chroniques

*Utilisation d'émissions de moteurs à combustion interne modélisant la pollution  
atmosphérique urbaine*

Impacts of Inhaled Complex Aerosols containing ultra-fine  
particles on Heart Kidney and Reproduction Systems in Healthy  
and Chronic Cardiac Insufficient Rats and Guinea Pigs

*Use of internal combustion engine emissions as models of urban atmospheric  
pollution*

Dr Jean-Paul Morin                      INSERM U644



Dr Frédéric Dionnet                      CERTAM



Dr Ghislaine Lacroix                      INERIS



Coordinateur :  
Dr Jean-Paul Morin  
INSERM U644  
22 bd Gambetta  
76 183 ROUEN Cedex  
Tel 02 35 14 85 38  
Fax 02 35 14 83 65  
Mel [jean-paul.morin@univ-rouen.fr](mailto:jean-paul.morin@univ-rouen.fr)

Confidentialité : Non

Responsable ADEME : Hélène Desqueyroux

Financement DGS 80% Financement ADEME 20%

## Résumé :

Les rats et cobayes sains ou les rats rendus insuffisants cardiaques chroniques sont exposés à des émissions diluées de moteurs Diesel traitées ou non par catalyse d'oxydation, enrichies ou non avec certains polluants gazeux (NO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>). La fonction de reproduction est évaluée chez le rat par analyse des lignées spermatiques (CAST), la fonction rénale est évaluée chez le rat par la mesure de l'excrétion urinaire d'osmolytes, des activités enzymatiques de la GGT et de la NAG, de la protéinurie et une analyse anatomopathologique. L'électrophysiologie cardiaque a été analysée par télémétrie. Le stress oxydant systémique a été évalué par la mesure des activités anti-oxydantes pulmonaires, cardiaques, hépatiques et rénales, les concentrations plasmatiques d'isoprostanes. L'inflammation a été évaluée par la mesure du TNFalpha plasmatique.

Comparées aux émissions non post-traitées, les émissions traitées par catalyse d'oxydation ont induit un stress oxydant systémique important chez le rat (poumon, cœur, foie, rein), une élévation du TNFalpha, une diminution de la variabilité cardiaque chez le rat et le cobaye sains et chez le rat insuffisant cardiaque. Un impact pro-arythmique marqué est observé chez le rat insuffisant cardiaque chronique. Une augmentation de la durée du QT est observée chez le cobaye mais pas chez le rat lors de l'exposition aux émissions de combustion. Le NO<sub>2</sub> induit par la catalyse d'oxydation apparaît responsable d'une part importante de ces effets. La filtration des émissions catalysées ne modifie pas leur potentiel toxique reflétant un impact mineur des particules dans le potentiel toxique pro-oxydant des émissions catalysées. Il n'a pas été d'impact significatif sur la fonction rénale ni sur la fonction de reproduction.

## Summary :

Healthy rats and guinea pigs and Chronic heart failure rats were exposed to diluted Diesel engine emissions, with or without oxidation catalytic after-treatment, doped or not with gaseous pollutants (NO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>). Reproductive function was evaluated by spermatic line counts (CAST), renal function was evaluated by the assessment of urinary excretion of osmolytes, GGT, NAG activities, proteinuria and kidney pathologic examinations. Systemic oxidant stress was assessed by measuring the tissular levels of anti-oxidant enzymes (lung, heart, liver and kidney) and assay of isoprostane plasma concentrations.

Compared to untreated emissions, emissions treated with oxidation catalysis induced a marked systemic oxidative stress (lung, heart, liver and kidney), increased TNFalpha plasma levels, and decreased heart rate variability in healthy rats and guinea pigs. Beside these changes also occurring in chronic heart failure rats, a marked pro-arrhythmic impact was observed in chronic heart failure rats, increased QT segment duration was observed in guinea pigs but not in rats. The NO<sub>2</sub> concentration rise induced by oxidation catalysis appears as the most significant candidate for triggering the increased oxidant stress cardiac deleterious impacts. Filtration of oxycat treated emissions did not modify the toxic potential thus pointing out to a minor impact of particulate matter compared to the oxidant potential of the emissions in triggering the toxic insults. No significant impacts have been evidenced on renal nor reproductive functions.

Mots Clés : Emissions Diesel, Inhalation, Rein, Cœur, Reproduction, NO<sub>2</sub>, catalyse oxydation, stress oxydant, inflammation, télémétrie, arythmies cardiaques

Key words : Diesel emissions, Inhalation, Kidney, Heart, Reproduction, NO<sub>2</sub>, oxidation catalysis, oxidative stress, telemetry, heart arrhythmia

## Resumé des conclusions

### Impact des émissions de moteurs Diesel sur la fonction rénale :

Il n'a pas été observé de modification fonctionnelle rénale dans les conditions expérimentales utilisées au cours de notre étude.

Aucune modification de la filtration glomérulaire, de la protéinurie, de l'excrétion urinaire de la NAG et de la GGT, de l'excrétion urinaire des osmolytes n'ont pu être mises en évidence.

L'examen histopathologique n'a pas permis de déceler d'atteinte morphologique de la structure rénale, ni des membranes basales rénales.

La crainte évoquée en hypothèse pour se travail d'observer la survenue d'un syndrome de Goodpasture n'a donc pas été mise en évidence au cours de cette étude approfondie.

### Impact des émissions de moteurs Diesel sur la fonction de reproduction :

Il n'a pas été observé de modification sur la fonction de reproduction

### Impact des émissions de moteurs Diesel sur le stress oxydant systémique :

Un stress oxydant systémique est observé après exposition aux émissions de moteurs Diesel. Ce stress oxydant est mis en évidence par l'adaptation des défenses anti-oxydantes tissulaires en réaction à l'exposition aux émissions diluées. Ces réactions ne sont pas restreintes au tissu pulmonaire, mais ont été clairement retrouvées au niveau cardiaque, hépatique et rénal.

L'adaptation des défenses anti-oxydantes a permis de prendre en charge de façon globalement satisfaisante le stress oxydant périphérique puisqu'il n'est pas observé de modification des concentrations circulantes d'isoprostane.

La condition expérimentale la plus délétère a été observée avec les émissions traitées par catalyse d'oxydation que les émissions soient filtrées ou non. Ces résultats sont corroborés par les études menées par résonance paramagnétique électronique menées par ailleurs dans le laboratoire, qui montrent très clairement que le potentiel oxydant des émissions de moteur Diesel traitées par catalyse d'oxydation est très nettement supérieur à celui observé en présence de NO<sub>2</sub>, eux mêmes supérieur à celui des émissions non post-traitées.

### Impact des émissions de moteurs Diesel sur la fonction cardiaque :

#### Développement de modèles d'insuffisance cardiaque chez une espèce alternative au rat :

Il ne nous a pas été possible d'induire une insuffisance cardiaque significative chez le cobaye par les techniques usuelles mises au point chez le rat telles que la ligature coronaire ou la cryoscopie de la paroi ventriculaire gauche.

Chez le hamster, la ligature coronaire s'est avérée très délétère et n'a pas permis d'obtenir une survie quantitativement suffisante pour permettre l'installation d'une insuffisance cardiaque chronique reproductible.

En ce qui concerne l'exploration du segment QT, les inconvénients de la mauvaise adaptabilité du QT à la fréquence cardiaque chez le rat sont retrouvés chez le hamster, alors que le cobaye se rapproche de l'homme pour cette adaptabilité, ce qui indiquait un intérêt de cette espèce pour ce paramètre.

Nous n'avons donc pas pu utiliser un modèle d'insuffisance cardiaque chronique chez le rongeur en alternative à l'espèce rat, chez une espèce adaptant la durée de l'intervalle QT par rapport à celle de l'intervalle RR.

L'exposition de cobayes sains aux émissions de moteur Diesel non post-traitées induit une augmentation de la durée de l'intervalle QT. Ce point est un pronostic défavorable pour la fonction cardiaque. (pour mémoire, une élévation de la durée de l'intervalle QT lors des études de pharmacologie de sécurité du médicament est le plus souvent une cause d'arrêt de développement)

De même que chez le rat, les expositions de cobayes sains aux émissions diluées de moteur Diesel non post traité ont induit une diminution de la variabilité cardiaque, RMSSD et HRV

index. Une telle réduction est également observée chez le rat sain et insuffisant cardiaque et a été rapportée chez l'homme dans plusieurs études expérimentales et épidémiologiques.

Alors que l'exposition des rats sains n'induit pas significativement de phénomènes arythmiques, l'exposition de rats insuffisants cardiaques induit une augmentation précoce du nombre d'extrasystoles ventriculaires, il n'est peu ou pas observé d'évènements arythmiques d'origine supra-ventriculaires. Les troubles observés avec les émissions non post traitées sont essentiellement d'origine ventriculaire. L'exposition répétée a conduit chez certains animaux insuffisants cardiaques à la survenue d'épisodes de bigéminie et de tachy-arythmies ventriculaires.

Le développement et la mise en œuvre de l'approche par dynamique symbolique sur les séries temporelles de RR a permis la quantification automatisée de ces épisodes, tant pour leur fréquence que pour leur durée, et a permis une approche rigoureuse des paramètres de variabilité cardiaque sur des séries importantes de battements (de l'ordre de 60 000 battements consécutifs pour chaque animal exposé pour une période de 3 heures. Ceci confère à nos travaux un poids statistique important dans l'évaluation des fréquences de survenue des troubles observés.

En ce qui concerne les émissions de moteurs Diesel traitées par catalyse d'oxydation, le profil de la réponse cardiaque montre un impact beaucoup plus délétère que pour les émissions non post-traitées. Une importante bradycardie est observée tant chez le rat sain que chez le rat insuffisant cardiaque, conduisant à une élévation des paramètres de variabilité (RMSSD, SDNN). Cette élévation de variabilité ne saurait être considérée comme un paramètre positif, car elle est accompagnée, et/ou secondaire chez le rat insuffisant cardiaque à de nombreux épisodes brady-arythmiques le plus souvent d'origine supra-ventriculaire, dénotant d'un dysfonctionnement vraisemblable du pacemaker auriculaire suite à une atteinte de l'énergétique cellulaire. Nous avons observé une similitude de profil de réponse électrophysiologique entre les émissions traitées par catalyse d'oxydation et des travaux mettant en jeu l'administration de roténone (inhibiteur du complexe I mitochondrial). Ces observations nous conduisent à avancer l'hypothèse d'un découplage de la chaîne respiratoire mitochondriale lors de l'exposition aux émissions de moteurs Diesel traitées par catalyse d'oxydation.

Les travaux menés avec le NO<sub>2</sub> et l'ozone, deux substances gazeuses connues pour leur potentiel oxydant et irritant, montrent un profil de réponse analogue, avec survenue d'une bradycardie tant chez le rat sain que chez le rat insuffisant cardiaque. Les troubles brady-arythmiques sont cependant moins marqués après exposition à l'ozone ou au NO<sub>2</sub> en tant que gaz purs dilués dans l'air, qu'après exposition aux émissions de moteurs Diesel traitées par catalyse d'oxydation. Cependant cette similitude d'impact laisse à penser que le profil de la réponse cardiaque observée semble avoir comme point commun l'intensité du potentiel oxydant de l'atmosphère inhalée.

L'étude réalisée avec le NO<sub>2</sub> dans l'Air et les émissions dopées au NO<sub>2</sub> montre qu'il est possible de reproduire au moins partiellement la variation du profil de la réponse cardiaque liée à la catalyse d'oxydation avec le NO<sub>2</sub> gaz. Nous rappellerons ici qu'au plan analytique, la catalyse d'oxydation modifie de façon importante le ratio NO<sub>2</sub>/NO<sub>x</sub> sans modifier les émissions de NO<sub>x</sub>, et que nous avons pu par ailleurs montrer une étroite corrélation entre potentiel oxydant des émissions, concentration en NO<sub>2</sub> et potentiel toxique pulmonaire. Il semble que même si la totalité de la réponse cardiaque ne saurait être imputée au seul NO<sub>2</sub>, celui ci soit un contributeur important à la variation du profil de la réponse cardiaque observée entre émissions non post-traitées et émissions traitées par catalyse d'oxydation.

#### RECOMMANDATIONS :

Au vu des résultats décrits ci dessus et compte tenu de l'impact potentiel de certains systèmes de post-traitement des émissions (en particulier le catalyseur d'oxydation), nous insistons sur toute l'importance qu'il y aura à l'avenir de mettre en œuvre l'étude de l'innocuité potentielle des stratégies de dépollution des émissions de moteurs Diesel et de ne pas s'attacher qu'exclusivement à la réduction quelques polluants réglementés. La prise en

compte du « potentiel toxique » de l'aérosol émis 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 (résultats programme MAAPHRI), 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 moteur Diesel. La prospective annoncée bien que non encore décidée laisse prévoir une aggravation du potentiel oxydant et des émissions de NO<sub>2</sub> des moteurs Diesel auxquelles les européens seront fortement exposés dans la circulation automobile au cours des dix à quinze prochaines années en attendant l'éventuelle succès des recherches menées sur l'élimination des oxydes d'azote émis par les véhicules légers.

Comme nous avons pu le montrer ci-dessus pour la catalyse d'oxydation, ces stratégies de dépollution (catalyse d'oxydation, stratégies de régénération des FAP, DéNO<sub>x</sub>) risquent donc de conduire à une modification importante de la typologie des immissions et par là même à la survenue de nouveaux impacts sanitaires cardiorespiratoires aigus, liés aux propriétés très oxydantes de ces nouvelles émissions, rendues nécessaires par l'évolution de la réglementation « Euro », impacts qu'il conviendra de faire prendre en considération par une meilleure information des autorités sanitaires et réglementaires sur ces questions.

L'évolution à la hausse des concentrations atmosphériques de NO<sub>2</sub> en proximité du trafic automobile dans les grandes cités européennes est une observation préoccupante dont on peut prévoir la poursuite de l'aggravation compte tenu de l'évolution attendue des émissions du parc Diesel européen, actuellement 75% des véhicules légers neufs immatriculés sont des véhicules à motorisation Diesel. De plus, la question du traitement par catalyse d'oxydation des émissions de moteurs de camions ou d'autobus fortement émetteurs de NO<sub>x</sub> se pose actuellement. Son impact en termes de production de NO<sub>2</sub> primaire risque d'être important en fonction des choix technologiques effectués et d'aggraver ainsi les conséquences sanitaires liées au NO<sub>2</sub> de proximité du trafic routier.

## Valorisation :

## PUBLICATIONS

MORIN JP, PRETERRE D, LORIOT S, HASSON V, DIONNET F. Des particules au NO<sub>2</sub> comme effecteur toxique principal des émissions de moteurs Diesel, un problème lié à l'évolution des réglementations Euro successives. *Pollution Atmosphérique* 2006, 191 : 327-336.

ANSELME F, LORIOT S, HENRY JP, DIONNET F, NAPOLEONI JG, THUILLEZ C, MORIN JP. Inhalation of diluted Diesel engine emission impact on heart rate variability and arrhythmia occurrence in a rat model of chronic ischemic heart failure. *Archives Toxicology* 2007, 81 : 299-307

Deux articles scientifiques originaux en préparation

## CONGRES INTERNATIONAUX

MORIN JP, LORIOT S, ANSELME F, CHAGRAOUI A, HENRY JP, DIONNET F, THUILLEZ C. Electrocardiographic changes during exposure to diluted engine emissions in a rat model of myocardial infarction (MI). Society of Toxicology Baltimore MA march 21-25 2004.

MORIN JP, Diesel Emission Induced Lung Toxicity Responses NO<sub>2</sub>/NO<sub>x</sub> ratio versus Particulate Matter. 8<sup>th</sup> International ETH conference on nanoparticle measurement. Zurich August 2004.

MORIN JP, BION A, KERAVEC V, DIONNET F High NO<sub>2</sub>/NO<sub>x</sub> ratio in Diesel engine emission aerosol may represent a more important trigger than particulate matter for lung tissue. Society of Toxicology, New Orleans March 2005

MORIN JP, *Pro-Oxidant Impacts of Diesel Engine Emissions according to Fuel and After-treatment Strategies* 9<sup>th</sup> International ETH conference on nanoparticle measurement. Zurich August 2005.

MORIN JP, PRETERRE D, ISABELLE M, BION A, FALL M and DIONNET F. Pro-Oxidant Impact of Diesel engine emissions according to fuel and after-treatment strategies. *In vitro* and *in vivo* evidences for new potential Health Concerns. Society of Toxicology, San Diego March 2006

MORIN JP, From Particulates to NO<sub>2</sub> as health concern triggers from Diesel engine emissions. A link with emission after-treatment strategies. 10<sup>th</sup> International ETH conference on nanoparticle measurement. Zurich August 2006

MORIN JP, LORIOT S, PRETERRE D, HENRY JP, DIONNET F Bradyarrhythmia induced by oxidant atmosphere inhalation in conscious rats. Society of Toxicology, Charlotte March 2007.

These de Doctorat Université de Rouen

Stéphane LORIOT soutenue le 11 décembre 2007

1	OBJECIFS ET METHODOLOGIE .....	9
1.1	Objectif général .....	9
1.2	<b>Production et caractérisation des atmosphères complexes :</b> .....	9
1.3	Réalisation et caractérisation du banc de production de polluants.....	10
1.4	<b>Modèles biologiques, protocoles et paramètres évalués :</b> .....	13
1.5	Calendrier de réalisation.....	20
2	Résultats .....	22
2.1	Conditions Expérimentales .....	22
2.1.1	Etude A sur émissions de moteur monocylindre.....	22
2.1.2	Etude B sur émissions de moteur type Euro3 chez le rat sain : .....	27
2.2	ETUDES FONCTIONNELLES RENALES .....	39
2.3	IMPACT SUR LA FONCTION DE REPRODUCTION .....	41
2.3.1	Protocoles d'exposition des animaux .....	41
2.3.2	Etude des caractéristiques spermatisques .....	43
2.3.3	Résultats .....	44
2.4	ETUDES DE L'ELECTROPHYSIOLOGIE CARDIAQUE : .....	48
2.4.1	Les émissions non post-traitées sur la ligne d'échappement... <b>Erreur ! Signet non défini.</b>	
2.4.2	Mise en place et caractérisation de l'insuffisance cardiaque chronique chez le cobaye 48	
2.4.3	Implantation des capteurs téléométriques .....	48
2.4.4	Logiciels acquisitions/ analyses .....	49
2.4.4.1	Analyses ECG .....	49
2.4.4.2	Première méthode : Distribution des intervalles RR .....	60
2.4.4.3	Deuxième méthode : Distribution des intervalles RR filtrés.....	62
2.4.4.4	Troisième méthode : Différences entre les intervalles $RR_{n-1}$ , $RR_n$ et $RR_{n+1}$ 63	
2.4.4.5	La bonne méthode ? .....	74
2.4.5	Analyses statistiques .....	77
2.4.6	Paramètres ECG suivis : RR, QT, SDNN, RMSSD, HRV triangle index .....	78
2.5	RESULTATS ELECTROPHYSIOLOGIE.....	78
2.5.1	Les émissions non post-traitées.....	78
2.5.1.1	Variabilité de la fréquence cardiaque chez le rat .....	78
2.5.1.2	Résultats Test Signe – Rats Sains .....	84
2.5.1.3	Résultats Test Signe – Rats rendus insuffisants cardiaques par ligature coronaire 87	
2.5.2	RR.....	87
2.5.3	RR.....	88
2.5.3.1	Résultats Test Signe – Cobayes .....	88
2.5.4	RR.....	89
2.5.5	RR.....	89
2.6	INFLUENCE DES SYSTEMES DE POST-TRAITEMENT SUR L'ECG Rats Sains et Insuffisants Cardiaques Deuxième campagne d'exposition (2006) .....	91
2.6.1	La Catalyse d'oxydation et le rôle potentiel du NO2 dans les effets de la catalyse d'oxydation .....	91
2.6.2	Résultats ECG .....	106
2.7	CINETIQUE DE L'IMPACT DE L'INHALATION DE SUBSTANCES GAZEUSES OXYDANTES .....	112
2.7.1	Les émissions Diesel Catalysées .....	112
2.7.1.1	rats MI .....	112
2.7.1.2	rats Sains .....	112
2.7.2	Le NO2.....	113

2.7.3	L'ozone.....	115
2.7.3.1	4 ppm.....	115
-	Paramètres HRV.....	115
2.7.3.2	Ozone 2ppm .....	117
3	CONCLUSIONS :.....	120
4	RECOMMANDATIONS.....	125

1

## OBJECIFS ET METHODOLOGIE

### 1.1 OBJECTIF GENERAL

Mise en œuvre d'exposition par inhalation de rats et de cobayes à des atmosphères complexes reproductibles (phase gazeuse plus phase particulaire) modélisant la pollution atmosphérique urbaine en vue de l'évaluation de leur impact sur les fonctions cardiaques, rénales et reproductrices. La complémentarité des savoir faire des équipes réunies dans ce programme permet de rationaliser au mieux l'exploitation des animaux en termes d'explorations fonctionnelles et biologiques et ainsi d'optimiser la notion de coût/données produites au sein de notre expérimentation.

### **1.2 PRODUCTION ET CARACTERISATION DES ATMOSPHERES COMPLEXES :**

Dans la phase initiale de ce programme, la production d'émissions diluées de moteur à combustion interne a été utilisée. La qualité de ces atmosphères a été modulée par l'utilisation de filtres en ligne de type monolithe céramique en carbure de silicium d'efficacité supérieure à 99% sur la plage de distribution granulométrique considérée (retrait des particules ultrafines et préservation de la phase gazeuse), Cette approche permet d'évaluer les contributions respectives de la phase gazeuse et de la phase particulaire sur les fonctions cardiaques et rénales.

La mise en œuvre d'un banc de production d'aérosols complexes a été réalisée par la production d'échappements provenant d'un moteur Diesel auxquels viennent s'ajouter des injections de gaz. Nous avons travaillé sur l'adjonction de NO<sub>2</sub> ainsi que d'ozone produit par un ozoniseur, de façon à caractériser l'impact d'atmosphères très oxydantes sur les fonctions pulmonaires, cardiaques.

Les proportions de gaz émis ainsi que les taux de dilution sont pilotés par régulateurs de débit massiques et permettent d'assurer la meilleure reproductibilité possible de la composition d'une expérimentation à l'autre. Ce système permet de réaliser un mélange complexe dilué à l'air filtré qui

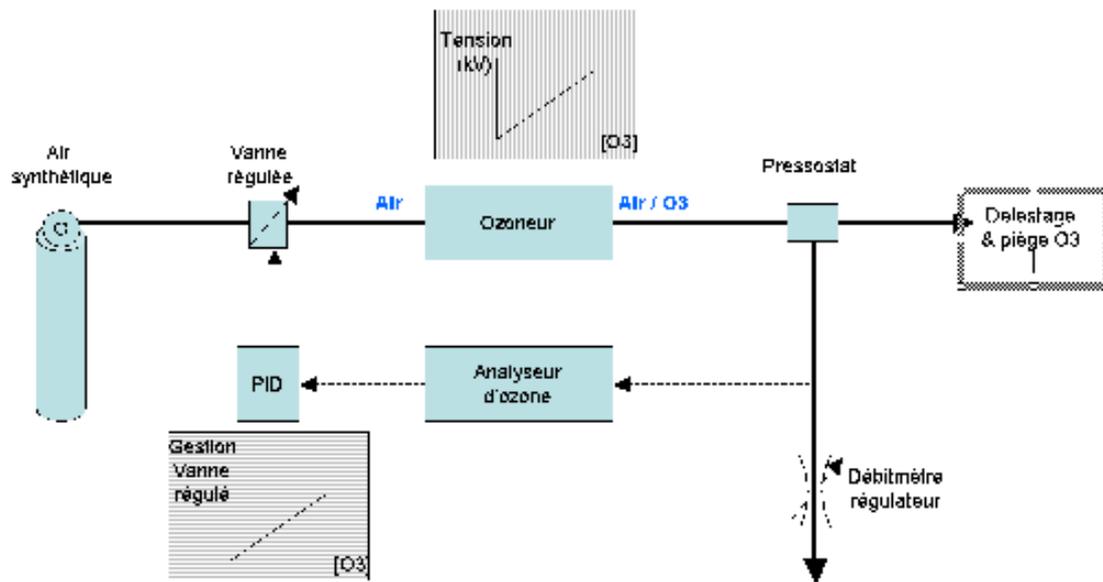
permet de simuler les potentialisations et les interactions des différents produits dans leur action sur le système cardiorespiratoire et rénal. Les teneurs en polluants sont contrôlées par analyseurs de CO (Testo , CO<sub>2</sub> COSMA, NO, NO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub> (ENVIRONNEMENT SA) et hydrocarbures imbrûlés (COSMA). La répartition granulométrique des particules ainsi que leur nombre sont également déterminés par SMPS (Scanning mobility particle sizer 0.01 µm O .7µm) et ELPI.(electrical low pressure impactor 0.02µm 10 µm). La masse de particules est déterminée à partir de la mesure d'Indice de Fumées Bosch AVL415). Ce système permet de balayer différents taux de dilution (1/10 à 1/1000) afin d'établir des fonctions dose/réponse. Un système de filtration des particules en suspension est utilisé afin d'éliminer les particules du flux gazeux pour étudier de façon différentielle l'impact de la fraction particulaire.

Enfin, par le jeu des réglages de ce banc, nous avons pu travailler à caractériser l'impact du NO<sub>2</sub>, polluant devenu très préoccupant depuis les récentes observations des AASQA montrant que malgré la réduction des NO<sub>x</sub> émis, les concentrations urbaines en NO<sub>2</sub> sont en stagnation ou en augmentation, très vraisemblablement à cause de l'évolution des ratio NO<sub>2</sub>/NO<sub>x</sub> liée à l'utilisation de certains dispositifs de post-traitement des émissions Diesel (catalyse d'oxydation par métaux précieux tel que le platine). Nous avons donc travaillé sur la toxicologie des émissions primaires en fonction de leur modulation qualitative et quantitative, voulant en cela apporter une contribution au débat sur l'impact toxicologique des atmosphères potentiellement inhalées en grande proximité du trafic routier.

### 1.3 REALISATION ET CARACTERISATION DU BANC DE PRODUCTION DE POLLUANTS

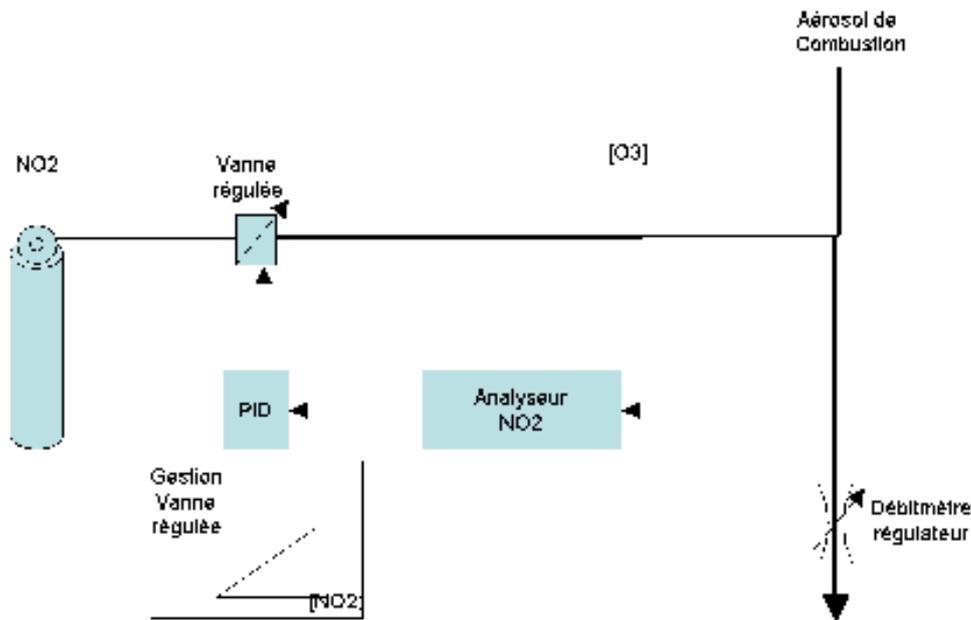
Le But de ce banc de polluant est de pouvoir de façon contrôlée et reproductible procéder à l'adjonction de polluants gazeux primaires tels que NO<sub>2</sub> ou SO<sub>2</sub> et secondaire tel que l'ozone, à des émissions diluées de moteur à combustion de façon à mieux modéliser la pollution atmosphérique urbaine.

Les deux schémas ci-dessous montrent la stratégie mise en œuvre pour ces expérimentations



### Gestion de l'adjonction contrôlée d'O<sub>3</sub>

La production d'ozone est assurée par un ozoneur sur lequel nous pouvons agir d'une part sur le débit d'air d'alimentation et d'autre part sur la tension de décharge de façon à réguler les quantités produites. Un analyseur d'ozone permet de contrôler de façon effective la concentration d'ozone dans l'aérosol produit, cet analyseur est couplé à un régulateur pilotant la vanne d'admission d'air dans l'ozoneur et ainsi de réguler finement la quantité d'ozone produite.



### = Gestion de l'adjonction contrôlée de NO<sub>2</sub> =

En ce qui concerne l'adjonction de NO<sub>2</sub> ou de SO<sub>2</sub>, ces polluants sont délivrés à partir de bouteilles contenant le gaz synthétique. Des analyseurs environnementaux de NO<sub>2</sub> et de SO<sub>2</sub> sont placés sur la ligne en aval de l'échantillonnage d'aérosol et couplés à un régulateur pilotant une vanne proportionnelle déterminant ainsi l'adjonction régulée de ces polluants gazeux dans les émissions.

Ces systèmes ont été testés individuellement pour chaque polluant au cours du deuxième semestre 2005. L'intégration du système a été réalisée au cours de la deuxième année du programme, préalablement à la deuxième campagne d'exposition en vue des études de stress oxydant systémique et d'électrophysiologie cardiaque. Le développement du monitoring des polluants et du contrôle de leur concentration au cours du temps a été réalisé sous l'environnement LabView qui permet l'acquisition des données de chaque composant et leur pilotage centralisé depuis un PC. L'ensemble du système a été utilisé pour la deuxième campagne d'expositions réalisée au printemps 2006 (émissions dopées NO<sub>2</sub>) et au

cours de l'été 2006 exposition à des polluants gazeux oxydants (NO<sub>2</sub> et Ozone).

#### **1.4 MODELES BIOLOGIQUES, PROTOCOLES ET PARAMETRES EVALUES :**

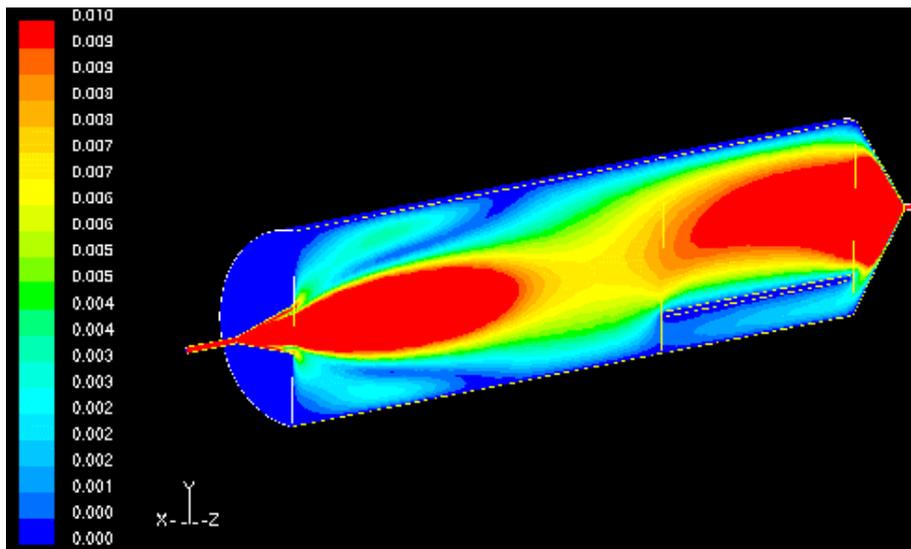
Les rats de souche Wistar d'un poids de 250g en début d'expérimentation sont utilisés pour cette étude. Ils ont libre accès à l'eau de boisson (eau du robinet) et à l'aliment A04 pour rats (UAR France) et sont entretenus dans une animalerie à une température de 21±1 °C avec une hygrométrie relative de 40 à 60% et un cycle lumineux de 12 heures par 24 heures. Les données historiques du laboratoire en terme de maîtrise de l'induction d'insuffisance cardiaque chronique par ligature coronaire sont parfaitement établies dans cette souche (Mulder et al. 2000, 2001, 2002).

Les cobayes d'un poids de 350g en début d'expérimentation sont aussi utilisés pour cette étude. En effet, chez cette espèce, le contrôle de la variabilité du rythme sinusal est très différent par rapport au rat, de plus une importante variabilité du QT en fonction du RR est observée chez le cobaye de façon analogue à l'homme, alors qu'elle est quasi-absente chez le rat.

L'étude comparative de la sensibilité de ces deux modèles animaux complémentaires permettra de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu lors de l'exposition par inhalation d'aérosols complexes contenant des particules ultra-fines.

Les animaux sont utilisés au minimum 2 mois après la réalisation de la ligature coronaire. Ils sont implantés avec les capteurs DSI- CTA-FT40 qui permettent l'enregistrement continu par télémétrie de l'ECG, de la température centrale et de l'activité motrice de rats vigiles et non contraints.

Des enceintes d'inhalation ont été spécifiquement conçues, réalisées et caractérisées dans le cadre du programme européen de recherche MAAPHRI, pour permettre l'inhalation d'aérosols complexes avec maintien des propriétés physicochimiques de la phase particulaire.



Modélisation sous FLUENT 3D : diagramme de Vitesse montrant une bonne homogénéité de distribution dans la zone de droite où sont hébergés les animaux pendant l'exposition par inhalation.



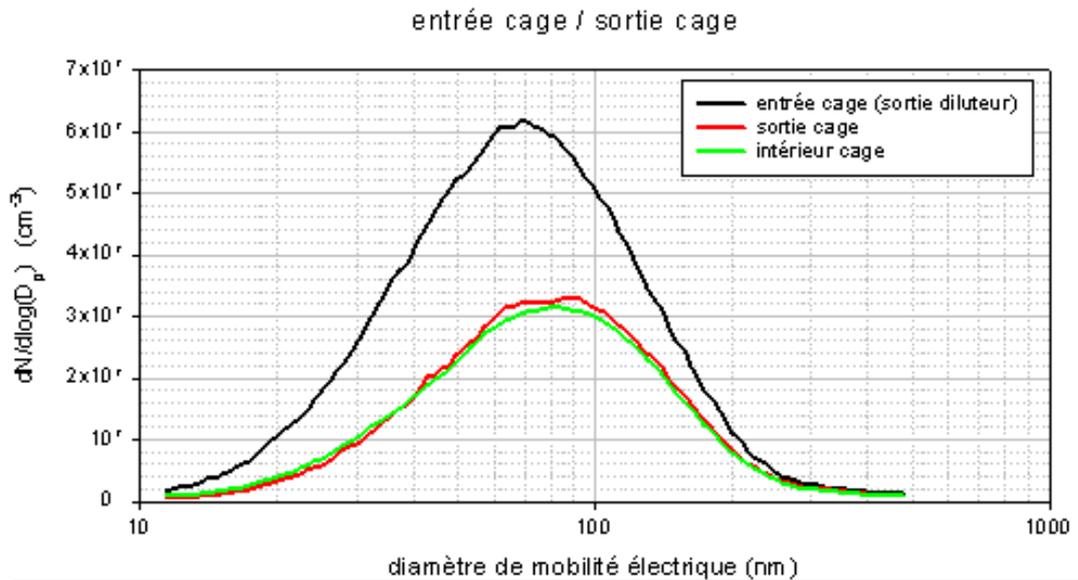
Enceinte individuelle d'inhalation pour animal vigile, non contraint.

Les rats sains et insuffisants cardiaques et les cobayes sains ont été exposés pour des périodes de 3 heures par jour à des émissions diluées 1/50 de moteur Diesel comme atmosphère modélisant la pollution atmosphérique urbaine. Ces concentrations sont adaptées pour mimer les expositions susceptibles de se produire dans la circulation automobile et plus particulièrement dans les conditions de roulage en milieux confinés tels que les tunnels (Morin et al. 2002, Gouriou et al. 2003).

Les signaux télémétriques sont enregistrés en continu pendant toute la durée de l'expérience.



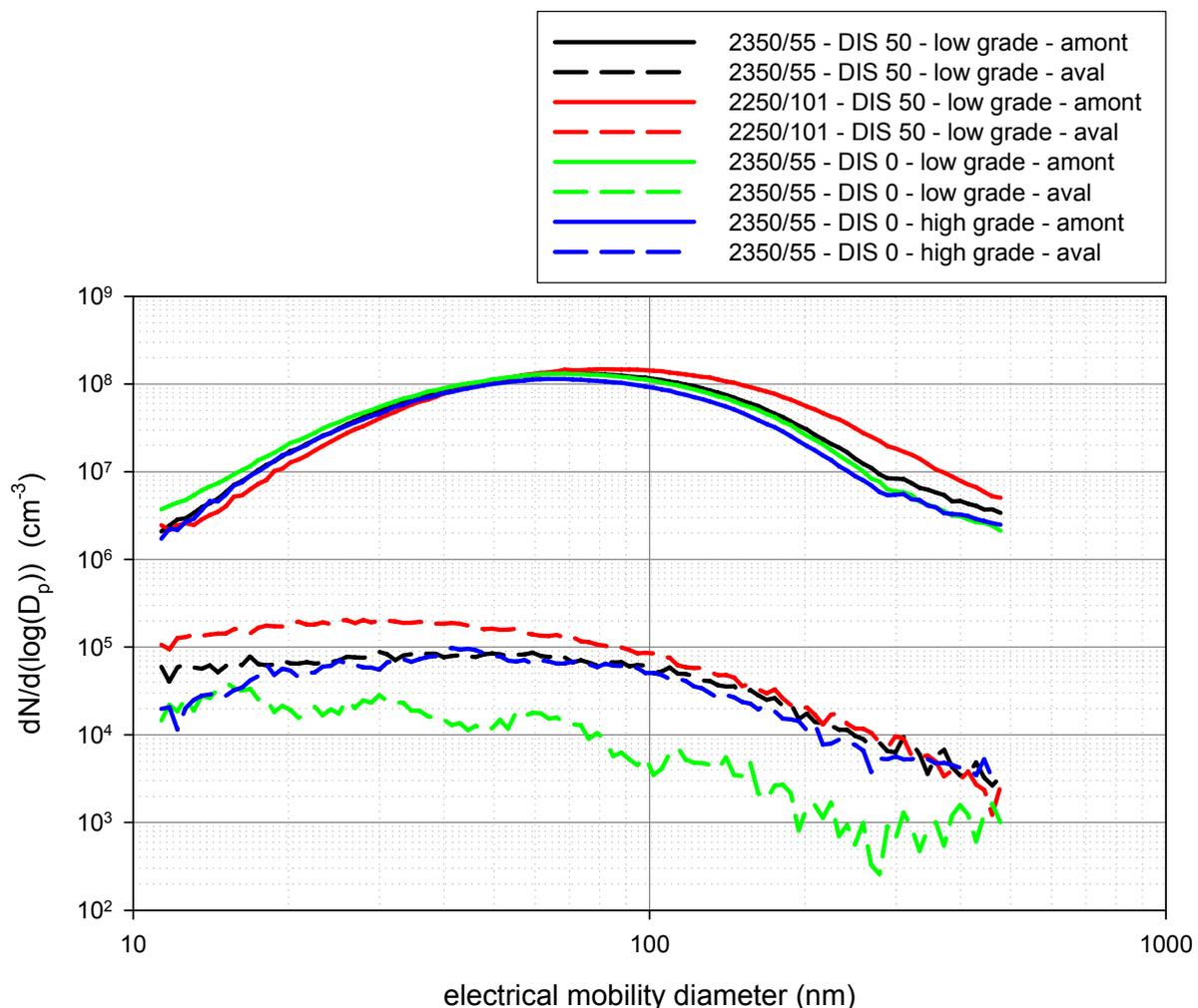
Dispositif de dilution et de conditionnement des émissions pour les études d'inhalation in vivo.



Le diagramme ci-dessus représente la distribution de taille des particules après dilution et transfert d'aérosols émis par les moteurs Diesel dans les cages d'exposition. Malgré un léger déplacement du mode de la courbe de distribution log normale vers la droite d'environ 10 nm (de 70 à 80 nm) lié au temps de résidence de l'aérosol dans les chambres d'exposition, ces courbes démontrent le maintien de la distribution de taille des particules

dans les aérosols inhalés par les rats. Il n'a pas été mis en évidence de variation de la taille des particules entre les émissions du moteur monocylindre et du moteur Euro3.

La vérification de l'efficacité du filtre à particules de type monolithe carbure de silicium volume 2,5l (Ibiden) utilisé soit sur la ligne de filtration soit en configuration ligne d'échappement : (données programme MAAPHRI) a été vérifiée pour des conditions d'exploitation moteur légèrement différentes de celles utilisées dans le cadre de cette étude. L'efficacité de ce type de filtre n'étant pas dépendante des conditions d'exploitation du moteur, il n'a pas été procédé à une nouvelle étude dans les conditions expérimentales utilisées dans la présente étude.



Les courbes présentées ci-dessus démontrent une efficacité du filtre égale ou supérieure à 99% sur l'ensemble de la distribution de taille des particules émises par les moteurs Diesel. Il n'a pas été observé de

différence d'efficacité que le filtre soit placé sur la ligne d'échappement ou sur la ligne de prélèvement (Données MAAPHRI).

### Exploitation des données électrocardiographiques

L'analyse des tracés ECG est réalisée initialement à l'aide du logiciel ECG-Auto (EMKA Technologies), logiciel basé sur des algorithmes de détection de formes, particulièrement adapté à l'analyse et à la quantification de phénomènes arythmiques. En effet, à l'aide de ce logiciel, nous sommes en mesure de quantifier la survenue d'extrasystoles polymorphes, d'épisodes de tachycardie ventriculaire soutenue ou non, d'épisodes de bigeminie que nous avons pu rencontrer dans nos études préliminaires (Morin et Lorient 2003). L'analyse battement par battement est privilégiée, de façon à permettre l'analyse la plus discriminante possible des troubles induits par l'exposition aux polluants. Les segments suivants et leur variabilité ont été analysés : RR (approche de la variabilité sinusale), QT (ischémie, troubles de la repolarisation), d'une part et la survenue de phénomènes arythmiques et plus particulièrement les extrasystoles ventriculaires et les épisodes de tachycardie ventriculaire ont été quantifiés. La survenue d'évènements de fibrillation ventriculaire a été particulièrement recherchée, bien que la survenue de ce genre de trouble soit très exceptionnelle chez le rat, elle est plus probable chez le cobaye.

### Etude de tolérance rénale :

A l'issue de l'exposition, les animaux sont placés en cages à diurèse individuelles pour une durée de 18 heures afin de recueillir les urines en vue de l'évaluation de fonction rénale. Les paramètres évalués sont la protéinurie, l'osmolalité, le pH, l'ionogramme, la créatininurie, l'activité de la N-acétyl glucosaminidase de la gamma-glutamyl transpeptidase et de la phosphatase acide.

### Etudes tissulaires

Lors de l'autopsie des animaux, reins, cœur et poumons sont prélevés, des fragments de ces organes sont congelés dans l'azote liquide puis stockés à  $-80^{\circ}\text{C}$ , d'autres fragments sont fixés par le PFA 4% en vue d'études histopathologiques.

Pour les dosages d'activités enzymatiques, des fragments de tissu ont été homogénéisés à l'aide d'un poly-broyeur de type Kontess dans un ratio 1/10 masse volume de tampon d'homogénéisation TriHCl 5mM, NaCl9g/l, pH 7.4. Les dosages des activités enzymatiques ont été réalisés en duplicate sur chaque homogénat selon les protocoles préalablement décrits dans Morin et al. 1999, Bion et al. 2002, Fall et al. 2007.

Protocoles d'exposition des animaux :

Protocole étude A stress oxydant

Expositions 3 heures 3 jours consécutifs avec autopsie après la 3<sup>ème</sup> exposition. Deux concentrations d'expositions 1/50 (2%) et 1/25. (4%).  
But de l'étude : évaluation du stress oxydant pulmonaire et systémique rein, foie induit par un moteur monocylindre ancienne technologie  
Un minimum de 6 animaux par groupe pour les évaluations biochimiques au niveau tissulaire. Les nombres exacts d'animaux pour chaque condition expérimentale sont portés dans les figures.

Protocole étude B stress oxydant

Expositions 3 heures 3 jours consécutifs avec autopsie après la 3<sup>ème</sup> exposition. Une concentrations d'exposition 1/50 (2%) . But de l'étude : évaluation du stress oxydant pulmonaire et systémique rein, foie, induits par un moteur de 2l de cylindrée de type Euro3 technologie injection très haute pression à rail commun turbosuralimenté. 8 animaux par groupe expérimental.

Protocole étude C stress oxydant chez le rat insuffisant cardiaque :

Expositions 3 heures par jour 3 jours consécutifs avec autopsie après la 3<sup>ème</sup> exposition. Une concentrations d'exposition 1/50 (2%) . But de

l'étude : évaluation du stress oxydant pulmonaire et systémique rein, foie, induits par un moteur de 2l de cylindrée de type Euro3 technologie injection très haute pression à rail commun turbosuralimenté en fonction de stratégies de post-traitement. 6 animaux par groupe expérimental.

#### Protocole D :

Pour les aspects liés à la reproduction, les rats sont exposés pour des périodes de 3 heures par jour 5 jours par semaine pour une durée de 8 semaines à des émissions diluées de moteur Diesel. Une partie des animaux est euthanasiée à 4 semaines, une partie à 8 semaines et une partie 8 semaines après la fin des expositions, pour une évaluation des caractéristiques spermatiques. Ces animaux n'ont pas été l'objet d'études de biochimie tissulaire,

#### Protocole E :

Pour les aspects liés à l'évolution de la fonction rénale : 12 rats sont exposés quotidiennement pendant 3 heures aux émissions du moteur monocylindre 2%, puis placés en cages à diurèse pour les 21 heures suivantes. Les urines sont collectées à l'issue de ces 21 heures.

les dosages urinaires de NAG, de GGT et de Créatinine ont été réalisés sur des urines collectées pendant 21 heures, puis normalisés par rapport à l'excrétion urinaire de créatinine. Protocoles d'exposition pour l'électrophysiologie cardiaque :

Enregistrement de l'électrophysiologie cardiaque a été effectué dans les conditions décrites par Anselme et al (2007)

Compte tenu du coût induit par l'implantation des capteurs, les animaux ont été analysés plusieurs fois avec un suivi longitudinal. Pour chaque exposition, l'analyse a systématiquement porté sur la période pré-exposition de 30 minutes, puis sur un enregistrement de 2h30 pendant la période d'exposition puis sur la période de 90 minutes post exposition. Quelques animaux ont été suivis pendant une période de 10 heures post-exposition pour suivre la phase de réversibilité des effets observés en terme de fréquence de survenue de battements ectopiques (data figure

47). Pour cette étude, chaque exposition a été considérée comme indépendante des autres, seul l'impact de l'exposition étudiée étant considéré, indépendamment de l'évolution temporelle de l'insuffisance cardiaque chronique d'une part ou d'un éventuel effet cumulatif d'exposition successives qui ne représentaient pas l'objet de ce travail, seul l'impact cardiaque aigu de l'exposition étant recherché.

Le développement de la méthodologie d'analyse des enregistrements électrocardiographiques par approche en dynamique symbolique a été réalisé dans le cadre de cette étude. Cette méthodologie faisant partie des résultats produits dans le cadre de l'étude sera donc décrite dans la section résultats.

Analyses statistiques :

Les données d'activités enzymatiques ont été analysées par le test t de Student pour la comparaison de deux groupes. Lorsque le test de normalité n'est pas satisfait, la comparaison est effectuée à l'aide du test de Mann-Whitney.

Les données d'électrophysiologie cardiaque ont été analysées par le test de signe de Wilcoxon, chaque animal étant son propre témoin pour chaque exposition considérée.

Calendrier de réalisation

Année 1 :

I : Evaluation et caractérisation des impacts toxicologiques sur échappements moteurs avec le modèle rat sain et insuffisant cardiaque chronique et cobaye sain.

II : Evaluation des effets de toxicité sur la fonction de reproduction. Etude des caractéristiques spermatiques, .

III : Tentative de Mise en place et caractérisation de l'insuffisance cardiaque chronique chez le cobaye

IV : Réalisation et caractérisation du banc de production de polluants

### Responsabilité de chaque partenaire

Le CERTAM a assumé la responsabilité du développement de la caractérisation et du fonctionnement du banc de production d'atmosphères complexes modélisant la pollution atmosphérique.

L'Inserm U644 a assumé la responsabilité de la réalisation de la production des animaux insuffisants cardiaques par technique de ligature coronaire, des expositions des animaux par inhalation, du monitoring cardiorespiratoire et rénal, de la collecte des échantillons biologiques et de leur exploitation en collaboration avec les services de rythmologie cardiaque et de néphrologie du CHRU de Rouen

L'INERIS a pris en charge l'étude de l'évaluation de la toxicité pour la reproduction sur les animaux préalablement exposés au sein du CERTAM.

### Année 2

de la contribution du NO<sub>2</sub> aux manifestations toxiques observées : stress oxydant et électrophysiologie cardiaque,

Etude d'une autre atmosphère oxydante : l'ozone, impact sur l'électrophysiologie cardiaque

Ces trois études ont été réalisées conjointement par l'INSERM U644 et le CERTAM.

Les dosages hormonaux et l'étude de la méthylation de l'ADN testiculaire initialement prévus sous la responsabilité de l'INERIS n'ont pas été réalisés malgré la mise à disposition des prélèvements par le CERTAM et l'INSERM. Cela a conduit à une révision de l'annexe financière soumise pour le paiement final associé à la convention.

## 2 RESULTATS

### 2.1 RAPPEL DES CONDITIONS EXPERIMENTALES

I : Evaluation et caractérisation des impacts toxicologiques sur échappements moteurs avec le modèle rat sain et insuffisant cardiaque chronique et cobaye sain.

*Les études réalisées sur le rat sain ont porté sur :*

L'exposition aux émissions diluées de moteur Diesel 1/50 la composition de ces émissions est rapportée dans le tableau 1.

Plusieurs schémas d'exposition ont été réalisés :

-Expositions 3 heures 3 jours consécutifs avec autopsie après la 3<sup>ème</sup> exposition. Deux concentrations d'expositions 1/50 (2%) et 1/25. (4%).  
But de l'étude : évaluation du stress oxydant pulmonaire et systémique rein, foie induit par un moteur monocylindre ancienne technologie (étude A) et un moteur de type Euro3 technologie injection très haute pression à rail commun (étude B). Autopsies réalisées novembre 2004 étude A, mars 2006 etude B.

#### 2.1.1 Etude A sur émissions de moteur monocylindre

Mesures des polluants des émissions brutes et diluées:

	PM mg/m3	CO_AV ppm	CO2 %	HC_AV ppm	NO_AV ppm	NO2_AV ppm	NOX_AV ppm	O2 %
Gaz Bruts	25.80	271.0	6.9	552.5	301.5	17.5	319.0	10.8
Dilution 1/50	0.52	5.4	0.1	11.1	6.0	0.4	6.4	20.0
Dilution 1/25	1.03	10.8	0.3	22.1	12.1	0.7	12.8	20.0

Tableau1 : polluants réglementé dans les émissions

Bien que n'ayant pas été réalisées spécifiquement dans le cadre de cette étude, les données de fraction organique solubles des particules émises par ce moteur sont inférieures à 15%. La très faible biodisponibilité de la phase organique soluble et son

absence d'implication dans les mécanismes toxiques lors de l'exposition par inhalation contrairement aux observations faites en instillation (Mauderly et al.1986, Bond et al. 1987) ou par remise en suspension dans des milieux de culture (Bonvallot et al 2000, Boland et al 2000) qui de façon artefactuelle modifient la biodisponibilité des hydrocarbures poly-aromatiques, nous conduisent à donner cette information à titre indicatif, mais ne justifiaient pas de refaire ces analyses dans le présent travail.

Les analyses de métaux n'ont pas été effectuées car ceux ci d'après Boland et al. AJP. 2000, 278 : L25-L32, n'apparaissent pas jouer de rôle dans la toxicité des particules Diesel. Il faut noter que le contenu en métaux des PED émises par un moteur Diesel est très faible. De plus lors de la filtration, les métaux sont retenus par le filtre avec un très grande efficacité.

#### Evaluation biochimique des défenses anti\_oxydantes

Les résultats des mesures d'activités enzymatiques tissulaires de la Glutathion peroxydase, de la glutathion réductase, de la catalase et de la superoxyde dismutase sont consignés dans les figures ci-dessous. Ces résultats montrent la survenue d'un stress oxydant au niveau pulmonaire, hépatique et rénal chez le rat sain.

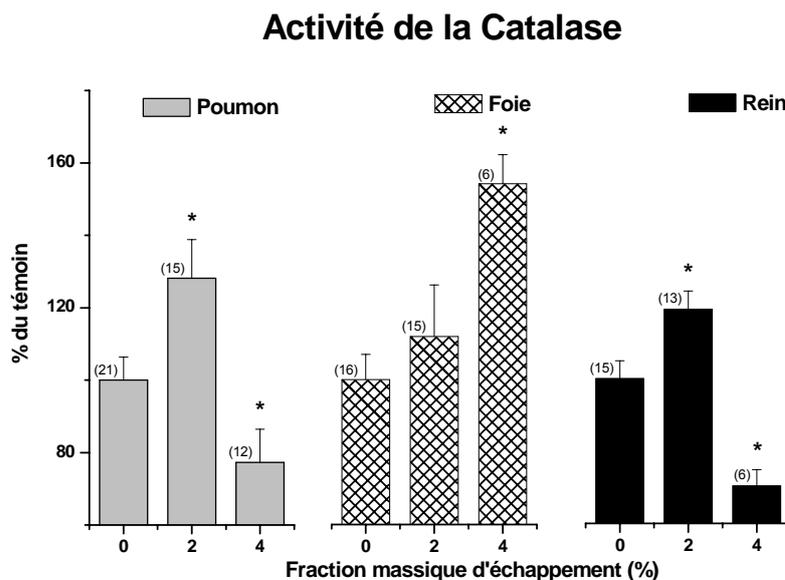


Figure 1 : Activités tissulaires de la catalase

Une élévation de l'activité de la catalase est observée au niveau hépatique et rénal pour la concentration de 2% et une diminution de cette activité est observée pour la concentration de 4%. Par contre au niveau hépatique, l'augmentation à la concentration de 2% n'est pas statistiquement significative alors qu'elle le devient à la concentration de 4%. Le nombre d'individus est indiqué pour chaque situation entre parenthèses.

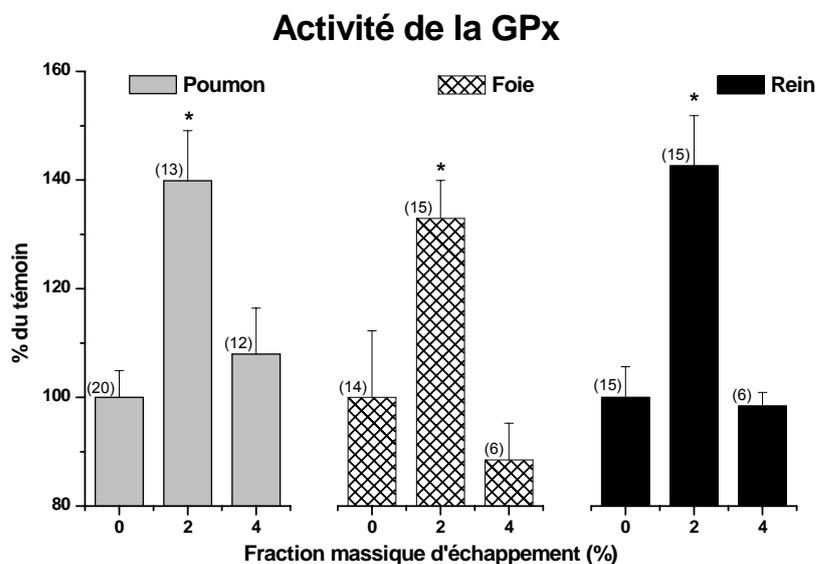


Figure 2 : activité tissulaire de la glutathion peroxydase

En ce qui concerne l'activité de la glutathion peroxydase, une augmentation d'activité est observée pour la concentration de 2% dans les trois organes mais n'est plus retrouvée à la concentration de 4%. Le nombre d'individus est indiqué pour chaque situation entre parenthèses.

### Activité des GST

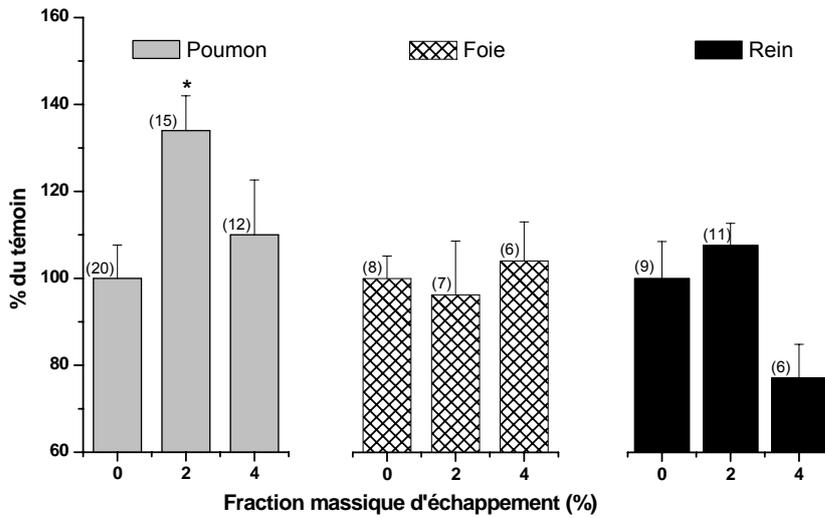


Figure 3 : activités tissulaires de la Glutathion-S-transférase

En ce qui concerne l'activité de la glutathion-S-transférase, Le foie n'apparaît pas comme une cible, une élévation apparaît pour la concentration 2% au niveau pulmonaire et une diminution pour la concentration 4% au niveau rénal. Le nombre d'individus est indiqué pour chaque situation entre parenthèses.

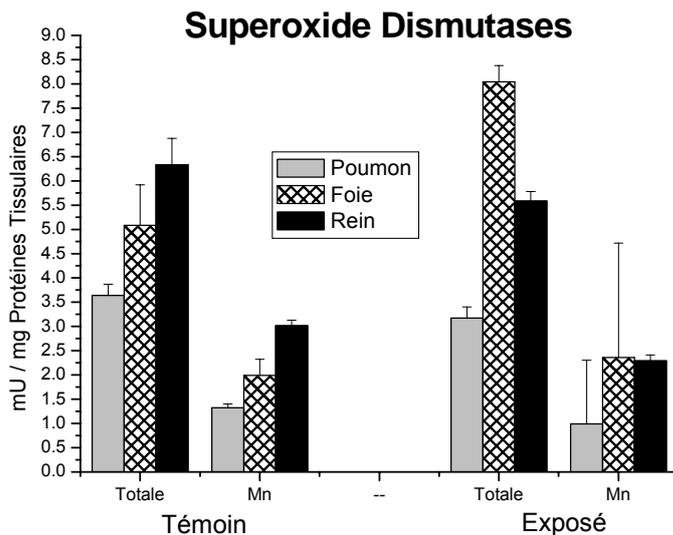


Figure 4 : Activités tissulaire de la superoxyde dismutase totale (émissions diluées 2%)

En ce qui concerne l'activité des superoxyde dismutases totales et Manganèse dépendante, il n'apparaît pas de modification au niveau pulmonaire ni rénal, alors qu'une élévation de l'activité totale est observée au niveau hépatique ( $p < 0.05$ ) sans altération de l'activité de l'isoforme manganèse dépendante. (N=6)

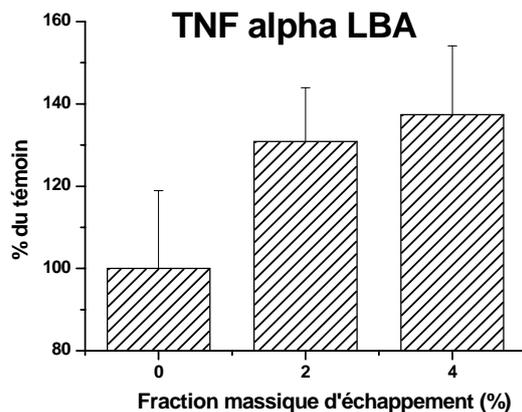


Figure 5 : concentrations de TNFalpha dans le liquide broncho-alvéolaire

Une élévation modérée mais statistiquement significative ( $p < 0.05$ ) des concentrations de TNFa est observée dans les lavages bronchoalvéolaires. Cette augmentation est d'une amplitude semblable pour les concentrations de 2 et 4 %. (n=12)

En conclusion de cette étude, l'exposition de rats sains aux émissions d'un moteur Diesel monocylindre a engendré un stress oxydant pulmonaire, mais aussi un stress oxydant systémique observé au niveau hépatique et rénal. Une réaction inflammatoire est clairement observée dans les prélèvements de lavages broncho-alvéolaires par une élévation de la concentration de TNFa et d'un doublement du nombre de cellules dans le Lavage BronchoAlvéolaire.

Le stress oxydant est souvent apparu de façon plus marquée à la concentration de 2% qu'à la concentration de 4%. Des données concernant une cinétique d'effets permettraient de mieux cerner les raisons de ce type de réponse. En effet en toxicologie et particulièrement pour l'adaptation des réponses anti-oxydantes, les cinétiques et niveaux

d'induction sont rarement semblables en fonction de la dose administrée (Moritz et al. 1995). Ce type de phénomène a été montré tout particulièrement avec le NO<sub>2</sub> dans les travaux décrits par Devalia et al.1993 qui montrent des impacts non reliés à la concentration ou à la durée d'exposition pour les niveaux d'induction de production de cytokines dans les cellules bronchiques. Ces auteurs expliquent ces phénomènes par des phénomènes de saturation des capacités de dissolution du NO<sub>2</sub> dans les milieux liquides. Des expérimentations complémentaires incluant plusieurs délais et plusieurs concentrations permettraient de mieux cerner cette question de courbes doses- et temps- réponses d'aspect souvent en forme de cloches.

#### 2.1.2 Etude B sur émissions de moteur type Euro3 chez le rat sain :

Une étude semblable a celle ci dessus a été entreprise sur les émissions d'un moteur 4 cylindres de type Euro3, utilisé avec un gazole contenant 50ppm de Soufre, pour un régime intermédiaire (2500rpm) et une forte charge (50Nm).

Caractéristiques du point moteur et des émissions en amont du système de post-traitement :

Mesures des polluants gazeux des émissions brutes:

Caractéristiques du point moteur

<b>régime</b>	<b>couple</b>	<b>T_EGR</b>	<b>T1_Echa</b>	<b>T2_Echa</b>	<b>P_amont</b>	<b>Fumée</b>
<b>tr/min</b>	<b>N.m</b>	<b>°C</b>	<b>°C</b>	<b>°C</b>	<b>mbar</b>	<b>U.B</b>
2501	50.2	119.8	301	268	117	1.19
2501	50.4	119.1	300	267	117	1.20
2501	50.3	121.4	301	268	118	1.17
2502	50.1	120.4	301	268	116	1.22
2503	50.1	120.1	301	268	117	1.21

Tableau 2 : Caractéristiques du point moteur

Tableau 3 : Polluants réglementés en amont et en aval du catalyseur d'oxydation

Les résultats ci-dessus confirment la bonne efficacité du catalyseur

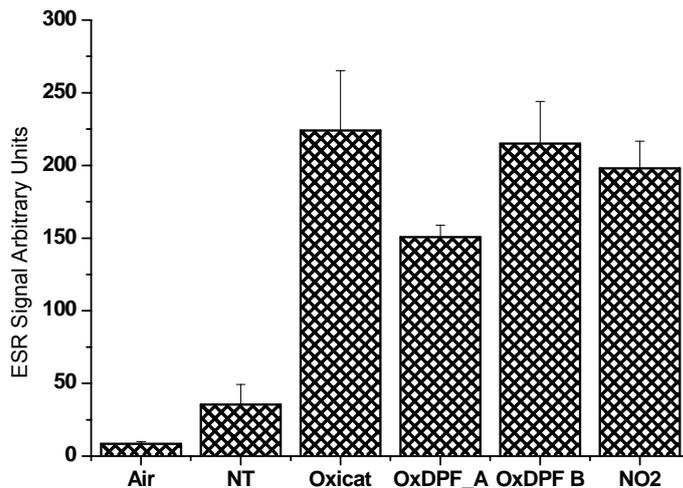
**AMONT CATALYSEUR:**

ppm NO2	ppm NOx	ppm CO	% CO2	% O2
48	246	280	6.7	11.9
48	249	281	6.7	12
48	251	281	6.7	11.9
48	250	279	6.7	11.9
48	249	277	6.7	12

**AVAL CATALYSEUR:**

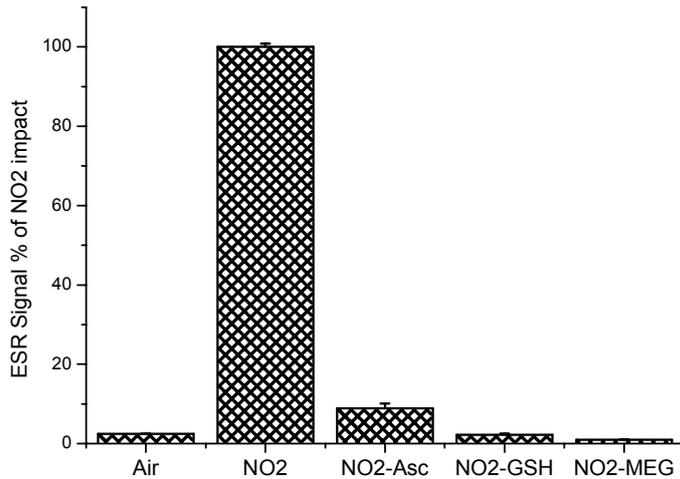
ppm NO2	ppm NOx	ppm CO	% CO2	% O2
189	259	0	6.7	11.9
188	258	1	6.7	11.9
189	260	0	6.7	11.9
188	258	1	6.7	11.9

d'oxydation : suppression du CO, suppression des HC. Alors qu'il n'y a pas de modification des NOx totaux par le catalyseur, il apparaît une importante modification du ratio NO2/NOX qui passe de 19% en condition non traitée à 72% en conditions catalysées. Cette évolution suggère un fort changement du potentiel oxydant des émissions après le catalyseur. Ce fort potentiel oxydant est d'ailleurs confirmé par des mesures effectuées en résonance paramagnétique électronique (RPE) réalisées dans le cadre du programme MAAPHRI brièvement résumées ci-dessous.

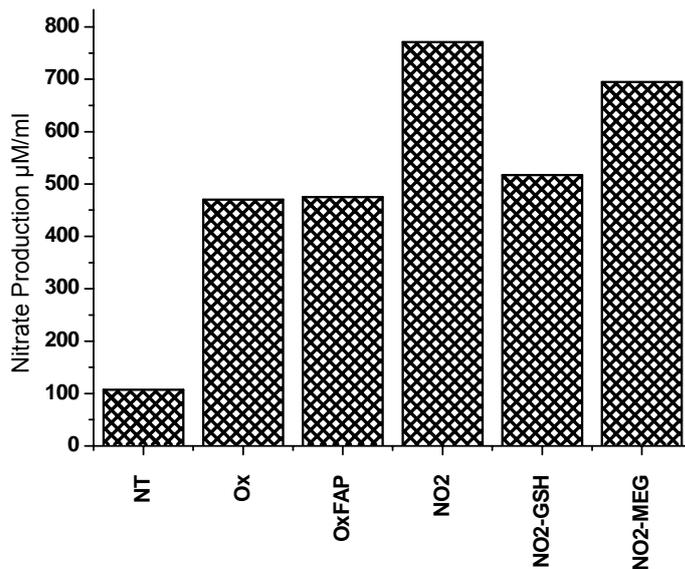


Les mesures du signal de résonance paramagnétique ont été réalisées dans le système d'exposition de tranches pulmonaires décrit dans Bion et al. 2002, en l'absence de tissu biologique, les fioles d'exposition contenant 1,5 ml de milieu DMEM :Ham F12 additionné de CPH comme spin probe. L'exposition est effectuée pendant 45 minutes à un flux continu d'atmosphère test. Echappements moteurs dilués au 1/10. La concentration de NO<sub>2</sub> dans l'air est ajustée pour correspondre à la concentration de NO<sub>2</sub> dans les échappements catalysés. OxDPF\_A : catalyseur d'oxydation plus filtre partiellement chargé en particules 4 à 5 g/l, OxDPF\_B : catalyseur d'oxydation plus filtre à particules fraîchement régénéré.

Il apparaît clairement que le potentiel oxydant de l'atmosphère test est fortement augmenté par le traitement par catalyse d'oxydation en conditions filtrées ou non filtrées, et par l'addition de NO<sub>2</sub> dans de l'air propre. La charge partielle du filtre avec des particules conduit à une diminution partielle du potentiel oxydant de l'émission, qui est corrélée à une diminution de la concentration en NO<sub>2</sub> dans cette condition expérimentale. Cette diminution de NO<sub>2</sub> est expliquée par l'interaction NO<sub>2</sub>/suies dans le filtre à particule correspondant à l'effet CRT souvent recherché dans le développement de stratégies d'oxydation des suies dans les filtres à particules.



Les résultats ci-dessus montrent clairement que le potentiel oxydant du NO<sub>2</sub> peut être pratiquement aboli par l'ajout de divers anti-oxydants à la concentration de 5mM dans le milieu contenant la CPH comme spin probe démontrant clairement que le contact entre le NO<sub>2</sub> gazeux et un milieu biologique salin conduit à la survenue d'espèces réactives de l'oxygène ou d'intermédiaires réactifs. L'hypothèse émise est la production de peroxinitrites qui lors de sa dégradation en milieu aqueux peut conduire à la formation de radicaux NO<sub>2</sub><sup>\*</sup>, de radicaux CO<sub>3</sub><sup>\*</sup> et d'anions superoxydes.



La figure ci-dessus décrit la production nette de nitrates dans le milieu de culture exposé pendant 3 heures à des émissions de moteur Diesel Euro3 non traitées (NT) ,traitées par catalyse d'oxydation (Ox), traitées par catalyse d'oxydation couplée à un filtre à particules (OxFAP) ou à du NO<sub>2</sub> (5ppm) dans l'air, le milieu de culture simple (NO<sub>2</sub>) ou additionné de GSH (NO<sub>2</sub>-GSH) ou de MEG (NO<sub>2</sub>-MEG)à la concentration de 5mM.

Il apparaît clairement que les émissions NT induisent une moindre production de nitrate dans le milieu de culture que les conditions catalysées, que l'exposition au NO<sub>2</sub> induit une importante production de nitrate qui n'est que peu ou pas modulée par l'addition d'anti-oxydants dans le milieu de culture. L'apparition de nitrate apparaît directement corrélée à la concentration de NO<sub>2</sub> dans l'atmosphère au contact du milieu de culture.(données MAAPHRI)

Analyses Biologiques :Les expositions de 8 rats par groupe ont été effectuées avec une dilution au 1/50 soit 2% d'émissions brutes dans l'air. (Etude B)

Quatre situations expérimentales sont étudiées : les émissions non traitées (NT), les émissions filtrées (F) sur la ligne d'échantillonnage et les émissions catalysées et filtrées (CataFap).

Les activités enzymatiques ont été mesurées dans les homogénats de tissu pulmonaire, cardiaque, hépatique et rénal

## Résultats des analyses d'activités enzymatiques tissulaires

### La Glutathion peroxidase

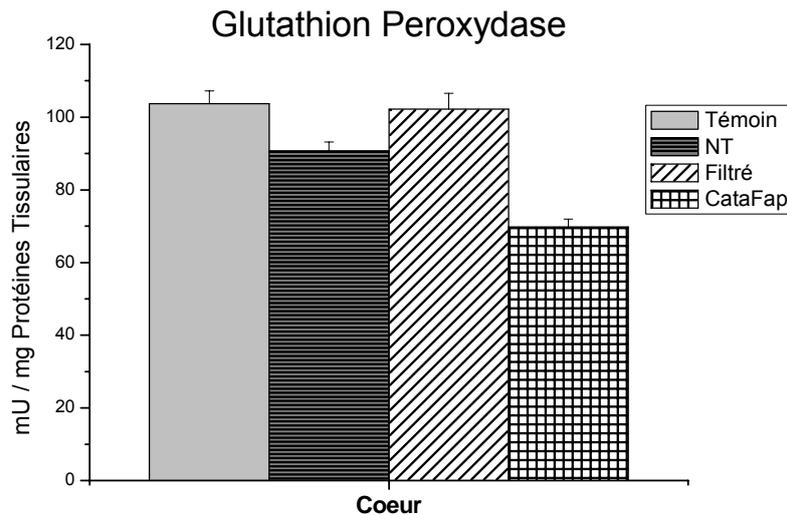


Figure 6 : Activité de la glutathion peroxydase cardiaque

Une diminution importante de la glutathion peroxydase cardiaque est observée au niveau dans la condition CataFap ( $p < 0.01$ ), qui n'est pas observée dans les conditions non traitées ni filtrées.

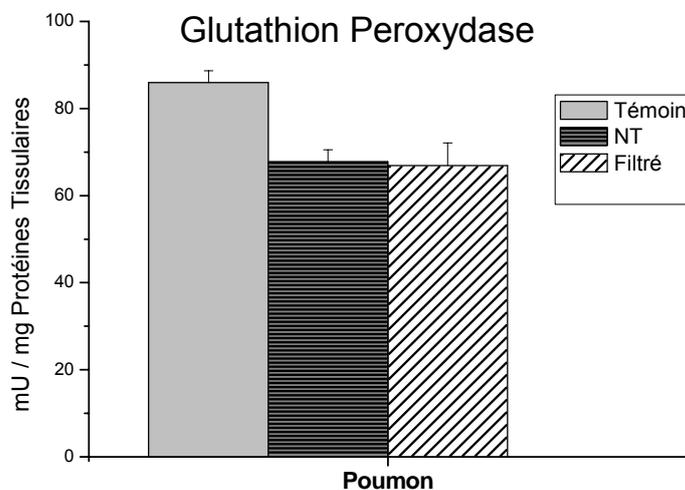


Figure 7 : activité de la glutathion peroxydase pulmonaire

Une diminution de l'activité glutathion peroxydase pulmonaire est observée pour les conditions non traitées et filtrées ( $p < 0.05$ ). Un problème de conservation des échantillons CataFap pulmonaires n'a pas permis d'évaluer les données pour cette condition expérimentale.

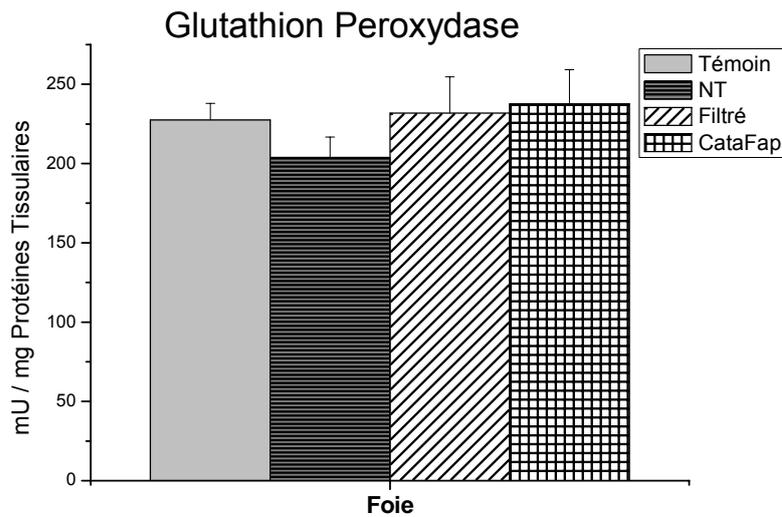


Figure 8 : activité de la glutathion peroxydase hépatique

Aucune modification de l'activité glutathion peroxydase hépatique n'a été détectée.

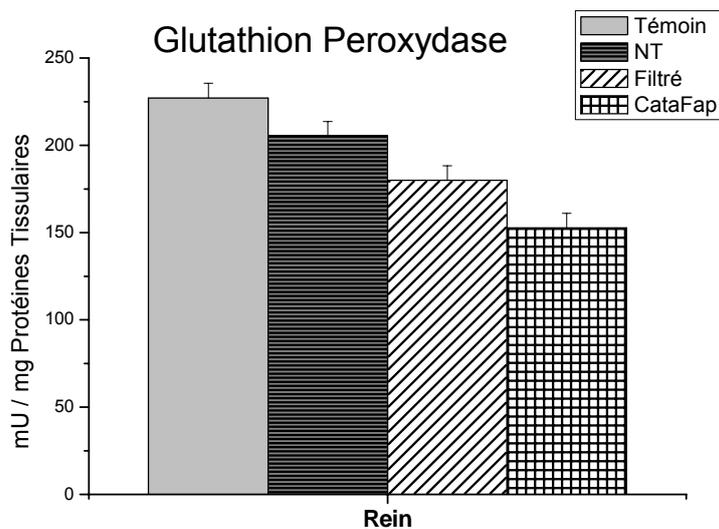


Figure 9 : Activité de la Glutathion peroxydase rénale

Une diminution de l'activité glutathion peroxydase rénale est observée pour l'ensemble des conditions expérimentales d'exposition ( $p < 0.05$ ). Cependant, la diminution la plus importante est observée pour la condition CataFap ( $p < 0.001$ ).

## La Catalase

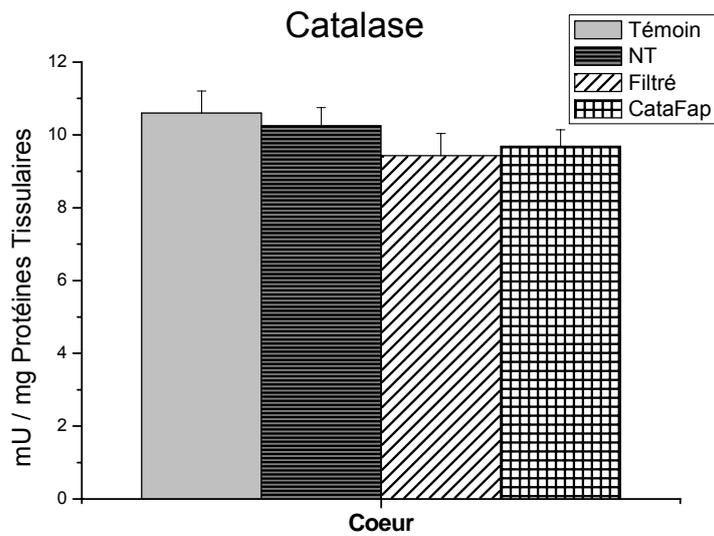


Figure 10 : Activité de la catalase cardiaque

Il n'est pas observé de modification de l'activité catalase au niveau cardiaque.

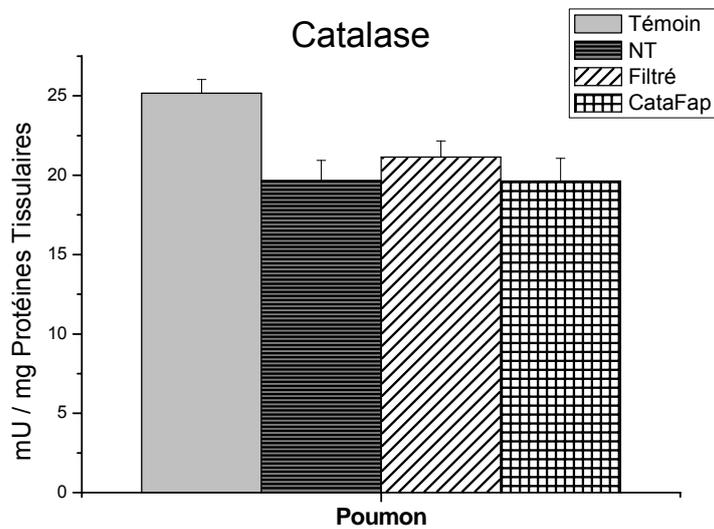


Figure 11 : Activité de la catalase pulmonaire

Une diminution modérée de l'activité catalase pulmonaire est observée pour l'ensemble des trois situations expérimentales ( $p < 0.05$ ).

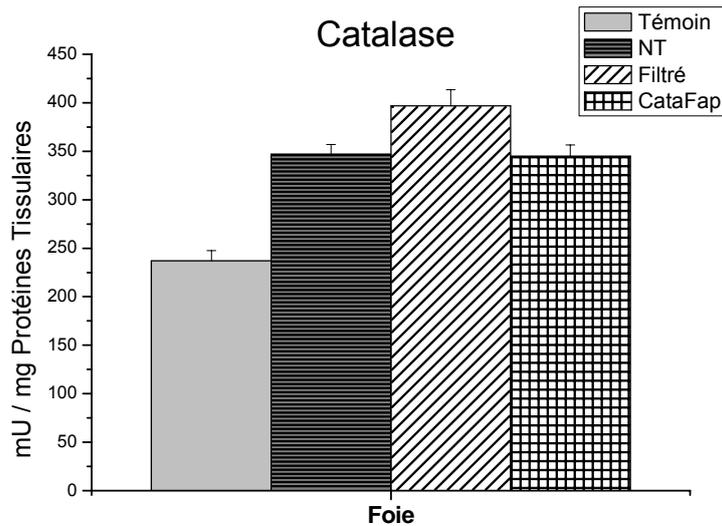


Figure 12 : Activité de la catalase hépatique

Une élévation importante de l'activité de la catalase hépatique est observée pour l'ensemble des trois situations expérimentales ( $p < 0.01$ ).

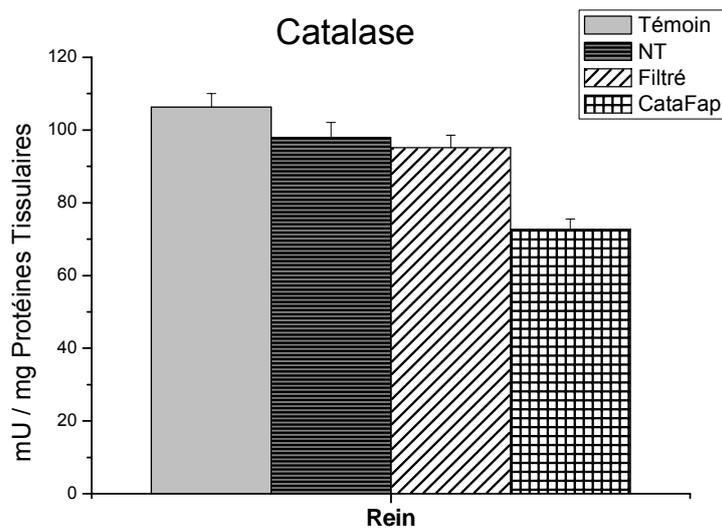


Figure 13 : activité de la catalase rénale

Une diminution de l'activité de la catalase rénale est observée pour la situation CataFap ( $p < 0.01$ ), qui n'est pas observée pour les situations NT et filtré.

La Glutathion-S-Transferase

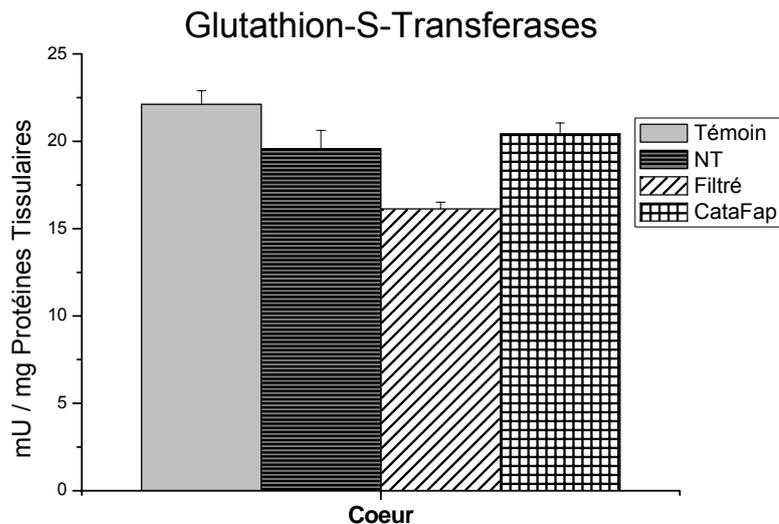


Figure 14 : activité de la glutathion-S-transférase cardiaque

Une diminution de l'activité de la glutathion-S-Transférase est observée dans la situation filtré ( $p < 0.01$ ). Celle-ci est en limite de signification statistique pour les situations NT et CataFap ( $0.1 > p > 0.05$ ).



Figure 15 : activité de la glutathion-S-transférase pulmonaire

Une diminution de l'activité glutathion-S-Transférase pulmonaire est observée pour les conditions non traitées et filtrées ( $P < 0.01$ ). Un problème de conservation des échantillons CataFap pulmonaires n'a pas permis d'évaluer les données pour cette condition expérimentale.

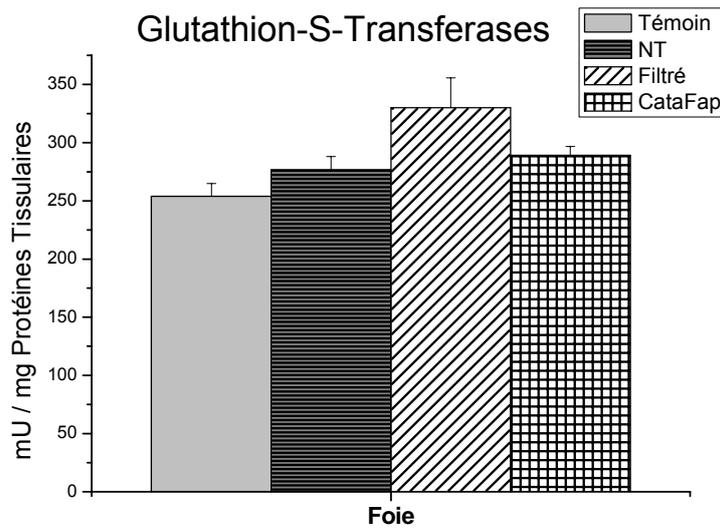


Figure 16 : Activité de la glutathion-S-transférase hépatique

Une élévation modérée de l'activité glutathion-S-Transférase hépatique est observée dans la situation filtré ( $p < 0.05$ ) qui n'est pas observée dans les situations NT ni CataFap.

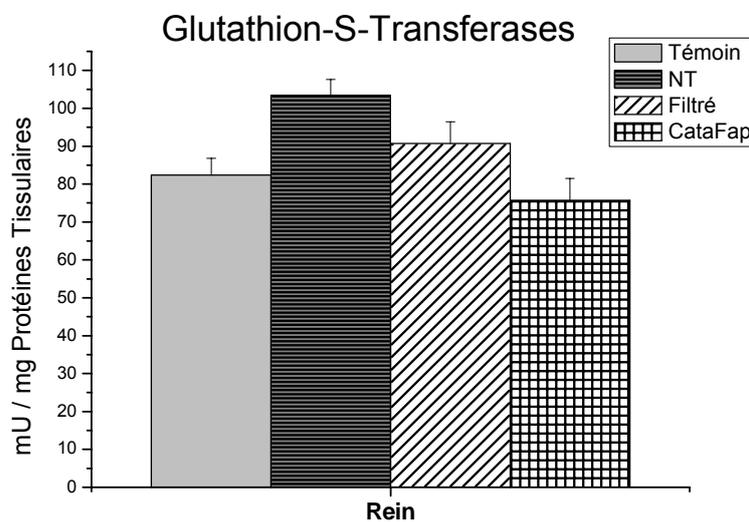


Figure 17 : Activité de la glutathion-S-transférase rénale

Une élévation de l'activité glutathion-S-Transférase rénale est observée dans la situation NT ( $p < 0.05$ ), qui n'est pas observée dans les situations filtré ni CataFap.

## Le TNFa sérique

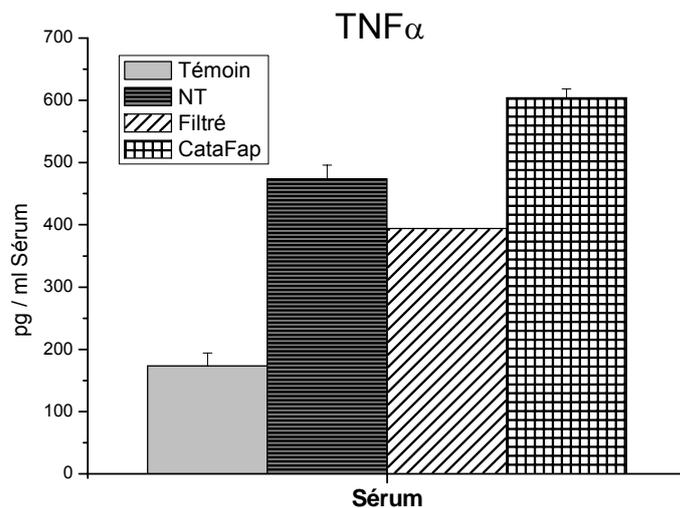


Figure 18 : Concentrations sériques de TNFalpha

Une élévation importante du TNFalpha sérique est observée pour l'ensemble des trois conditions expérimentales d'exposition ( $p < 0.001$ ), suggérant la survenue d'une réaction inflammatoire transmise au niveau systémique. La filtration en ligne des émissions ne permet pas de réduire de façon significative cette élévation de TNFalpha qui semble essentiellement liée à l'impact de la phase gazeuse pour les émissions non post-traitées par catalyse d'oxydation. D'autre part, l'élévation la plus importante est observée en aval du catalyseur d'oxydation, ce qui semble indiquer que le potentiel oxydant qui est en corrélation avec la concentration de NO<sub>2</sub> des émissions pourrait être le trigger de cette élévation de TNFalpha. L'absence de particules en condition Filtrée sur ligne d'échantillonnage et en aval du couple catalyseur d'oxydation + FAP confirme l'induction du TNFalpha par la phase gazeuse des émissions.

En conclusion de cette expérimentation, l'exposition aux émissions de moteur de type Euro 3 semble diminuer les défenses anti-oxydantes pulmonaires et rénales : diminution des activités GPx et catalase et stimuler l'activité de la catalase hépatique.

Une importante réaction inflammatoire systémique est induite par l'exposition à ces émissions quelque soit leur traitement (filtration ou catalyse). La phase gazeuse et plus particulièrement son potentiel oxydant corrélé à la concentration de NO<sub>2</sub> semble être le trigger principal de cette réponse. En effet, la filtration avec une efficacité de 99,9% ne modifie pas l'impact des émissions sur la production de TNFalpha

## 2.2 ETUDES FONCTIONNELLES RENALES

La fonction glomérulaire est évaluée par l'évaluation de l'excrétion urinaire de créatinine. L'intégrité des cellules tubulaires est évaluée par la mesure de l'excrétion urinaire de deux activités enzymatiques : la N-Acetyl-B-D-glucosaminidase (NAG) et la gamma-glutamyl-transpeptidase (GGT).

12 rats sont exposés quotidiennement pendant 3 heures aux émissions du moteur monocylindre 2%, puis placés en cages à diurèse pour les 21 heures suivantes. Les urines sont collectées à l'issue de ces 21 heures. les dosages urinaires de NAG, de GGT et de Créatinine ont été réalisés sur des urines collectées pendant 21 heures, puis normalisés par rapport à l'excrétion urinaire de créatinine. Les résultats sont rapportés dans les figures ci-dessous :

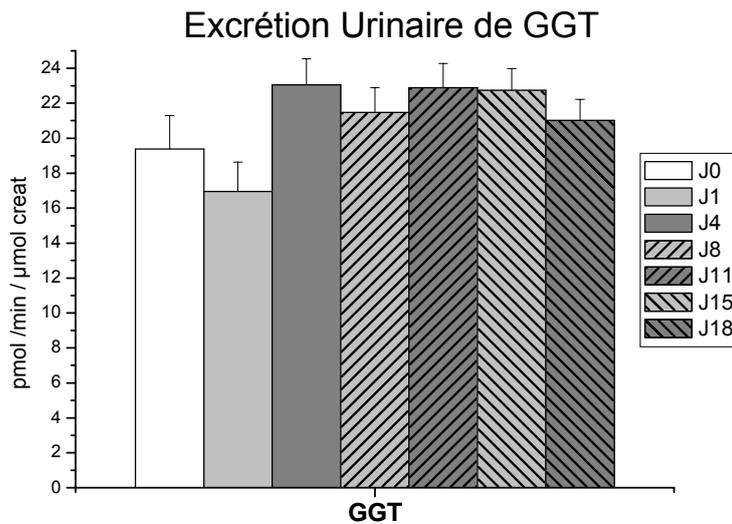


Figure 19 : Activités urinaires de la gamma-Glutamyl-transpeptidase  
Il n'est pas noté de variation biologiquement significative de l'excrétion urinaire de gamma-glutamyl transpeptidase rapportée à l'excrétion urinaire de créatinine au cours de la période J1 à J18. Il ne semble donc pas survenir d'atteinte tubulaire proximale consécutive à l'exposition aux émissions de moteur Diesel.

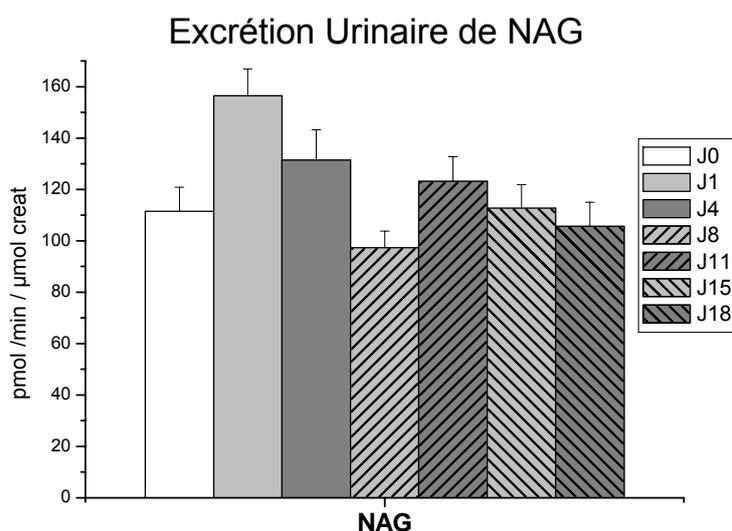


Figure 20 : Activités urinaires de la N-Acétyle-B-D-glucosaminidase

Il n'est pas noté de variation biologiquement significative de l'excrétion urinaire de N-acétyle-B-D-glucosaminidase rapportée à l'excrétion urinaire

de créatinine au cours de la période J1 à J18. Il ne semble donc pas survenir d'atteinte épithéliale tubulaire consécutive à l'exposition aux émissions de moteur Diesel.

Les mesures de la protéinurie, de l'osmolalité, du pH, de la glucosurie, des corps cétoniques n'ont pas révélé de modification au cours de la période d'expositions entre J1 et J18.

Il n'a pas été observé de modifications de l'aspect histologique rénal sur les prélèvements observés. Les aspects glomérulaires apparaissent bien préservés. Il n'est pas observé d'épaississements ni de dépôts sur les membranes basales glomérulaires, ni d'une protéinurie significative. La survenue d'une pathologie de type syndrome de Goodpasture semble pouvoir être écartée dans les conditions expérimentales étudiées.

En conclusion, sur l'ensemble des paramètres évalués ci-dessus, bien que les défenses anti-oxydantes rénales soient modulées par l'exposition aux émissions Diesel, il ne semble pas y avoir d'impact sur la fonction rénale à la suite de l'inhalation répétée d'émissions diluées de moteur Diesel.

## IMPACT SUR LA FONCTION DE REPRODUCTION

### 2.2.1 Protocoles d'exposition des animaux

Les rats ont été soumis à un flux continu d'échappement dilué (taux de dilution : 1/25) ayant subi ou non l'action d'un système de post-traitement (catalyseur d'oxydation associé à un filtre à particules), sur un point de fonctionnement moteur stationnaire à régime intermédiaire et faiblement chargé. Les concentrations de particules pour ces conditions moteur sont de l'ordre de  $500\mu\text{g}/\text{m}^3$ ,

Constitution des lots

Nombre d'animaux dans l'étude : 30

Nombre de lots : 4

Nombre de temps d'exposition testés : 2

Nombre de lots témoins : 1

Nombre d'animaux par lot : 6 mâles

	N° ANIMAUX	Identification ROUEN		DATE DE MORTALITE	
<b>Témoins</b>	<b>LOT 1 Mâle</b>				
	temoin 1	1	A1	04/08/2005	Sacrifice 16 semaines
	temoin2	2	A2	04/08/2005	
	temoin 3	3	A3	04/08/2005	
	temoin 4	4	B1	04/08/2005	
	temoin 5	5	B2	04/08/2005	
	temoin 6	6	B3	04/08/2005	
<b>Traités</b> 4 semaines	<b>LOT 2 Mâle</b>				
	7	13	B1 - II	13/05/2005	
	8	15	C1 - III	13/05/2005	
	9	17	D1 - II	13/05/2005	
	10	19	F1 - III	13/05/2005	
	11	21	G1 - II	13/05/2005	
<b>Traités</b> 4 semaines		12	H1 - III	13/05/2005	Sacrifice 8 semaines
		<b>13</b>	B2 - II	09/06/2005	
		<b>14</b>	C2 - III	09/06/2005	
		<b>15</b>	D2 - II	09/06/2005	
		<b>16</b>	F2 - III	09/06/2005	
		<b>17</b>	G2 - II	09/06/2005	
<b>Traités</b> 8 semaines	<b>LOT 3 Mâle</b>			10/06/2005	Sacrifice 8 semaines
	19	1	B1 - II	10/06/2005	
	20	3	C1 - III	10/06/2005	
	21	5	D1 - II	10/06/2005	
	22	7	F1 - III	10/06/2005	
	23	9	G1 - II	10/06/2005	
<b>Traités</b> 8 semaines		24	H1 - III	10/06/2005	Sacrifice 16 semaines
		<b>25</b>	B2 - II	05/08/2005	
		<b>26</b>	C2 - III	05/08/2005	
		<b>27</b>	D2 - II	05/08/2005	
		<b>28</b>	F2 - III	05/08/2005	
		<b>29</b>	G2 - II	05/08/2005	
	<b>30</b>	H2 - III	05/08/2005		

Tableau 4 : Organisation et identification expérimentale

Seuls les animaux traités 4 et 8 semaines puis sacrifiés 4 et 8 semaines après la fin du traitement (en gras) ont été utilisés pour les caractéristiques spermatiques. Ainsi, nous pouvons évaluer les éventuels phénomènes de récupération suite à une atteinte ponctuelle de la spermatogenèse. Les rats étant exposés au CERTAM de Rouen, il n'a pas

été possible de réaliser les études des caractéristiques spermatiques des rats exposés 4 et 8 semaines et sacrifiés à la fin de l'exposition.

### 2.2.2 Etude des caractéristiques spermatiques

#### Méthode

##### Comptage des spermatozoïdes

Le nombre de spermatozoïdes par gramme de testicule et d'épididyme a été évalué. L'albuginée du testicule gauche a été retirée et le parenchyme testiculaire a été pesé et re-suspendu avec 15 ml de milieu SMT (0.9% NaCl, 0.01% methiolate, 0.05% triton X-100). Le mélange est ensuite broyé à l'aide d'un ultra thurax, à vitesse moyenne pendant 30 secondes, 2 fois. La solution est ensuite agitée à l'aide d'un Vortex à vitesse maximale pendant 1 minute avant qu'un ml de solution soit placé une minute dans un bain ultra son afin de désagréger les restes. Après une nouvelle agitation au Vortex à vitesse moyenne pendant 30 secondes, 2 fois, 15 µl sont déposés sur une cellule de Malassez lue sous microscope x 10. L'épididyme est traité comme le testicule.

##### Caractéristiques spermatiques

De l'albumine de sérum de veau (BSA) est ajouté à 0,5% (p/v) à du milieu 199 complété avec des sels de Hank et de la L-glutamine. Lorsque la BSA est dissoute, la solution est tamponnée à pH 7,4 avec du NaOH 0.1N.

La queue de l'épididyme gauche de tous les mâles a été utilisée pour l'analyse de la mobilité spermatique. La queue de l'épididyme est placée dans une boîte de Petri avec 2 ml de milieu chauffé pendant 2 minutes sur une plaque. Le tissu est ouvert à l'aide d'un scalpel et d'une pince. La boîte de Petri contenant l'échantillon de sperme est légèrement agitée pour bien le diffuser. Dix µl de cette solution sont déposés sur une lame de 80 µm à 2 chambres, chauffés à 37°C sur une plaque chauffante. Les spermatozoïdes sont ensuite analysés en utilisant le système HTM-IVOS (Hamilton-Thorne Research, Beverly, MA, USA, version 12).

Les paramètres étudiés incluent le pourcentage de spermatozoïdes mobiles, le pourcentage de spermatozoïdes en déplacement (spermatozoïde avec une VAP > 70 $\mu$ m/s ou 150  $\mu$ m/s et un pourcentage de linéarité > 50% divisé par le nombre total de cellules), la vitesse curvilinéaire (VCL), la vitesse moyenne de passage (VAP), la vitesse de ligne droite (VSL) et l'amplitude des déplacements latéraux de la tête (ALH).

### 2.2.3 Résultats

#### Comptage des spermatozoïdes

Les résultats concernant le comptage des spermatozoïdes sont présentés dans les figures 21 et 22.

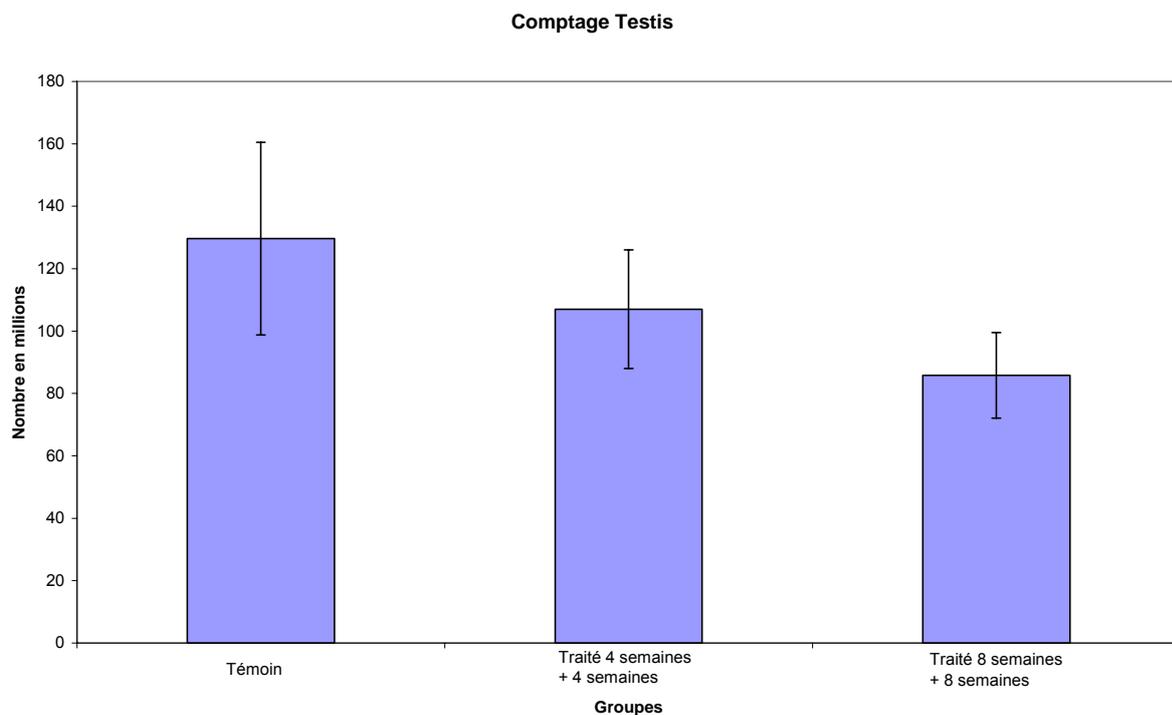


Figure 21 : nombre de spermatozoïdes (N en million par gramme de tissu) compté sur cellule de Malassez à partir de testicules issus d'animaux exposés à de l'air ou à des émissions de moteur à combustion (6 animaux par lot).

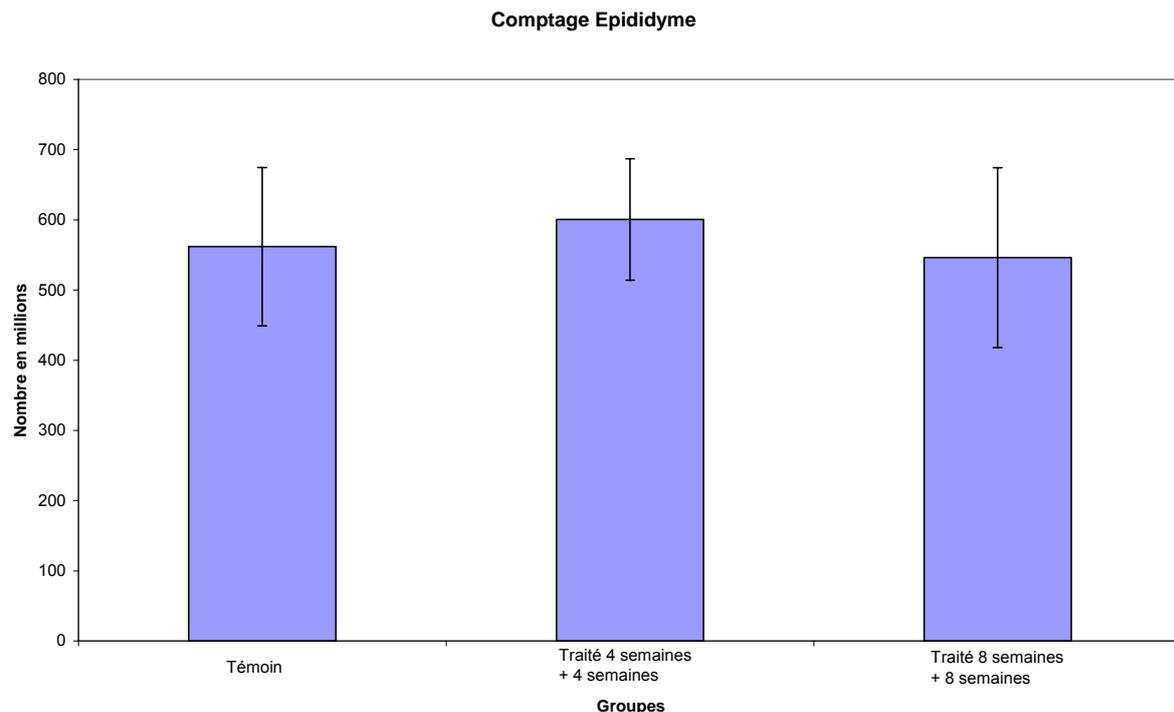


Figure 22 : nombre de spermatozoïdes (N en million par gramme de tissu) compté sur cellule de Malassez à partir d'épididymes issus d'animaux exposés à de l'air ou à des émissions de moteur à combustion (6 animaux par lot).

Le nombre de spermatozoïdes présent au niveau testiculaire ou épидидymaire ne présente pas de différence significative entre les animaux témoins et les animaux exposés (Test  $t$ ,  $p < 0.01$ ). Cependant, au niveau du testicule (figure 21), on note une tendance à la diminution du nombre de spermatozoïdes marquée chez les animaux traités 8 semaines et observés 8 semaines après la fin de l'exposition. Cette observation tendrait à montrer qu'il pourrait y avoir eu une atteinte testiculaire suite à l'exposition à des émissions d'échappement de moteur à combustion. Cette diminution, non statistiquement significative, n'est pas retrouvée au niveau de l'épididyme (figure 22). Il y a une contradiction entre ces deux observations. En effet, si il y avait eu une atteinte testiculaire, les réserves épидидymaires de spermatozoïdes devraient avoir diminuées après 8 semaines de récupération. Ces observations contradictoires laissent tout

de même un doute que des expérimentations complémentaires pourraient lever.

### Caractéristiques spermatiques

Les résultats concernant les caractéristiques spermatiques sont présentés dans le tableau 5.

Dose	Motility	EA	VAP	EA	VSL	EA
0	61.0	19.4	118.3	13.1	59.0	13.3
4+4	50.3	15.6	133.1	37.8	67.7	14.9
8+8	74.0	6.8	136.6	13.9	75.5	11.0
Dose	VCL	EA	ALH	EA		
0	267.8	46.3	18.8	1.3		
4+4	278.2	61.6	18.6	4.1		
8+8	319.8	46.0	19.5	1.6		

Tableau 5 : Résultats des caractéristiques spermatiques mesurées chez les animaux témoins (dose 0) et exposés (dose 4 + 4 et 8 + 8) (N = 6 par lots). Les résultats concernant la mobilité (motility, pourcentage), la vitesse moyenne de passage (VAP,  $\mu\text{m/s}$ ), la vitesse de ligne droite (VSL,  $\mu\text{m/s}$ ), la vitesse curvi-linéaire (VCL,  $\mu\text{m/s}$ ) et l'amplitude des déplacements latéraux de la tête (ALH,  $\mu\text{m/s}$ ) sont présentés en moyenne  $\pm$  l'écart type (EA).

Les différentes caractéristiques spermatiques ne montrent pas de différences statistiques (Test  $t$ ,  $p < 0.01$ ). Une légère augmentation des vitesses VAP et VSL est à noter.

### Conclusions

Dans cette étude, le nombre de spermatozoïdes et les caractéristiques spermatiques chez des rats exposés à des émissions de moteur à combustion ont été suivis. Les animaux ont été exposés soit 4 semaines puis sacrifiés 4 semaines après la fin de l'exposition, soit 8 semaines puis sacrifiés 8 semaines après la fin de l'exposition. Cette méthode permet d'évaluer les phénomènes de récupération. En effet, le caractère reprotoxique d'un produit doit être évalué à la fois par sa capacité à

entraîner des troubles immédiats et ponctuels sur les réserves spermatiques mais également sur sa capacité à provoquer des troubles définitifs au niveau de la spermatogenèse. Les contraintes techniques ne nous ont permis d'évaluer que la deuxième méthode.

Grâce à ce protocole, nous avons pu montrer qu'aucun effet statistiquement significatif n'était présent au niveau du nombre de spermatozoïdes et des caractéristiques spermatiques chez des rats exposés aux émissions de moteur à combustion en comparaison d'animaux exposés à de l'air. Cependant, nous avons noté une diminution du nombre de spermatozoïde au niveau du testicule des animaux exposés 8 semaines puis sacrifiés 8 semaines après la fin de l'exposition. Cette diminution n'étant pas présente au niveau de l'épididyme, il semble qu'il s'agisse plutôt d'un artefact. Des expérimentations complémentaires, en collaboration avec nos collègues statisticiens, permettraient de lever ce doute en réalisant par exemple les études des caractéristiques spermatiques à J+1 post exposition.

poursuite du projet

## 2.3 ETUDES DE L'ELECTROPHYSIOLOGIE CARDIAQUE :

### 2.3.1 Mise en place et caractérisation de l'insuffisance cardiaque chronique chez le cobaye

-Tentative de développement d'une insuffisance cardiaque par ligature coronaire.

Des ligatures coronaires ont été pratiquées sur une série de 10 cobayes, par la technique mise en œuvre chez le rat. Visuellement lors du serrage de la ligature, l'efficacité de l'ischémie s'est révélée très limitée. Cela a été confirmé lors de l'autopsie pratiquée à 30 jours. De plus, l'enregistrement ECG n'a pas permis de mettre en évidence une pathologie arythmique induite par la ligature coronaire chez le cobaye. Cette approche est donc abandonnée au vu de son inefficacité.

-Tentative de développement d'une insuffisance cardiaque par cryogénie ventriculaire

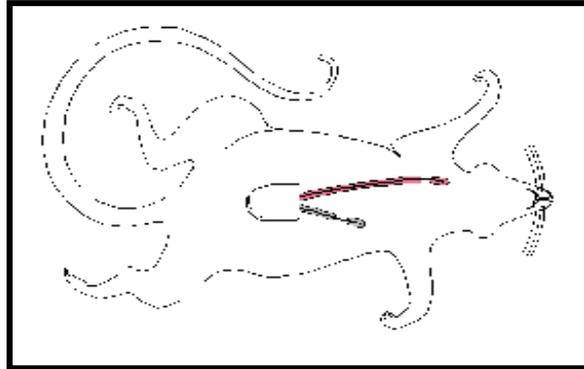
l'induction d'une lésion par cryogénie avec une pièce métallique préalablement immergée dans l'azote liquide mise en contact avec le ventricule gauche du cœur de cobaye a été tentée sur 6 animaux. Visuellement, lors de l'intervention, une fraction importante du ventricule gauche a subi ce choc thermique de congélation décongélation. L'enregistrement ECG n'a pas permis de mettre en évidence une pathologie arythmique chez les animaux ainsi traités. Lors de l'autopsie à 30 jours, il n'est pas noté d'hypertrophie cardiaque ni de nécrose au niveau du ventricule gauche.

Nous ne sommes pas en mesure à ce jour de produire une insuffisance cardiaque chronique chez le cobaye par la mise en œuvre des deux méthodes classiquement décrites dans la littérature et dont l'efficacité est clairement démontrée chez le rat.

### 2.3.2 Implantation des capteurs télémétriques

Après anesthésie au Brietal, les animaux sont implantés d'un capteur ECG placés à l'intérieur de la cavité péritonéale. Le capteur est fixé à la paroi abdominale par du fil non résorbable.

Les deux électrodes partent du capteur, traversent la paroi musculaire sus-jacente et font un trajet en position sous cutanée jusqu'à atteindre la position de dérivation pseudo-D II.



### *Schéma d'implantation du capteur télémétrique*

#### 2.3.3 Logiciels acquisitions/ analyses

##### Acquisition ECG

Les acquisitions des tracés ECG ont été réalisées grâce au logiciel A.R.T. Gold qui permet d'enregistrer 8 animaux (8 capteurs télémétriques) simultanément.

La configuration du système permet l'enregistrement continu et simultané de 6 rats soumis à des émissions moteur diluées et 2 rats soumis à une atmosphère air propre.

##### 2.3.3.1 Analyses ECG

Trois logiciels d'analyse des tracés ECG ont été évalués : *A.R.T.*, *Physiostat* (Data Sciences International) et *ECG Auto* (EMKA).

ART et Physiostat fonctionnent sur le principe d'une reconnaissance de l'onde R (onde de plus forte amplitude sur les tracés ECG). Ils identifient ensuite les autres ondes du complexe ECG (ondes P, Q, S et T) à partir de l'onde R. L'onde Q, par exemple, étant définie comme la première onde négative précédant l'onde R, l'onde T, la première déflexion positive suivant l'onde R.

Le logiciel ECG Auto quant à lui, fonctionne sur le principe de reconnaissance de forme : le logiciel identifie les complexes ECG en fonction d'une bibliothèque de formes établie par l'utilisateur.

### Logiciels d'analyse

Les deux logiciels à notre disposition (*A.R.T* et *Physiostat, Data Sciences International*) se sont avérés performants pour l'analyse de tracés ECG d'animaux sains mais posaient d'importants problèmes pour la détection des événements arythmiques chez les animaux rendus insuffisants cardiaques par ligature coronaire. Ces deux logiciels fonctionnent en effet sur le principe de reconnaissance de l'onde R or les arythmies sont polymorphes et sont difficilement détectables par une simple identification de l'onde R. La méthode par reconnaissance de forme s'est avérée plus performante pour l'identification des arythmies.

Nous avons choisi d'utiliser le logiciel *ECGAuto (EMKA)* qui fonctionne par reconnaissance de formes à partir d'une bibliothèque de complexes ECG définis par l'utilisateur.

De plus, le logiciel *ECGAuto* dispose maintenant, suite au développement à notre demande auprès de la société *EMKA*, d'un module d'invalidation automatique des battements qui permet d'exclure les événements arythmiques. Ce module d'invalidation permet après utilisation de réaliser le calcul des paramètres de variabilité sinusale étudiés (*SDNN*, *RMSSD* et *HRV triangle index*) sur des séries temporelles de *RR* ne conservant que les battements sinusaux à la suite de l'invalidation des événements arythmiques identifiés sur la base de leur forme.

### Limitations de cette approche :

Lorsque pour des raisons de similitudes de forme avec des battements normaux, tout particulièrement lors de la survenue d'arythmies supra-ventriculaires, l'approche ci-dessus ne permet plus de dissocier battements normaux et battements arythmiques. Nous atteignons alors les limites liées à cette procédure.

Dans ce cas, le calcul des paramètres de variabilité cardiaque est entaché d'erreur qui conduit à l'obtention de valeurs élevées de variabilité cardiaque qui sont entachées d'erreur. Pour contourner ce point de blocage méthodologique, nous avons développé une approche utilisant les outils de la dynamique symbolique que nous décrivons ci-dessous.

#### Approche par dynamique symbolique

Une troisième approche de la détection des arythmies par une approche de la dynamique symbolique des séries temporelles de RR a été développée et validée par Stéphane Lorient dans le cadre de son travail de thèse (BRI ADEME-Région Haute Normandie) en partenariat avec le Dr Christophe Letellier (CORIA) et s'est révélée très efficace en terme de quantification automatique des troubles du rythme. Les résultats obtenus avec cette approche basée sur le codage de ruptures de rythme sont décrits ci après.

#### Dynamique symbolique<sup>[i]</sup>

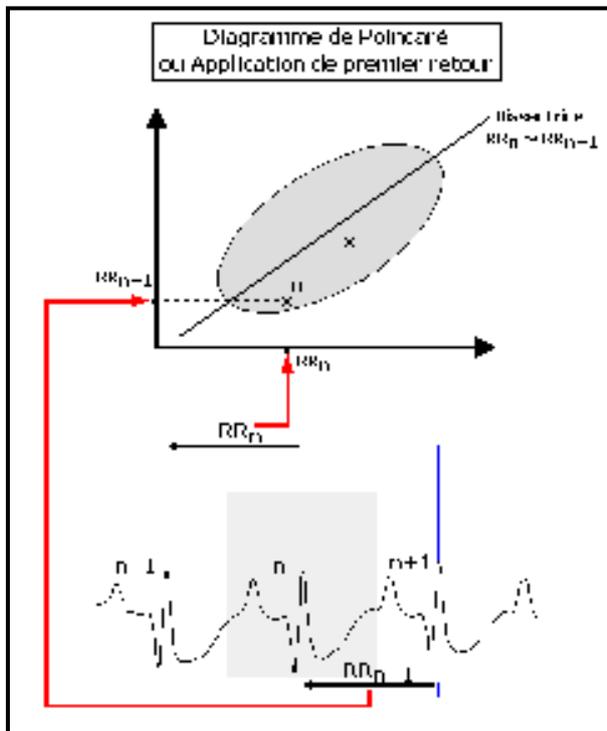
Le but de cette approche est de transformer une série temporelle de données en une succession de codes. Cette série temporelle de codes obtenue servira de base à la recherche et à la quantification automatisée de motifs particuliers, représentatifs d'évènements rythmiques donnés.

#### Diagramme de Poincaré ou Application de premier retour

Construire le diagramme de Poincaré consiste à représenter l'intervalle  $RR_{n+1}$  en fonction de l'intervalle RR précédent,  $RR_n$  (c'est pourquoi le diagramme de Poincaré est également appelé « application de premier retour »).

Sur le diagramme de Poincaré, chaque battement cardiaque, « n » est donc associée à un couple de coordonnées  $[RR_n, RR_{n+1}]$ .

Lorsque le rythme des contractions cardiaques est imposé par le nœud sinusal, l'intervalle  $RR_n$  va être peu différent de l'intervalle  $RR_{n+1}$ . Les points vont donc se positionner le long de la bissectrice ( $RR_n = RR_{n+1}$ ), et le nuage de points va prendre une forme ovoïde, dont l'allongement se

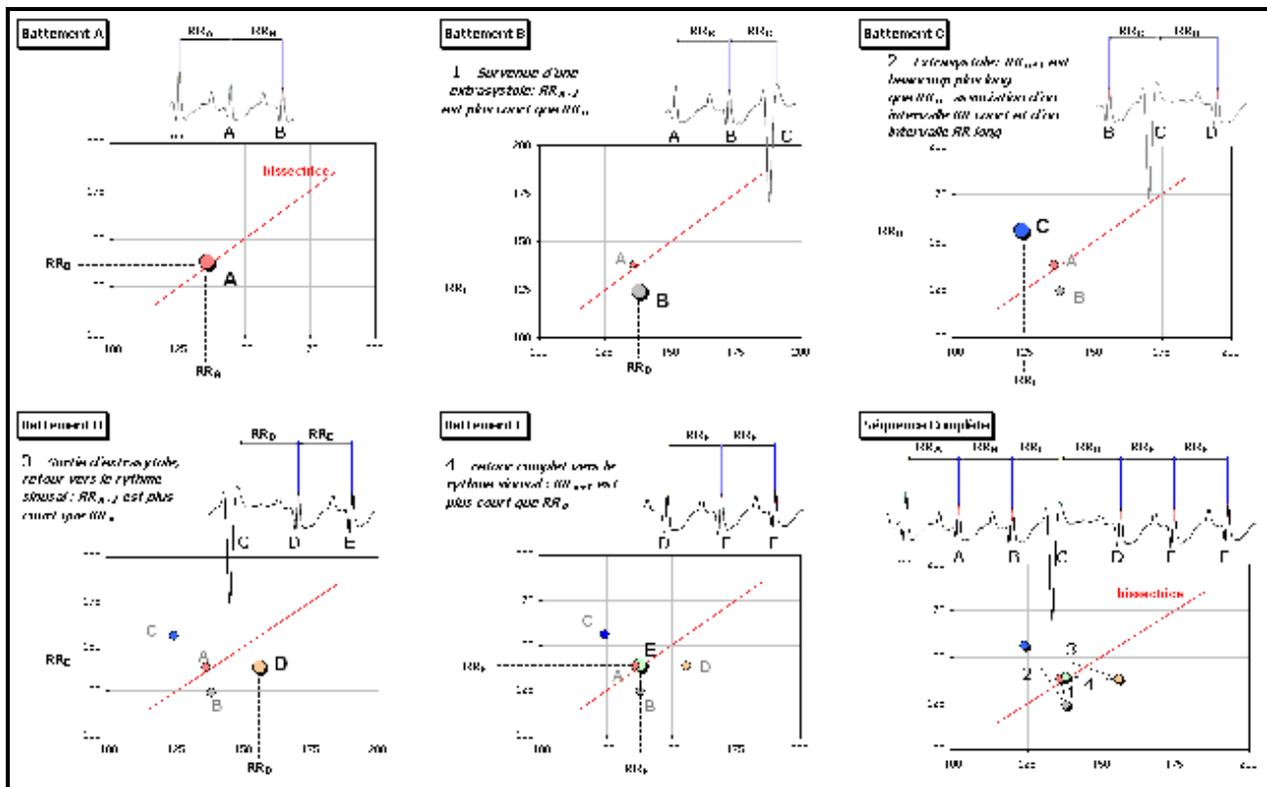


fera le long de la bissectrice (27)

**Figure 27:** Construction du Diagramme de Poincaré ou application de premier retour : ( $RR_{n+1} = F[RR_n]$ ). A chaque contraction cardiaque « n », correspond, sur le diagramme de Poincaré, un point qui est fonction de l'intervalle  $RR_n$  entre la complexe ECG « n » et celui qui le précède (« n-1 ») et de l'intervalle  $RR_{n+1}$  entre le complexe « n » et le complexe « n+1 ».

En revanche, toute rupture de rythme (autrement dit lorsque  $RR_{n+1}$  est très différent de  $RR_n$ ) va être représentée graphiquement par un point qui va s'éloigner de la bissectrice. Quand surviennent un ou plusieurs événements arythmiques, se traduisant par une variation de la longueur des intervalles RR, le nuage de point va prendre une forme plus complexe, d'autant plus complexe que les arythmies seront nombreuses et diversifiées.

La figure 28 montre de quelle façon va être transcrit la survenue d'une extrasystole sur le diagramme de Poincaré.



**Figure 28:** Traduction de la survenue d'une extrasystole sur le nuage de Poincaré.

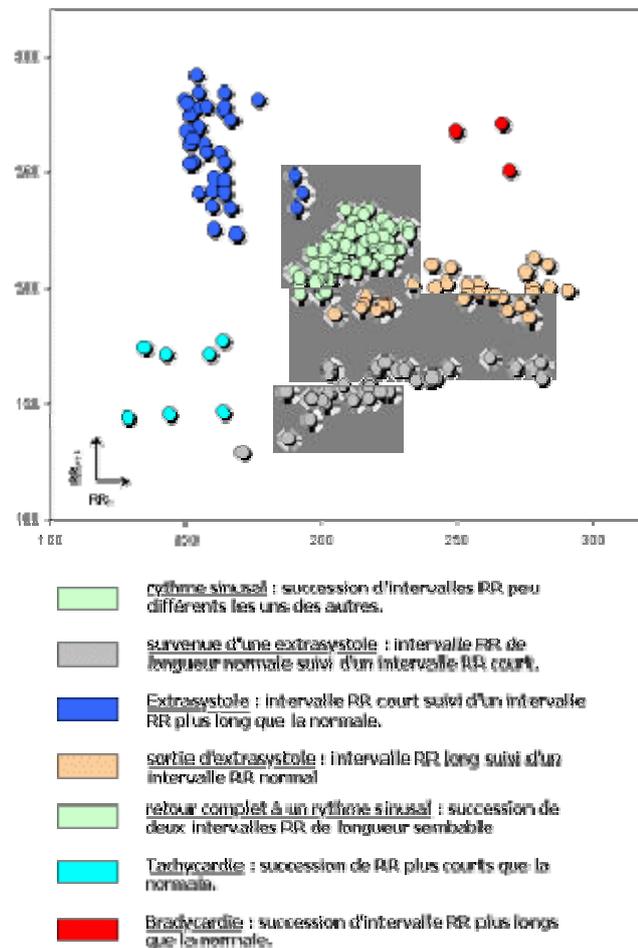
Chaque battement se traduit graphiquement par un point de coordonnées  $[RR_n ; RR_{n+1}]$ .

La succession de contractions cardiaques sinusales ( battements A et E), séparées par des intervalles RR quasi identiques va conduire La survenue d'une extrasystole conduit à l'apparition de 3 points qui s'éloignent de la bissectrice :Le point B  $[RR_B ; RR_C]$  correspondant au battement sinusal précédent l'extrasystole, le point C  $[RR_C ; RR_D]$  correspondant à l'extrasystole, et le point D  $[RR_D ; RR_E]$  qui correspond au battement sinusal suivant l'extrasystole.

Avec un nombre plus important de points, on obtient un nuage de Poincaré beaucoup plus complexe du type de celui présenté sur la figure ci-contre. Il s'agit de la représentation d'une séquence de 1000 battements d'un rat insuffisant cardiaque présentant des troubles du rythme de type extrasystole, bradycardie et tachycardie.

Figure 29 : Diagramme de Poincaré d'un rat insuffisant cardiaque – Signification de la position des points.

Le diagramme de Poincaré ou Application de premier retour, permet donc de dégager graphiquement, la variabilité de battement à battement à partir de la forme prise par le nuage de points. L'étude de la variabilité cardiaque *via* la dynamique symbolique, permet de quantifier la complexité du nuage de Poincaré.



Objectifs de la dynamique symbolique

L'approche par dynamique symbolique a donc été initiée pour tenter de décrire la complexité du nuage de Poincaré et, par conséquent, la manière dont les intervalles RR s'enchaînent au cours du temps.

Cette approche a également permis de répondre à deux autres problèmes :

la comparaison de 2 animaux insuffisants cardiaques pour lesquels un simple dénombrement du nombre d'extrasystole n'est parfois pas suffisant la détection et l'invalidation des extrasystoles supra-ventriculaires de forme quasi-identique à une contraction cardiaque normale qui ne peuvent être identifiés de façon satisfaisante à partir d'une reconnaissance de forme.

Il est en effet impossible de comparer deux animaux souffrant d'arythmies et présentant un nombre semblable d'extrasystoles. Se contenter de dénombrer ces arythmies reviendrait à dire que ces 2 animaux sont atteints de la même façon alors qu'il peut en être autrement.

En effet, si, par exemple, chez l'un des animaux, le nombre d'arythmies est réparti sur l'ensemble de la période étudiée alors que chez le second toutes les arythmies surviennent en même temps, un simple dénombrement du nombre d'extrasystoles ne permettra pas de dégager une différence entre ces deux animaux. Or, en terme d'impact sur la fonction cardiaque, des arythmies successives, qui ne vont pas laisser le temps au cœur de récupérer, n'ont pas les mêmes conséquences qu'un nombre identique d'arythmies réparties sur une plus longue période.

La dynamique symbolique qui va s'intéresser à la dynamique instantanée des complexes ECG, la façon dont s'enchaînent les intervalles RR, permet de dégager une différence entre ces deux animaux en identifiant la façon dont se répartissent les événements arythmiques au cours du temps.

Le développement d'une étude de la fréquence cardiaque via la dynamique symbolique devait également répondre au problème d'identification des extrasystoles supra-ventriculaires dont la morphologie est très proche de celle d'un complexe ECG normal. Les analyses des tracés ECG basées sur la forme (logiciel *Ecg Auto*) ne permettant pas une identification satisfaisante de ce type d'extrasystole du fait d'une trop forte similitude avec les complexes ECG normaux (contractions initiées par le nœud sinusal). Compte tenu de leur fréquente survenue lors des expositions à des atmosphères oxydantes, il était nécessaire de mettre au point un outil permettant de les identifier, de les quantifier pour ensuite pouvoir les invalider et permettre ainsi le calcul des paramètres HRV sur des séquences temporelles de RR correspondant exclusivement à des battements sinusaux..

L'objectif de l'approche en dynamique symbolique a donc été de développer un outil permettant d'identifier les événements arythmiques

(tachycardie, bradycardie, extrasystoles ventriculaires et supra-ventriculaires) et la manière dont ils s'enchaînent au cours du temps pour ensuite permettre leur invalidation, nécessaire au calcul des paramètres HRV étudiés (SDNN, RMSSD, et HRV index).

### Principe

La dynamique symbolique consiste à convertir l'évolution temporelle d'une grandeur physique (ici, l'évolution temporelle des intervalles RR) en une suite d'éléments choisis parmi un petit nombre de symboles (généralement, des entiers) afin de décrire la séquence d'enchaînement des symboles.

Ainsi, lorsque l'on étudie l'évolution temporelle des intervalles RR, chacun de ces intervalles RR est converti en un symbole. Procéder de cette manière peut conduire à une perte d'information sur la dynamique mais des invariants, des propriétés robustes de la dynamique sont conservées.

La première étape est de définir une description symbolique adéquate autrement dit, de définir une partition permettant la conversion de la série temporelle en une série de symboles.

Le choix s'est porté sur la définition d'une partition conduisant à l'équiprobabilité de la visite de chaque symbole : les intervalles RR moyens sont codés par « 1 », les RR courts par « 0 » et les RR longs par « 2 ».

<b>Intervalle RR</b>	<b>Symbole</b>
RR court	0
RR moyen	1
RR long	2

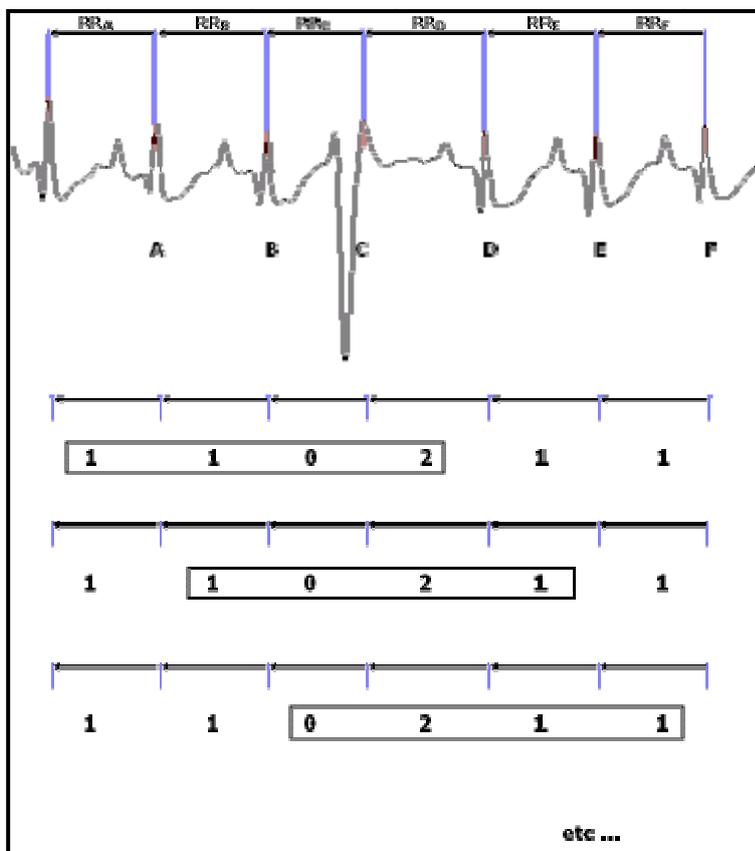
Dans une étude datant de 1995 [ii], une série de quatre symboles a été utilisée pour traiter des intervalles RR chez l'homme. Nous avons repris cette définition.

Ainsi, lorsque l'on s'intéresse à une série de 4 symboles pour une partition à 3 symboles (« 0 », « 1 » et « 2 »), il existe  $3^4 = 81$  combinaisons possibles.

Une fréquence cardiaque stable représentée par une succession d'intervalles RR normaux, sinusaux, codés par « 1 », va alors correspondre à la séquence « 1111 ». La séquence « 2222 » va quant à elle correspondre à une succession d'intervalles RR longs, autrement dit à un épisode de bradycardie (diminution de la fréquence cardiaque). Le début de l'épisode sera codé par les séquences « 1112 » mais aussi, si l'on décale le cadre de lecture (*Figure 30*), par les séquences « 1122 » et « 1222 » alors que la fin d'un épisode bradycardique sera identifiée par les intervalles « 2111 », « 2211 » et « 2221 ».

A l'inverse, la séquence « 0000 », une succession d'intervalles RR courts, révélera un épisode tachycardique.

Le début d'un épisode de tachycardie correspondra à la séquence « 1000 » (ainsi que « 1100 » et « 1110 » selon le battement sur lequel se positionne le cadre de lecture) et la fin de cet épisode à la séquence « 0002 » (une tachycardie arythmique se terminant le plus souvent par la survenue d'un RR long de façon analogue à un battement suivant une extrasystole).



La survenue d'une extrasystole, une contraction du myocarde qui survient plus tôt que la normale (conduisant donc à un intervalle RR raccourci, codé par « 0 ») et qui

est suivi d'une pause compensatrice (un intervalle RR allongé, codé par « 2 »), va se caractériser par une séquence « 1021 » qui représente un intervalle RR normal (« 1 »), suivi d'un intervalle RR court (« 0 », survenue de l'extrasystole) puis d'une intervalle RR long (« 2 », pause compensatrice) avant le retour à un intervalle RR normal (« 1 »).

Plusieurs séquences peuvent correspondre à la survenue d'une extrasystole selon le battement sur lequel se cale le cadre de lecture. Cependant, la séquence complète, « 1021 », reste celle qui décrit le mieux l'apparition d'une extrasystole.

Le tableau suivant présente quelques séquences d'intérêt et le tracé ECG correspondant.

Séquence	Signification	Tracé ECG correspondant
« 1 1 1 1 »	<p><b>Rythme sinusal</b></p> <p><i>Le cœur se contracte à un rythme régulier imposé par le nœud sinusal</i></p>	
« 1 0 2 1 »	<p><b>Extrasystole</b></p> <p><i>Survenue d'un battement anormal suivi d'une pause compensatrice</i></p> <p><i>Elle peut être ventriculaire ou supra-ventriculaire selon la position du foyer ectopique</i></p>	
« 0 0 0 0 »	<p><b>Tachycardie Non soutenue</b></p> <p><i>Diminution transitoire de la durée de l'intervalle RR</i></p> <p><i>(augmentation de la fréquence cardiaque)</i></p>	

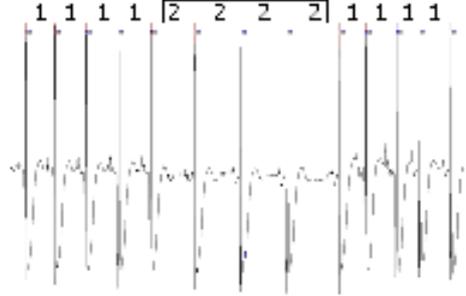
« 2 2 2 2 »	<p style="text-align: center;"><b>Bradycardie Non Soutenue</b></p> <p style="text-align: center;"><i>Augmentation transitoire de la durée de l'intervalle RR (diminution de la fréquence cardiaque)</i></p>	
-------------	---	--

Tableau 6 : Séquences d'intérêt en dynamique symbolique

Afin de déterminer quelles sont les bornes de chacun de ces 3 symboles, il est nécessaire de définir une valeur moyenne de l'intervalle RR pour chaque période analysée en dynamique symbolique autrement dit, les bornes qui permettent de qualifier un intervalle RR de court, long ou normal.

Méthodes de détermination de l'intervalle RR moyen

La détermination de bornes d'après lesquelles il est possible de dire qu'un intervalle RR est long, court ou moyen (qu'il sera codé, respectivement « 2 », « 0 » ou « 1 ») pose un certain nombre de problèmes.

La principale difficulté rencontrée lorsqu'il s'agit de déterminer les bornes nécessaires au codage est due à la variabilité de l'intervalle RR moyen au cours du temps en dehors de tout événement arythmique.

Dans cette étude, les analyses étant réalisées sur une durée de 3 heures, la fréquence cardiaque peut varier de façon importante sur la période étudiée selon que l'animal est actif, stressé ou au repos. Si les arythmies de type extrasystoles restent relativement faciles à extraire, la difficulté réside dans la différenciation des bradycardies et des tachycardies qui peuvent être arythmiques ou non.

Plusieurs approches ont été envisagées pour déterminer les bornes selon lesquelles les intervalles RR seront identifiés comme courts, normaux ou longs :

à partir de la distribution des intervalles RR

à partir de la distribution des intervalles RR filtrés (filtre passe-haut)

à partir des différences entre les intervalles  $RR_{n-1}$ ,  $RR_n$  et  $RR_{n+1}$

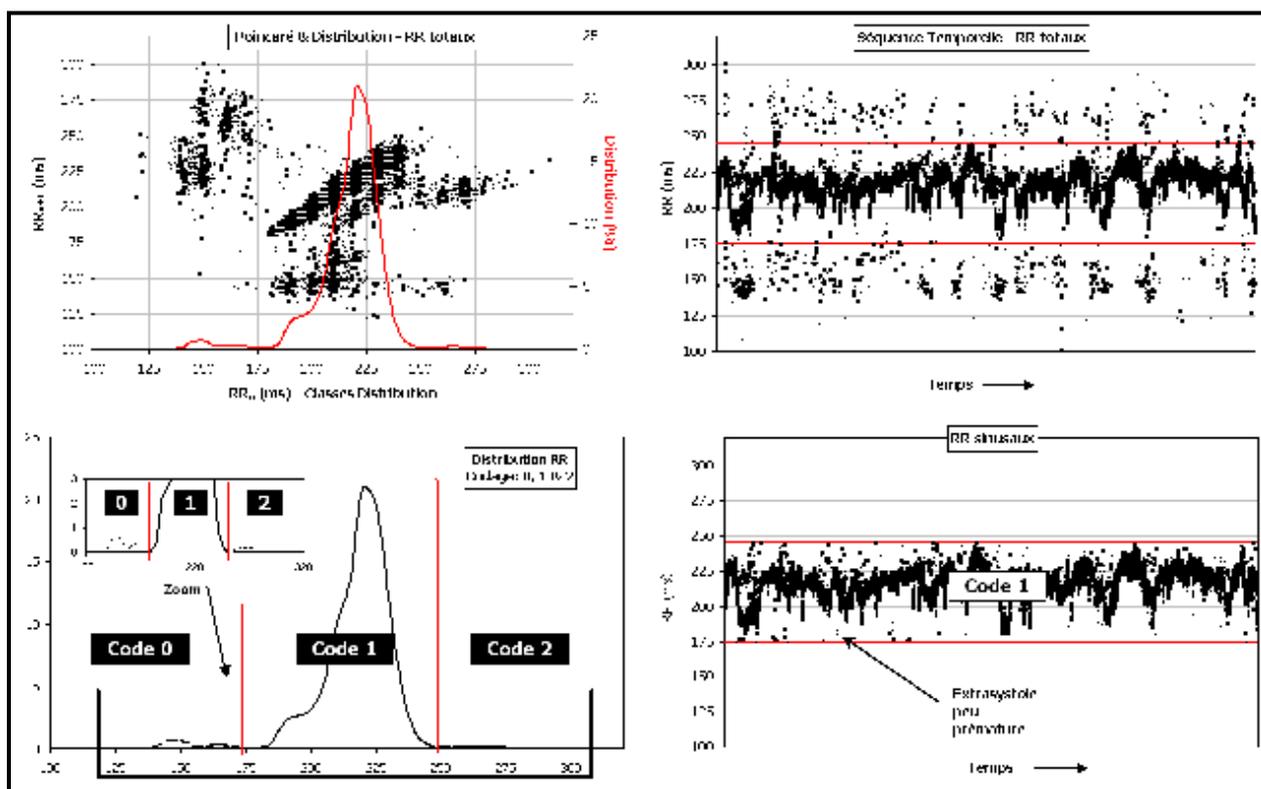
Pour chacune de ces méthodes, l'analyse en dynamique symbolique des intervalles RR a été réalisée grâce à des routines d'analyse programmées sous « R » (version 2.1.1).

Trois approches de traitement des séries temporelles de RR ont été développées successivement, répondant à la nécessité de traiter des données de plus en plus complexes liées à l'évolution du signal électrophysiologique induite par l'inhalation des aérosols de combustion.

### 2.3.3.2 Première méthode : Distribution des intervalles RR

La première méthode de détermination de la durée moyenne des intervalles RR a avoir été testée est basée sur la distribution des intervalles RR.

La courbe de distribution des intervalles RR est tracée, les bornes sont placées afin d'extraire le pic central de la distribution qui représente les intervalles RR réguliers (sinusaux) codés par « 1 », les intervalles RR courts du pic de gauche sont codés par « 0 », ceux du pic de droite par « 2 » (RR longs).

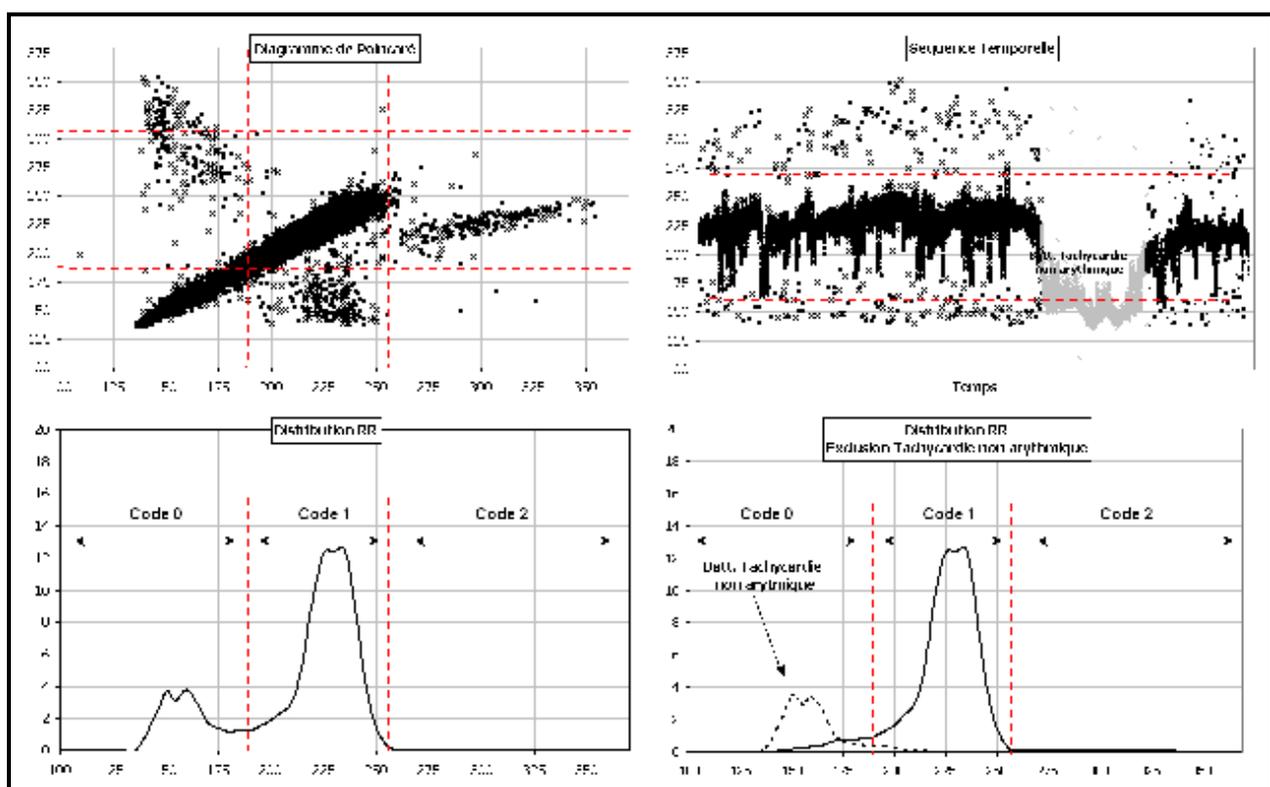


**Figure 31** : Détermination du RR moyen à partir de la distribution des intervalles RR. Le pic médian de la distribution des intervalles RR représente les RR sinusaux. Il est délimité par des bornes (traits rouges) afin d'effectuer le codage. Les intervalles RR du pic central sont codés par 1, les RR courts du pic de gauche, plus courts, sont codés par 0 et les RR longs du pic de droite par 2.

Cette méthode est apparue comme ne convenant pas à la durée des séquences d'intervalles RR étudiées. Les analyses sont en effet effectuées sur une série d'intervalles RR enregistrée durant 3 heures, ce qui représente une série de près de 60 000 battements. Or, durant cette période, la fréquence des intervalles RR sinusaux peut varier considérablement en fonction de l'état de l'animal (veille, déplacements, prise de nourriture, stress...).

Les périodes de stress et d'activité importante, par exemple, engendrent une tachycardie relative non arythmique : lors de l'activité de l'animal, la fréquence cardiaque augmente (la durée des intervalles RR diminue) ,pour notamment, accroître l'apport de nutriments et d'oxygène vers les muscles qui se contractent.

Or, ces périodes où la fréquence cardiaque augmente pour répondre aux besoins de l'organisme, conduit à l'apparition d'un pic supplémentaire sur la courbe de distribution ( figure suivante). Ce pic recouvre le pic dû aux évènements arythmiques et il est alors impossible de placer des bornes pour exclure les battements longs et courts caractéristiques des extrasystoles, notamment.



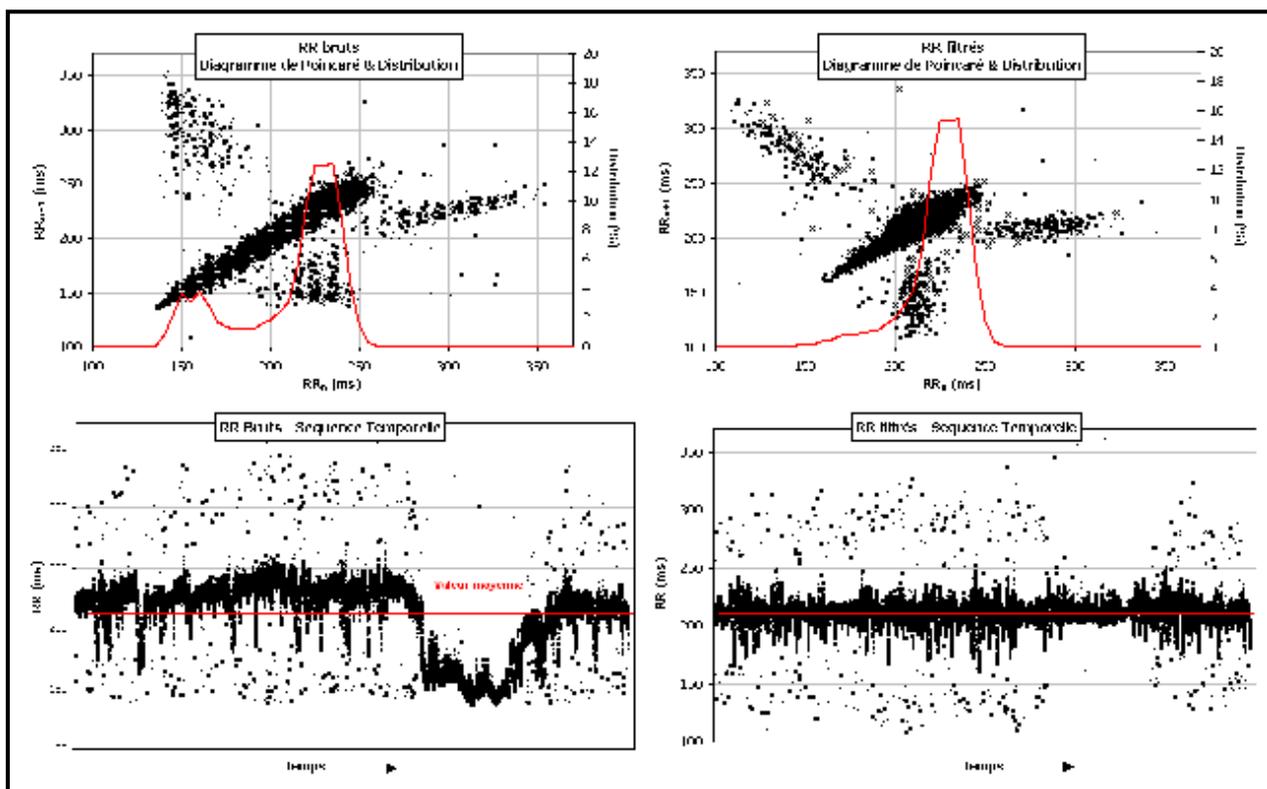
**Figure 32** : Emergence du pic de tachycardie non arythmique sur la courbe de distribution des intervalles RR.

### 2.3.3.3 Deuxième méthode : Distribution des intervalles RR filtrés

Le filtrage de séries d'intervalles RR permet de palier au problème de la tachycardie non arythmique.

La séquence des intervalles RR est filtrée par un filtre passe-haut qui va calculer la différence de chaque battement avec valeur moyenne de l'ensemble des battements et rapporter chacun d'eux à une valeur moyenne (33).

Ce filtrage permet de ramener les périodes de tachycardie et de bradycardie non arythmiques vers des valeurs de RR moyennes. Le filtrage ne modifie pas la moyenne des intervalles RR, en revanche, l'écart type diminue d'autant plus que les



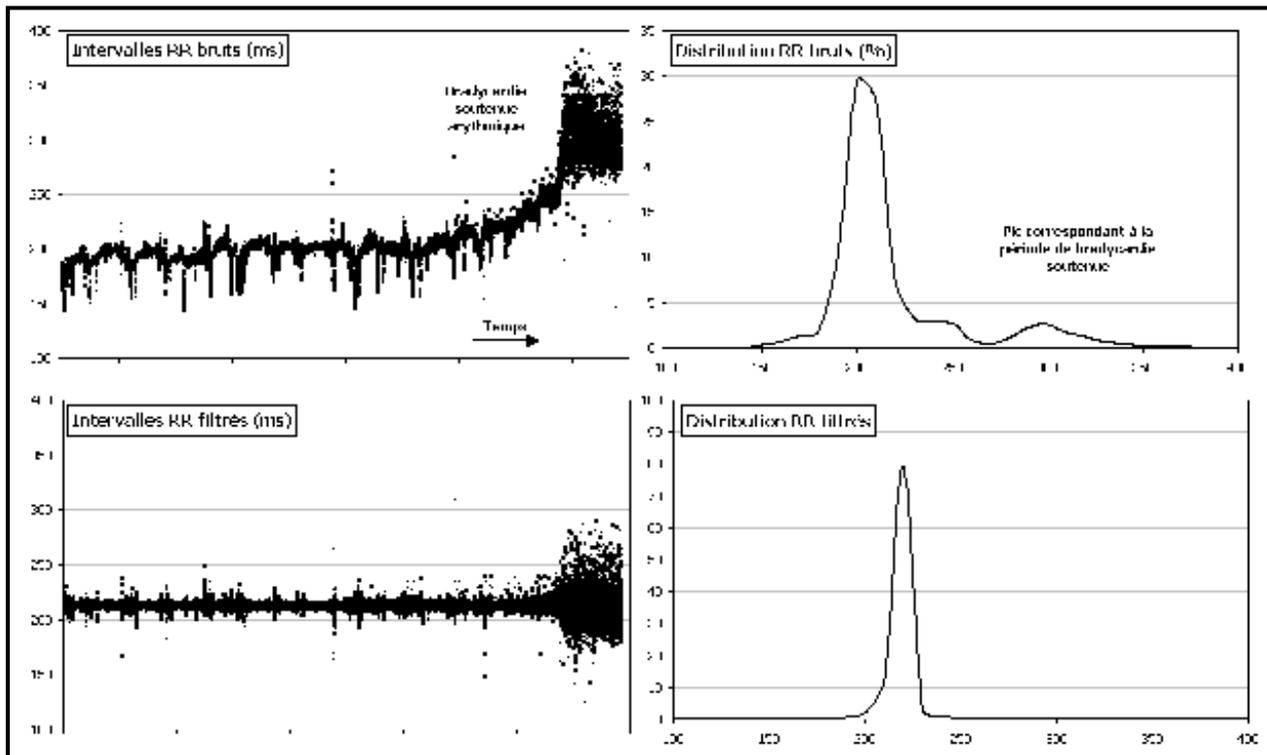
intervalles RR sont filtrés.

**Figure 33** : Effet du filtre passe-haut sur la séquence des intervalles RR

L'inconvénient principal du filtrage concerne les séquences bradycardiques ou tachycardiques arythmiques de longue durée. Dans ces 2 cas, le filtre va avoir tendance à lisser les intervalles RR correspondant aux évènements arythmiques.

La figure suivante présente l'impact du filtrage sur une séquence temporelle d'intervalles RR se terminant pour une longue période de bradycardie.

On peut constater que le filtre va relever les valeurs de RR sinusaux et lisser de façon considérable la différence existant entre ces intervalles RR sinusaux et les intervalles RR correspondant à la période de bradycardie. Le pic représentant la période de bradycardie disparaît de la courbe de distribution rendant difficile voire impossible l'extraction des battements bradycardiques et donc, le codage.



**Figure 34** : Effet du filtrage (filtre passe-haut, 0.01Hz) sur les longues séquences arythmiques. Le filtre passe-haut a pour effet de faire disparaître le pic de la distribution traduisant la présence de la longue séquence de bradycardie. Il est dès lors impossible de placer des bornes afin d'extraire cette séquence et d'effectuer le codage des intervalles RR.

#### 2.3.3.4 Troisième méthode : Différences entre les intervalles $RR_{n-1}$ , $RR_n$ et $RR_{n+1}$

La dernière méthode envisagée pour déterminer le RR moyen est basée sur les différences entre chaque intervalle,  $RR_n$ , l'intervalle qui le précède ( $RR_{n-1}$ ) et celui qui le suit ( $RR_{n+1}$ ).

Elle est constituée de 2 étapes :

Une étape de différenciation des battements réguliers et des battements irréguliers via le calcul d'une fonction  $F_{RR_n}$ , dont la valeur va dépendre de l'écart entre l'intervalle  $RR_n$  et les intervalles  $RR_{n-1}$  et  $RR_{n+1}$ .

Une seconde étape de comparaison de chaque intervalle  $RR$  avec les battements identifiés comme réguliers qui le précèdent et le suivent.

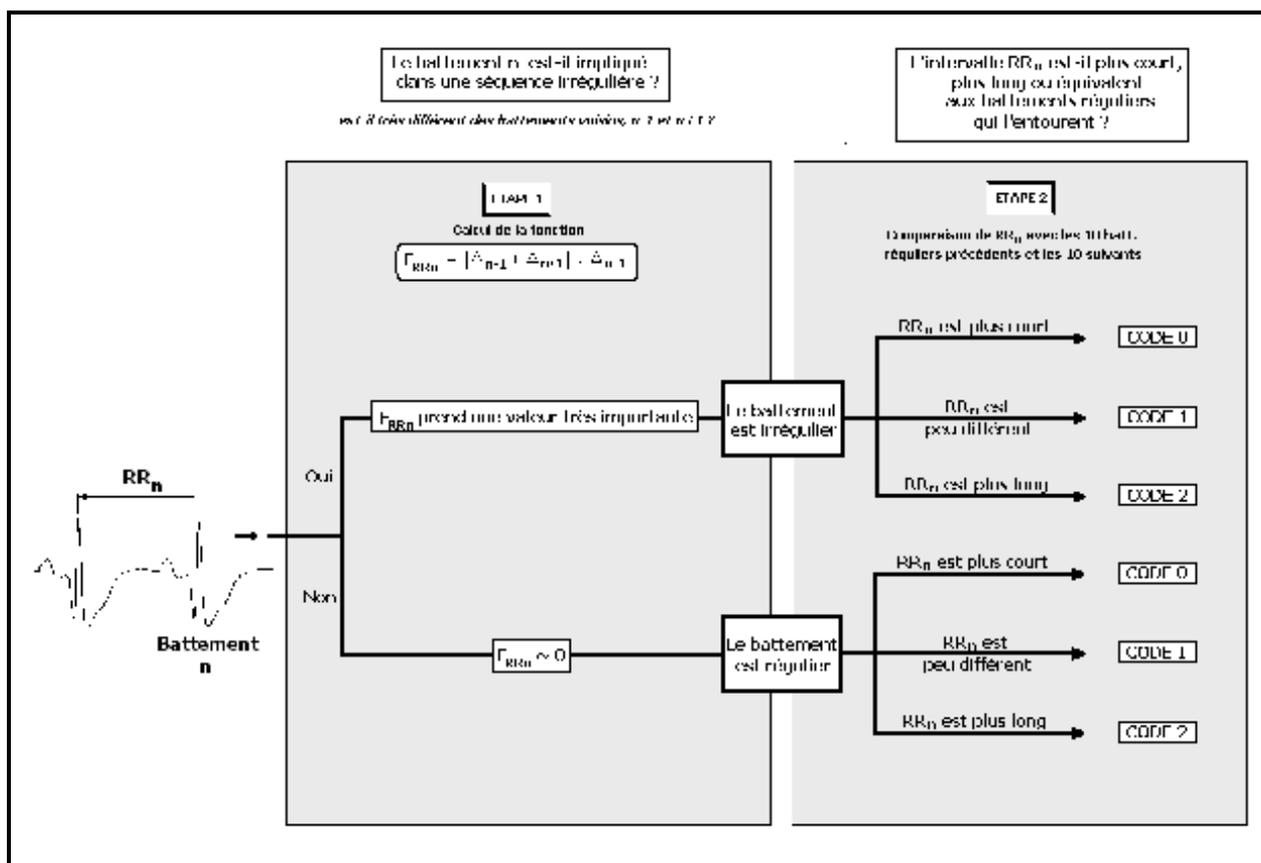


Figure 34 : Diagramme de stratégie de codage méthode 3 :

ÉTAPE 1 : Différenciation des battements réguliers et irréguliers

Cette étape se base sur la définition même d'une arythmie : une rupture de rythme. Elle a pour but d'identifier toutes les modifications brutales de la fréquence instantanée, de battement à battement.

On appelle ici battement régulier un battement qui n'est pas impliqué dans une séquence arythmique révélatrice d'une rupture de rythme, c'est à dire, un battement faisant partie d'une des trois séquences suivantes si le battement « n » considéré est le battement central du trio :

« 111 » (rythme sinusal)

« 000 » (tachycardie)

« 222 » (bradycardie).

Dans ce cas, l'intervalle  $RR_n$  régulier est peu différent des intervalles  $RR_{n-1}$  et  $RR_{n+1}$ .

Les battements considérés comme irréguliers sont tous les battements qui sont impliqués dans une rupture de rythme autrement dit, tous les battements compris dans une séquence autre que les séquences « 111 », « 000 » ou « 222 ». Pour chacun de ces battements, l'intervalle  $RR_n$  est très différent de l'intervalle  $RR_{n-1}$  et/ou de l'intervalle  $RR_{n+1}$ .

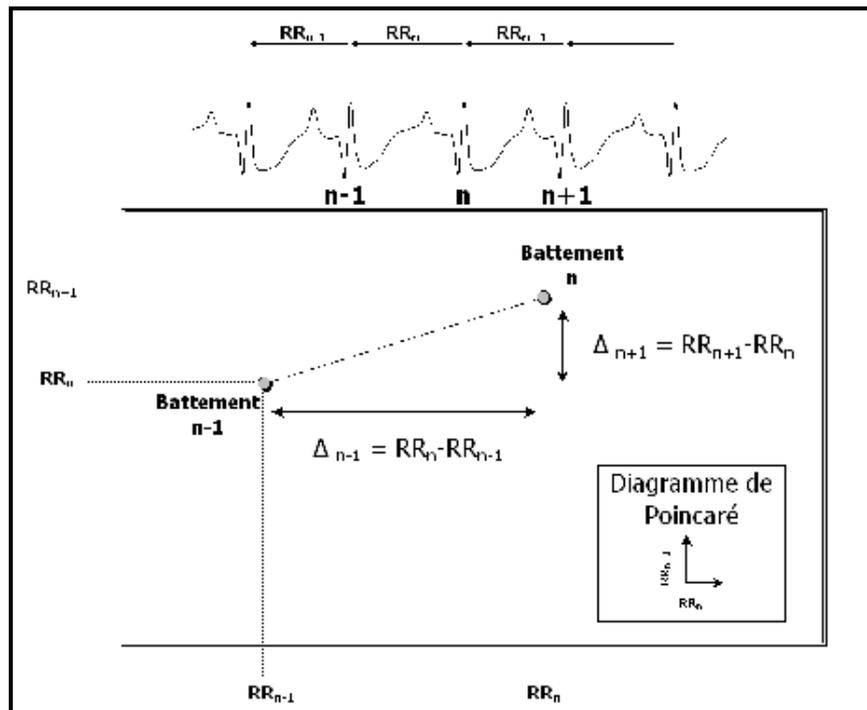
La différenciation des intervalles RR réguliers et irréguliers repose sur les différences entre l'intervalle  $RR_n$  et les intervalles  $RR_{n-1}$  et  $RR_{n+1}$ .

Pour chaque intervalle RR, on calcule la différence avec le battement qui le précède ( $\Delta_{n-1} = RR_n - RR_{n-1}$ ) et le battement qui le suit ( $\Delta_{n+1} = RR_{n+1} - RR_n$ ). On calcule ensuite pour chaque battement la fonction suivante,  $F_{RRn}$  :

$$F_{RRn} = | \Delta_{n-1} + \Delta_{n+1} | \cdot \Delta_{n+1}$$

Où  $| \Delta_{n-1} + \Delta_{n+1} |$  est la valeur absolue de la somme  $\Delta_{n-1} + \Delta_{n+1}$ .

Graphiquement, pour le battement « n », la fonction  $F_{RRn}$  va estimer la distance parcourue sur le diagramme de Poincaré entre le point correspondant au battement « n-1 » de coordonnées  $[RR_{n-1}; RR_n]$  et le point correspondant au battement n de coordonnées. Concrètement, plus l'intervalle  $RR_n$  va être différent des intervalles  $RR_{n-1}$  et  $RR_{n+1}$  et plus la distance entre ces 2 points va être importante. La valeur de la fonction  $F_{RRn}$  va traduire l'éloignement des ces 2 points.



Figure

35 :

Correspondance graphique de la fonction  $F_{RR_n}$ .

La fonction  $F_{RR_n}$  fonction va donc prendre :

des valeurs très élevées lorsque l'intervalle  $RR_n$  est très différent des intervalles  $RR_{n-1}$  et  $RR_{n+1}$  (c'est le cas des intervalles RR courts et longs de la séquence « 1021 »)

des valeurs moyennes lorsque l'intervalle  $RR_n$  est très différent de l'intervalle  $RR_{n-1}$  ou  $RR_{n+1}$  (cas des entrées en tachycardie, séquence « 10 », et bradycardie, séquence « 12 »)

des valeurs proche de 0 lorsque l'intervalle  $RR_n$  est sensiblement de la même longueur que les intervalles  $RR_{n-1}$  et  $RR_{n+1}$  (cas des séquences « 1111 », « 0000 » et « 2222 », il n'y a alors pas de rupture du rythme).

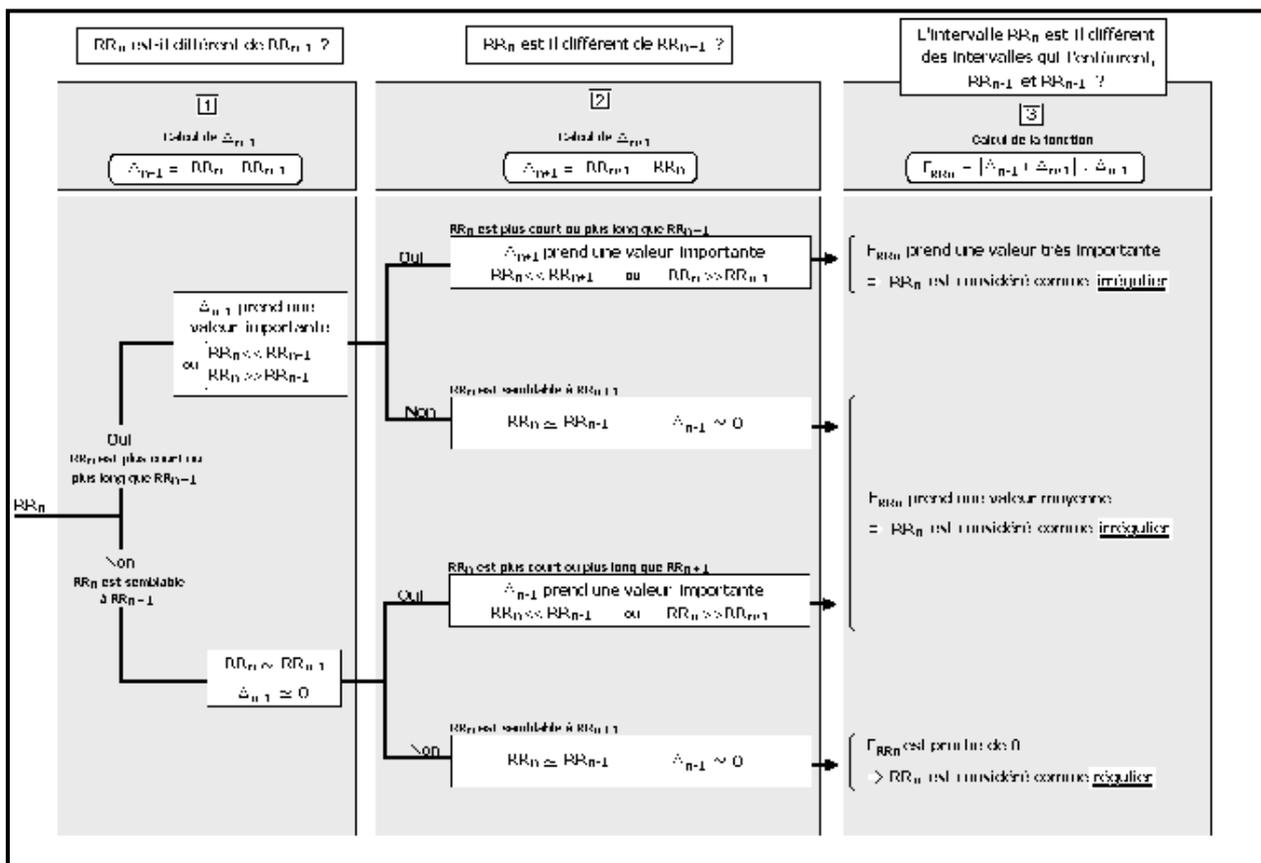


Figure 36 : Principe d'identification des intervalles RR réguliers et irréguliers selon les valeurs prises par la fonction  $F_{RR_n}$ , calculée pour chacun des battements.

Il est à noter que tous les intervalles RR normaux, sinusaux, qui précèdent ou suivent une arythmie, autrement dit tous les battements « 1 » des séquences « 10 », « 12 », « 01 » et « 21 », vont être identifiés comme étant irréguliers puisque la différence entre la durée de l'intervalle  $RR_n$  codé « 1 » et l'intervalle suivant ( dans le cas des séquences « 12 » et « 10 ») ou précédent (dans le cas des séquences « 01 » et « 21 ») va être importante. La seconde étape de la méthode permet de les distinguer. Les figures suivantes présentent la manière dont seront identifiés

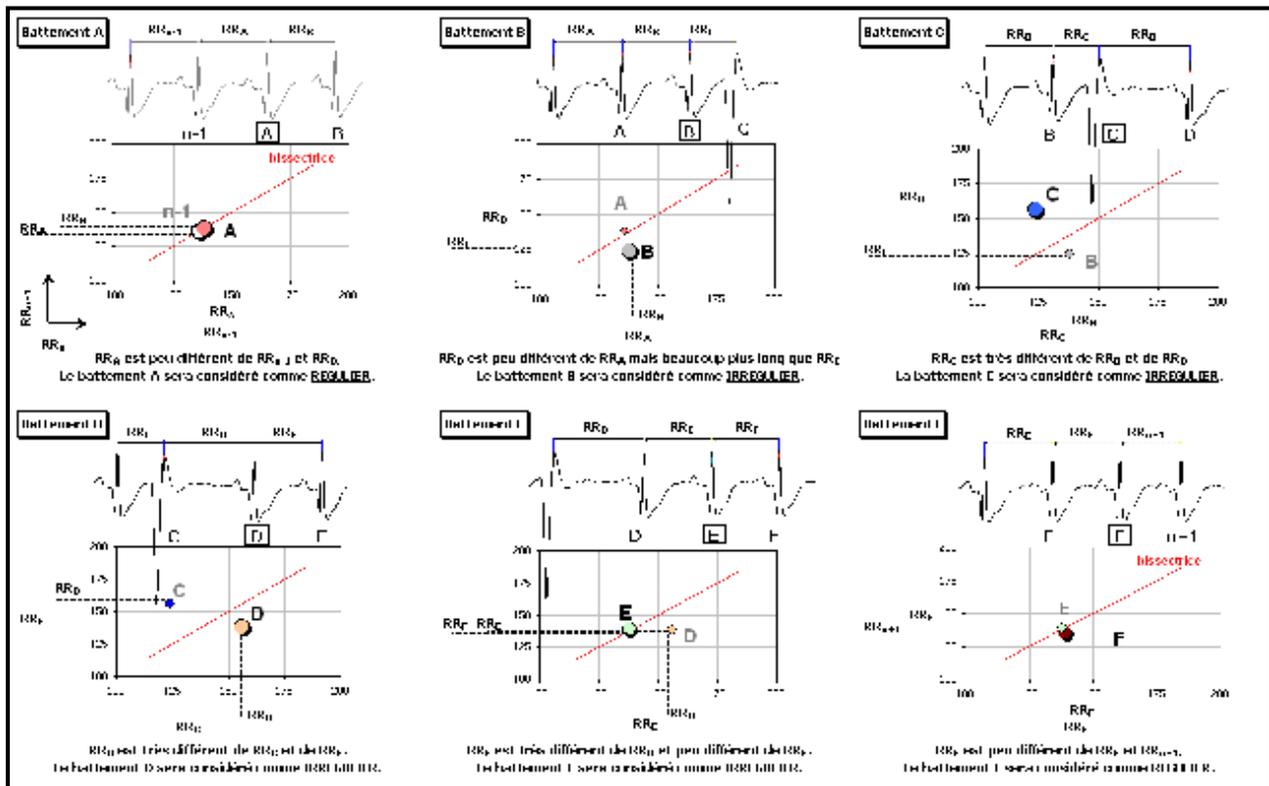


Figure 37a: Identification des battements réguliers et irréguliers – Cas de la survenue d’une extrasystole.

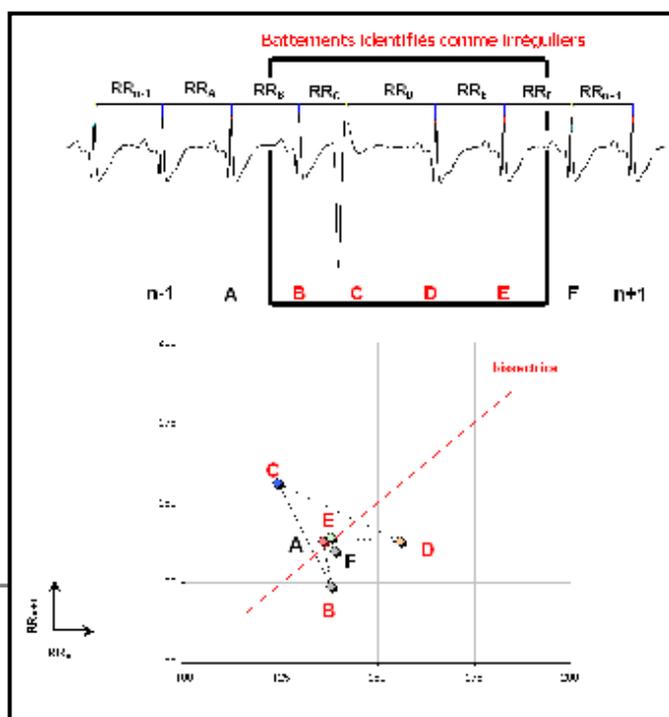


Figure 37b : Identification des battements réguliers et irréguliers – Cas de la survenue d’une extrasystole – Séquence Complète.

La distribution de l’ensemble des valeurs prises par la fonction  $F_{RRn}$  permet de dégager un pic central, centré sur 0 qui correspond aux valeurs de RR réguliers (*Figure 38*) : ce pic est délimité par 2 bornes définies par l’utilisateur.

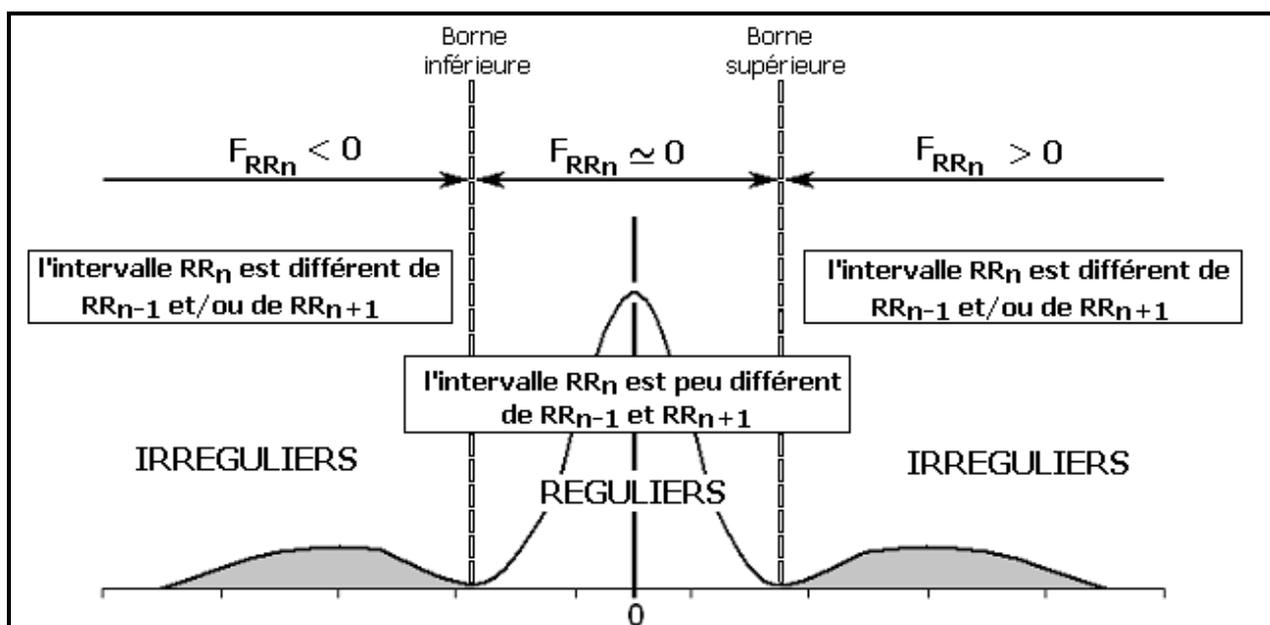


Figure 38 : Méthode d’identification des intervalles RR réguliers et irréguliers à partir de la distribution des valeurs de  $F_{RRn}$ .

La distribution des valeurs de la fonction  $F_{RRn}$  permet donc d’extraire tous les battements réguliers qui ne sont pas concernés par le déclenchement d’une arythmie.

Sont donc identifiés comme irréguliers :

Le battement sinusal qui précède :

la survenue d'une extrasystole,  
une entrée en tachycardie,  
une entrée en bradycardie,  
le battement sinusal qui va suivre :  
une extrasystole,  
un épisode de tachycardie,  
un épisode de bradycardie.

A l'inverse, les battements tachycardes (séquence « 0000 ») ou bradycardes (séquence « 2222 ») vont être identifiés comme réguliers puisque les différences entre ces battements sont faibles et donc, la valeur de la fonction  $F_{RRn}$  proche de 0.

L'identification des battements réguliers et irréguliers des principales séquences arythmiques est présentée sur la *Figure* .

L'utilisation des valeurs de la fonction  $F_{RRn}$ , conduit donc à la constitution de 2 groupes de battements :

- les battements réguliers (aux valeurs  $F_{RRn}$  faibles) qui comprennent les séquences « 0000 », « 1111 » et « 2222 ».
- les battements irréguliers (aux valeurs  $F_{RRn}$  moyennes ou élevées) qui représentent toutes les autres séquences.

Il est alors nécessaire d'identifier d'une part les séquences « 0000 » et « 2222 » qui sont incluses dans le groupe des battements réguliers et d'autre part les battements sinusaux (code 1) qui précèdent ou suivent une arythmie et qui ont été identifiés comme irréguliers. C'est le rôle de la deuxième étape.

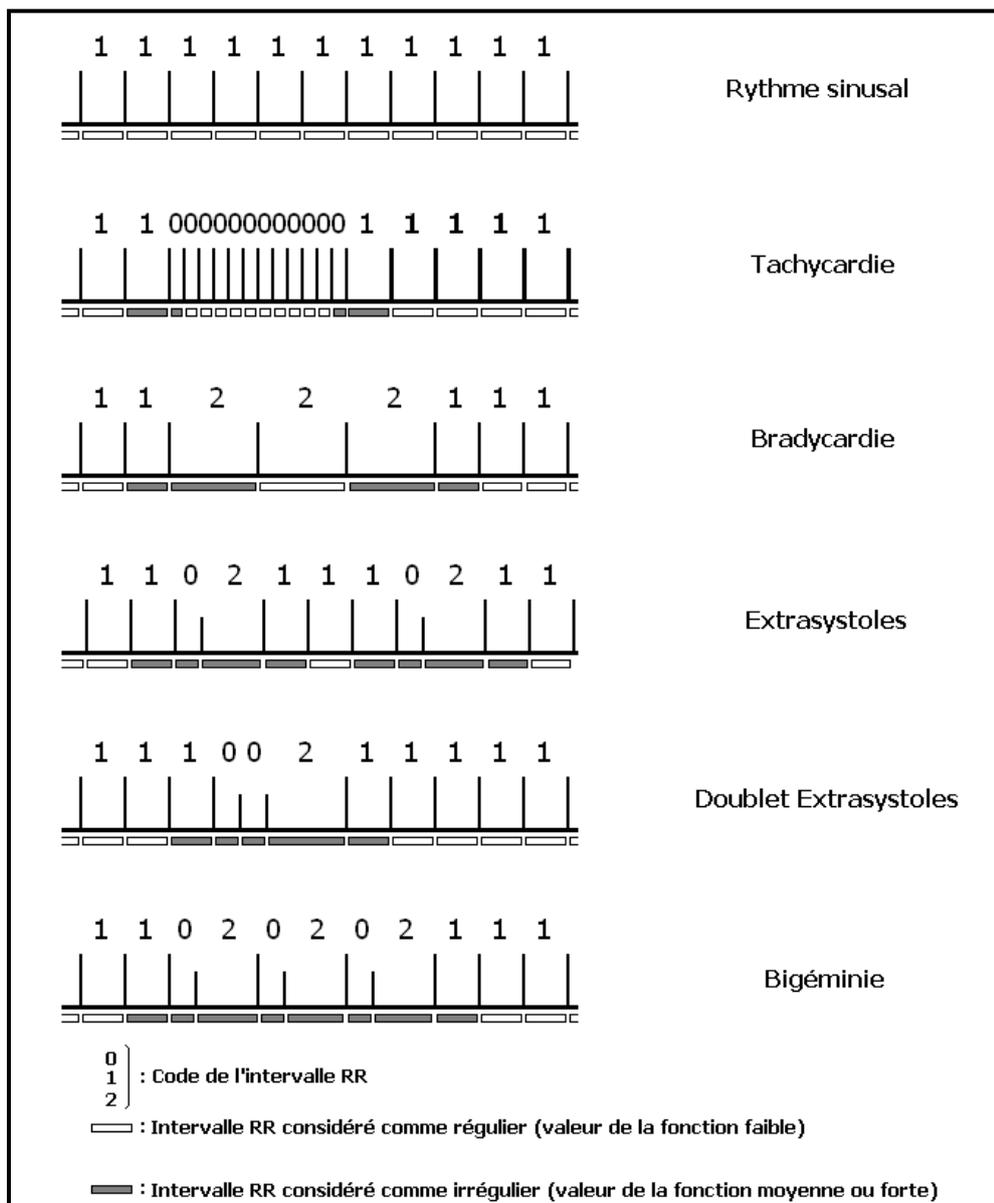


Figure 39 : Différenciation de battements réguliers et irréguliers par les valeurs de la fonction  $F_{RRn}$ . Les battements sinusaux (code 1) qui précèdent ou suivent une arythmie sont considérés comme irréguliers. Les battements des séquences « 0000 » et « 2222 » sont considérés comme réguliers.

Etape 2 : Comparaison  $RR_n$  et valeur de référence : Codage « 0 », « 1 », « 2 »

Le principe de cette deuxième étape est de comparer chaque intervalle RR avec les battements qui ont été identifiés comme réguliers qui l'entourent. La comparaison est faite avec les 10 battements réguliers précédents et les 10 suivants.

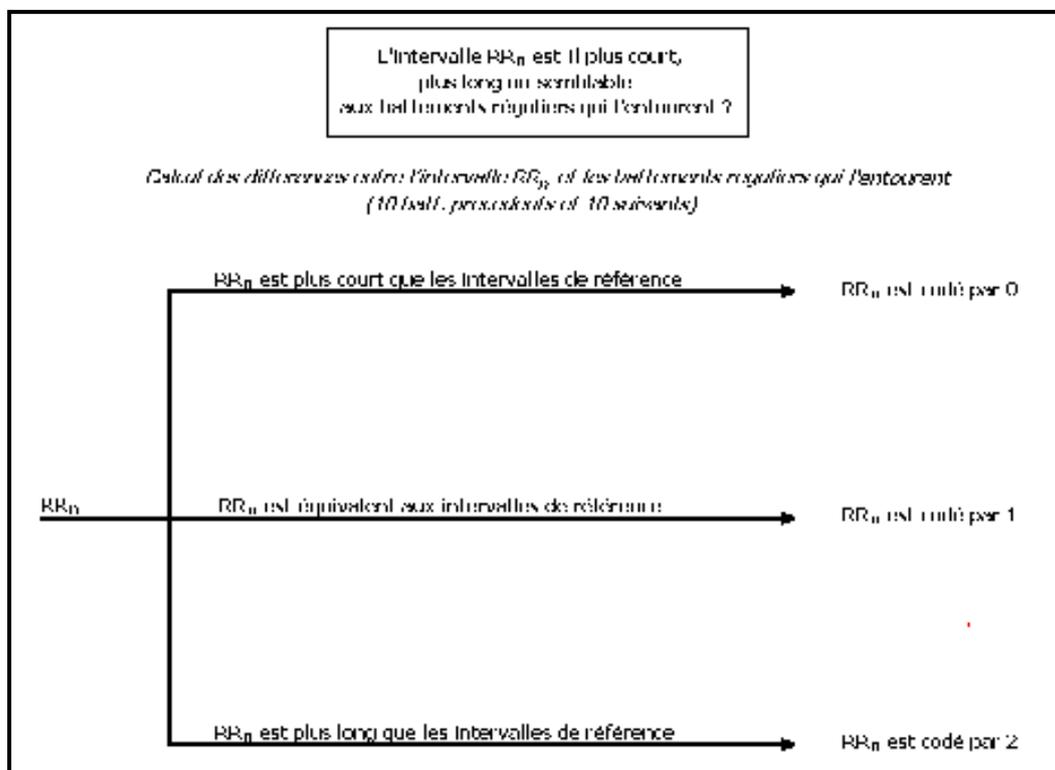


Figure 40 : Principe du codage par la comparaison avec des battements réguliers de référence.

Pour ce faire, chaque battement « n » est comparé avec la moyenne de la médiane des 10 battements (la routine permet de choisir le nombre de battements à prendre comme référence) qui ont été identifiés comme réguliers et qui le précèdent, et la médiane des 10 battements qui ont été identifiés comme réguliers et qui le suivent.

L'utilisation de la médiane plutôt que la moyenne se justifie par le fait que parmi les battements identifiés comme réguliers auxquels va être comparé le battement « n », il peut se trouver des séquences tachycardiques (« 0000 ») ou bradycardiques (« 2222 »).

Chaque intervalle RR est donc associé à 2 valeurs :

la différence de celui-ci avec la médiane des 10 battements identifiés comme réguliers qui le précèdent,  $M_{prev}$

et la différence avec la médiane des 10 battements identifiés comme réguliers qui le suivent,  $M_{next}$ .

On effectue alors la moyenne de ces deux différences pour chaque battement :

$$Moy_{Ref} = \frac{M_{prev} + M_{next}}{2}$$

Enfin on calcule la différence  $\Delta_{Ref}$  entre le battement « n » et sa moyenne de référence  $Moy_{Ref}$ .

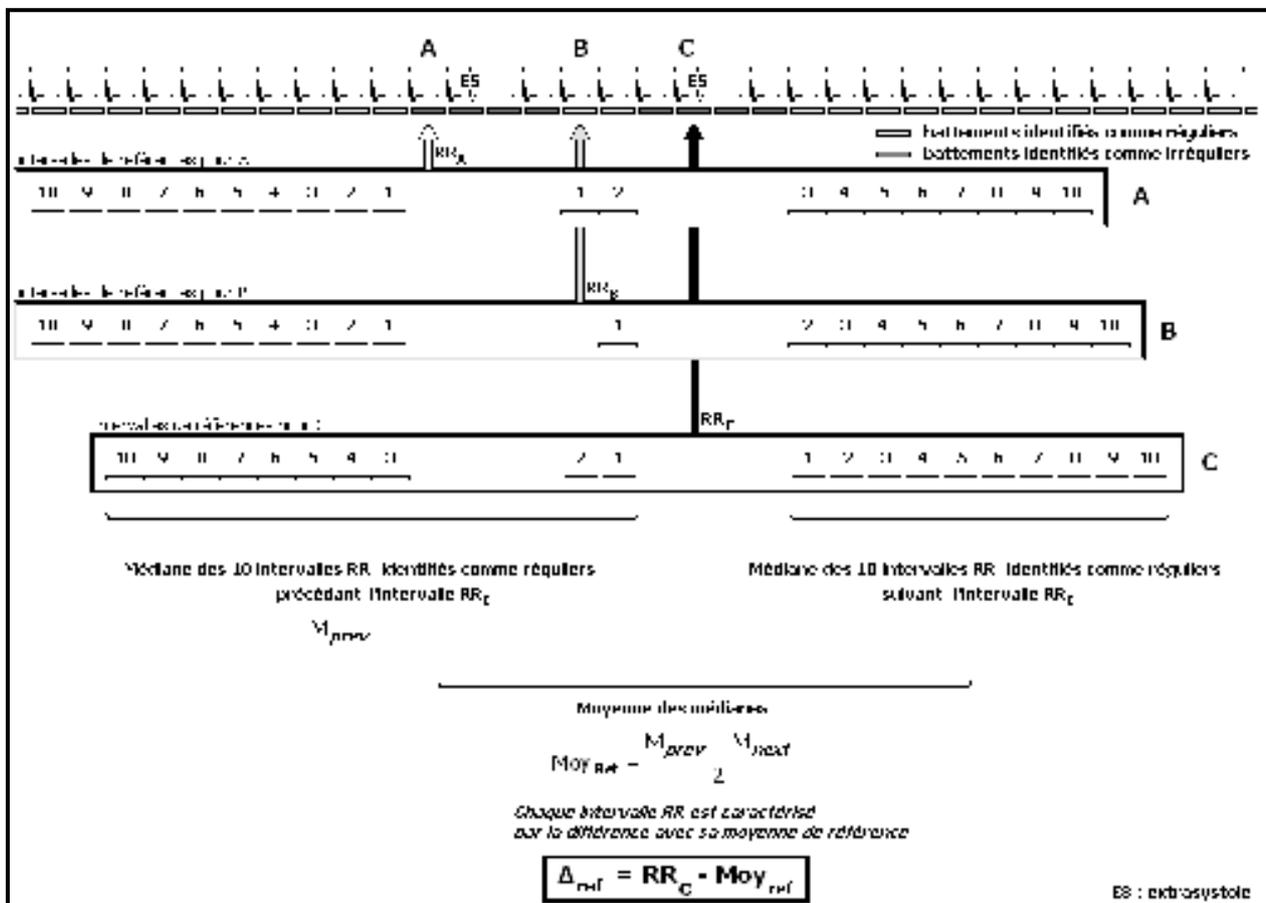


Figure 41 : Identification des intervalles RR de référence (les 10 intervalles précédents et les 10 suivants) pour chaque intervalle  $RR_A$ ,  $RR_B$  et  $RR_C$ .

La distribution de l'ensemble des différences  $\Delta_{Ref}$  est tracée. Sur cette distribution ressort un pic central, centré sur 0 qui correspond aux

intervalles RR qui ont peu ou pas de différence avec les intervalles RR qui ont été identifiés comme réguliers.

Des bornes sont donc choisies (de la même manière que pour la distribution de la fonction  $F_{RRn}$ ) afin d'encadrer ce pic central (Figure) :

Les intervalles RR correspondants au pic de gauche (intervalles RR dont les valeurs  $Moy_{Ref}$  sont inférieures à la borne minimale) sont codés par « 0 » : l'intervalle  $RR_n$  est inférieur à la moyenne de référence.

Les intervalles RR correspondant au pic central (intervalles RR dont les valeurs  $Moy_{Ref}$  sont comprises entre les bornes définies) sont codés par « 1 » : l'intervalle  $RR_n$  est sensiblement égal à la moyenne de référence.

Enfin, Les intervalles RR correspondant aux pic de gauche (intervalles RR dont les valeurs  $Moy_{Ref}$  sont supérieures à la borne maximale) sont codés par « 2 » : l'intervalle  $RR_n$  est supérieur à la moyenne de référence.

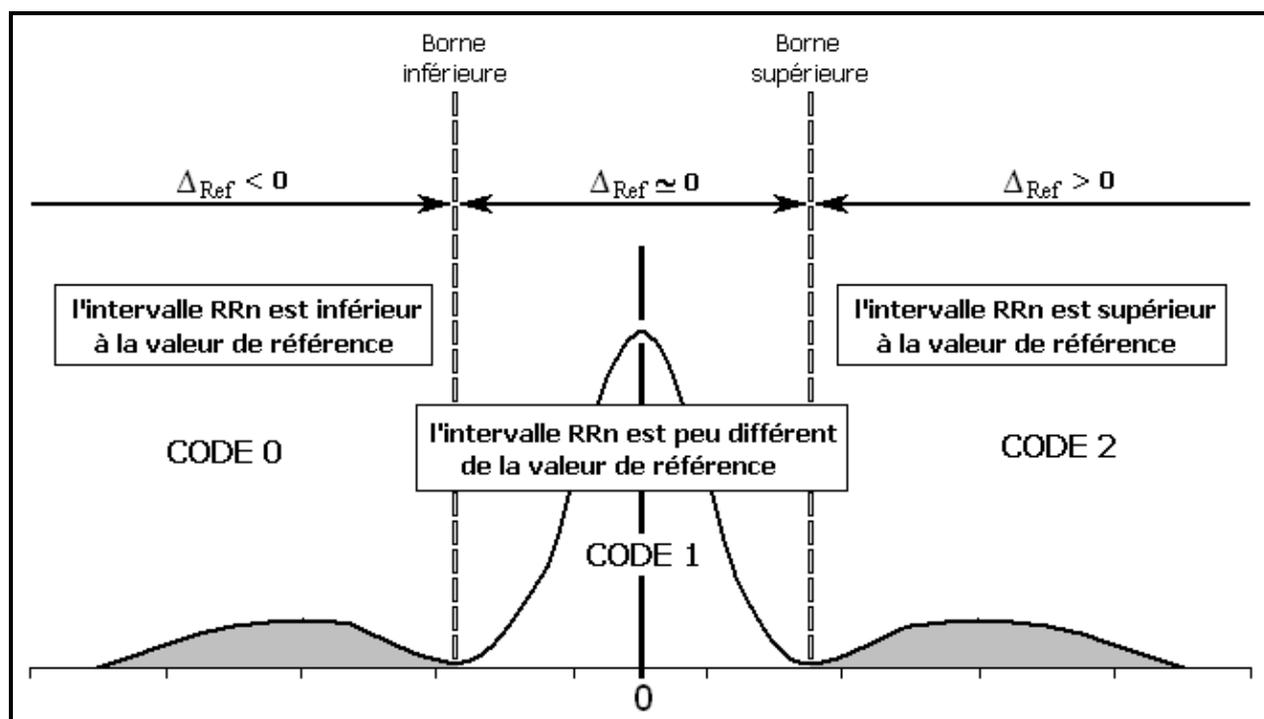


Figure 42 : Méthode de détermination des codes à partir de la distribution de  $\Delta_{Ref}$ .

### 2.3.3.5 La bonne méthode ?

Parmi les 3 méthodes testées pour déterminer la durée moyenne d'un intervalle RR, afin d'établir le codage, la méthode visant à comparer

chaque intervalle  $RR_n$  avec ses voisins ( $RR_{n-1}$  et  $RR_{n+1}$ ) est celle qui s'est avérée la plus performante pour l'étude de l'ECG des rats insuffisants cardiaques sur de longues séries temporelles.

Les deux premières méthodes sont, elles aussi, utilisables sous réserve :

Pour la première méthode, basée sur la distribution des intervalles RR, qu'il n'y ait pas de grandes variations de fréquence des battements sinusaux sur la période étudiée

Pour la seconde, basée sur la distribution des RR filtrés par un filtre passe-haut, que les épisodes de bradycardie et de tachycardie arythmiques, ne soient pas d'une durée suffisamment longue pour être complètement lissés par le filtrage.

Les tracés ECG des animaux rendus insuffisants cardiaques par ligature coronaire utilisés lors de l'étude ont présenté des troubles importants et variés : extrasystoles auriculaires et ventriculaires, bigéminie (enchaînement d'extrasystoles), épisodes de tachycardie ou de bradycardies de durées variables, etc..

C'est pourquoi, la troisième méthode de détermination du RR moyen, basée sur les différences de l'intervalle  $RR_n$  avec les intervalles  $RR_{n-1}$  et  $RR_{n+1}$  s'est avérée la plus satisfaisante. Pour des animaux aux troubles moins importants, les deux premières méthodes sont tout à fait convenables sous réserve que les conditions citées ci-dessus soit remplies. La dernière méthode, basée sur les différences entre  $RR_n$ ,  $RR_{n-1}$  et  $RR_{n+1}$  s'avère cependant inefficace lorsqu'il n'y a que très peu d'intervalles RR sinusaux. Ce cas extrême, rencontré parfois chez certains animaux est alors impossible à coder puisqu'il n'est alors pas possible d'identifier de battements sinusaux de référence.

### Diagramme de Poincaré et Dynamique Symbolique

Le codage des intervalles RR conduit à diviser en 9 cadrans le diagramme de Poincaré, représentant la durée de l'intervalle  $RR_{n+1}$  en fonction de la durée de l'intervalle  $RR_n$  (Figure 43).

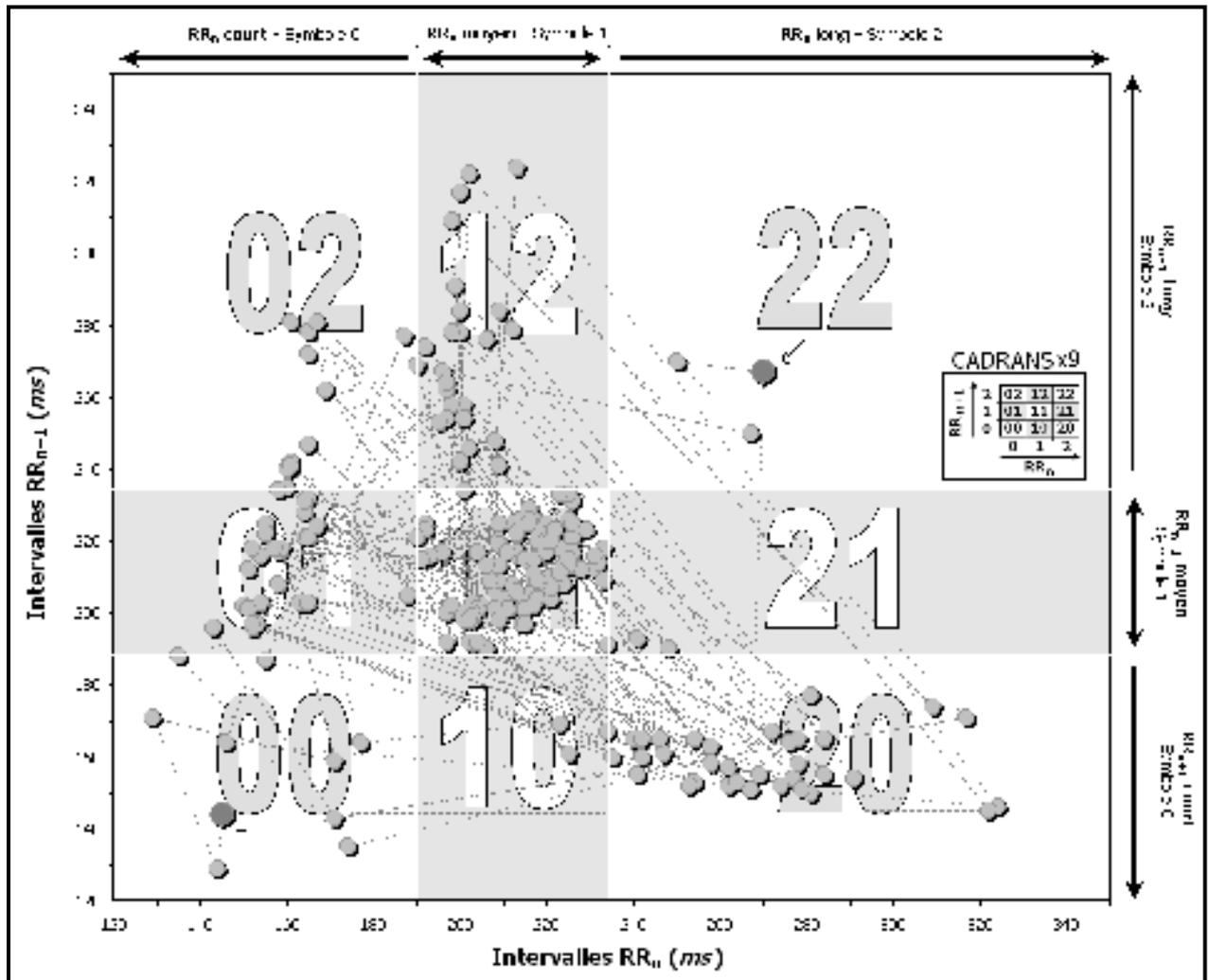


Figure 43 : Diagramme de Poincaré et dynamique symbolique.

L'application du codage des intervalles RR sur le diagramme de Poincaré représentant l'intervalle  $RR_{n+1}$  en fonction de l'intervalle RR précédant,  $RR_n$ , conduit à découper celui-ci en 9 cadrans. La succession des intervalles RR moyens codés par 1, longs codés par 2 et courts codés par 0 détermine, pour chaque point du diagramme de Poincaré, sa position dans l'un des cadrans. Ainsi, la succession de 2 intervalles RR courts ou de 2 intervalles RR longs place les points correspondants,

respectivement, dans les cadrans « 00 » et « 22 » (*flèches*). Le cadran central « 11 » regroupe les intervalles RR correspondants au rythme sinusal, régulier.

#### 2.3.4 Analyses statistiques

##### Variabilité de la fréquence cardiaque

Pour évaluer l'impact des expositions aux échappements, un test des signes (test de Wilcoxon) réalisé à l'aide de logiciel SigmaStat (*Jandel Scientific*) a été utilisé.

Les éventuelles augmentations ou diminutions ont été testés entre trois périodes différentes :

période précédant l'exposition (pré-exposition)

période d'exposition

période suivant l'exposition (post-exposition)

Les animaux sont considérés comme leur propre témoin.

Les différentes expositions d'un même animal sont considérées comme indépendantes puisque même si la pathologie évolue d'une exposition à l'autre, l'effet recherché est celui du jour d'exposition.

Les tests statistiques ont été effectués sur les moyennes de 35 segments de 5 minutes (soit environ 2 heures et 30 minutes ) afin d'appréhender la variabilité due à l'activité de l'animal (lors de l'exploration de la cage par exemple). Ces 35 segments correspondent aux trois heures d'exposition moins les 20 premières minutes.

Les 20 premières minutes d'exposition n'ont en effet pas été retenues car elles génèrent un excès d'activité physique chez l'animal qui vient d'être placé dans la cage d'exposition et l'explore. Cet excès d'activité est générateur d'une augmentation transitoire de la fréquence cardiaque non imputable à la qualité de l'atmosphère inhalée qui pourrait être considérée comme un élément confondant sur les résultats.

Le seuil de significativité a été choisi à  $p < 0,05$ .

### 2.3.5 Paramètres ECG suivis : RR, QT, SDNN, RMSSD, HRV triangle index

Nous avons choisi de suivre différents paramètres obtenus à partir des tracés ECG :

l'intervalle RR : intervalle séparant deux complexes ECG consécutifs qui traduit la fréquence cardiaque

l'intervalle QT : temps séparant l'onde Q de l'onde T au sein d'un complexe ECG

Nous avons également suivi 3 paramètres permettant d'évaluer la variabilité de la fréquence cardiaque <sup>iii</sup> :

Deux paramètres statistiques :

SDNN : la déviation standard des intervalles RR normaux

RMSSD : la racine carrée des moyennes de carrés de la première dérivée des intervalles RR.

Un paramètre géométrique :

HRV triangle index : aire sous la courbe de distribution des intervalles RR divisée par le maximum de la distribution.

Le calcul de ces trois paramètres requiert de ne prendre en compte que les battements « normaux », c'est à dire qu'il est nécessaire d'invalider les évènements arythmiques et notamment les extrasystoles, avant de pouvoir les calculer de façon représentative de la variabilité sinusale.

Cette procédure d'invalidation automatisée a grandement été facilitée par l'approche en dynamique symbolique, permettant d'extraire les séquences arythmiques des séries temporelles de RR.

## 2.4 RESULTATS ELECTROPHYSIOLOGIE

### 2.4.1 Les émissions non post-traitées

#### 2.4.1.1 Variabilité de la fréquence cardiaque chez le rat

L'étude de la variabilité de la fréquence cardiaque chez les animaux sains ou rendus insuffisants cardiaques par ligature coronaire a montré une

réduction des paramètres de variabilité (SDNN, RMSSD et HRV index ) lors des expositions.

Cette réduction de variabilité est considérée comme un pronostic défavorable à la survie en cardiologie.

Elle apparaît nettement lorsque l'on représente graphiquement l'intervalle RR (intervalle entre 2 contractions cardiaques) en fonction de l'intervalle RR précédent. Cette représentation, appelée application de premier retour ou diagramme de Poincaré, montre un écrasement du nuage de points lorsque les animaux, sains ou insuffisants cardiaques, sont exposés à des échappements diesel dilués 50 fois. Cet écrasement traduit une réduction de la variabilité de la fréquence cardiaque lorsque les animaux inhalent des échappements moteurs.

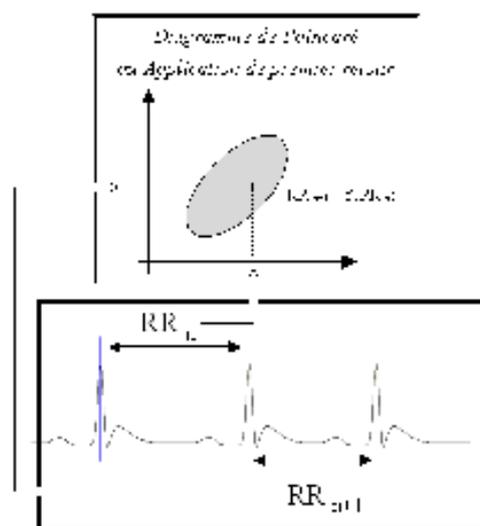


Figure 44 : Construction de l'application de premier retour ou diagramme de Poincaré

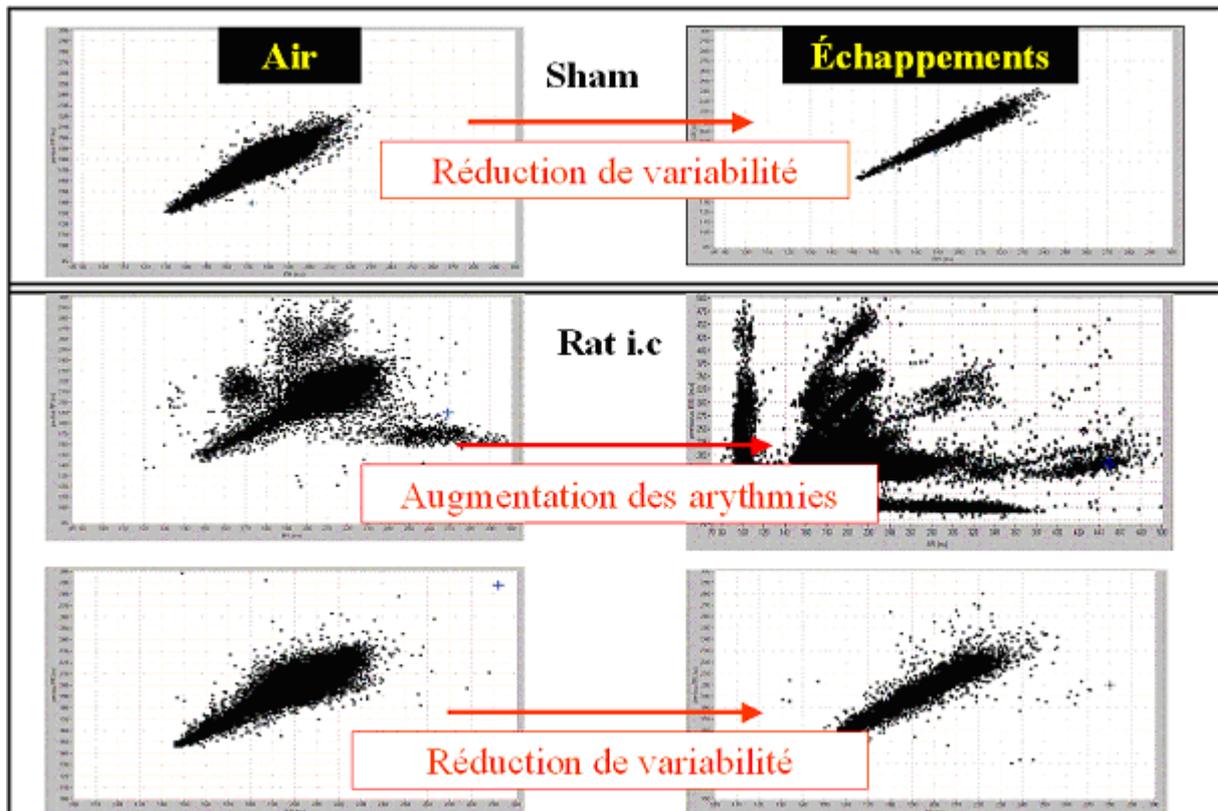


Figure 45 : Diagrammes de Poincaré d’un rat sham et d’un rat insuffisant cardiaque exposés à de l’air propre ou à des échappements diesel dilués 50 fois.

Cette réduction de variabilité se traduit par une réduction des valeurs des paramètres de variabilité suivis (SDNN, RMSSD et HRVindex ) à la fois chez les animaux sains et chez les animaux rendus insuffisants cardiaques par ligature coronaire.

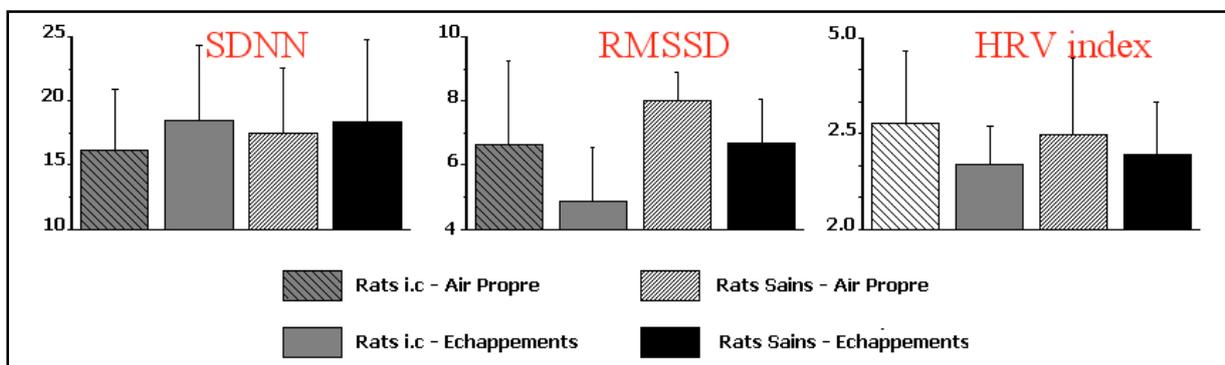
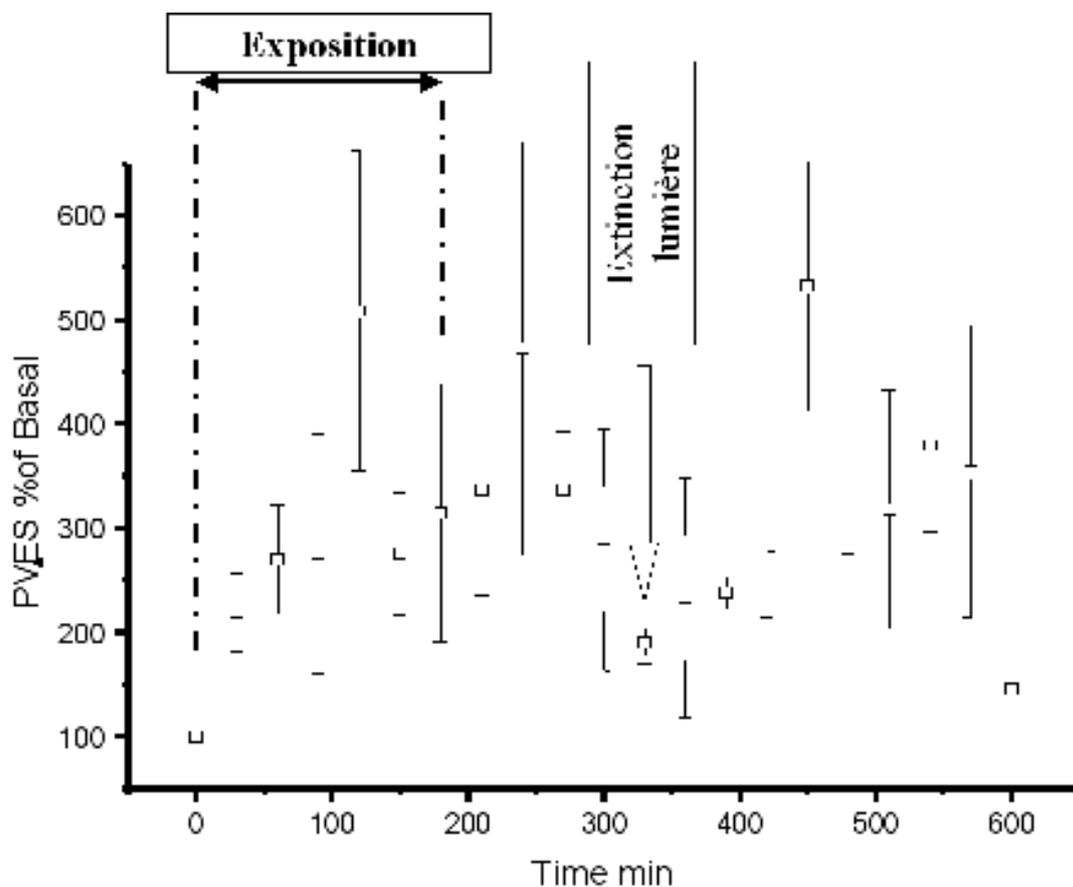


Figure 46 : Variation des paramètres de variabilité de la fréquence cardiaques (SDNN, RMSSD et HRVindex) chez les rats sains et insuffisants cardiaques lors

d'expositions à de l'air propre ou à des gaz d'échappements diesel dilués 50 fois. (n = 16,  $p < 0.05$  test de wilcoxon)

Les résultats obtenus chez les rats insuffisants cardiaques ont, de plus, montré une augmentation du nombre d'évènements arythmiques dès le début des expositions (Figure 47). Le nombre d'arythmies se réduit ensuite lors de l'extinction de la lumière dans l'animalerie qui provoque un stress chez les animaux et conduit à une augmentation de la fréquence cardiaque. Le nombre d'évènements arythmiques augmente à nouveau dès que les animaux sont calmés. Ces résultats montrent le caractère soutenu et durable de l'impact de l'inhalation d'aérosols de combustion sur la survenue d'évènements arythmiques.



**Figure 47 :** Evolution du nombre d'extrasystoles chez 7 rats rendus insuffisants cardiaques par ligature coronaire durant les expositions aux échappements et la période suivant l'exposition. L'élévation du nombre d'extrasystoles est significative  $p < 0.05$  dès les 20 premières minutes d'exposition et se maintient au delà de la fin de

l'exposition. Le nombre d'extrasystoles revient à la normale 20 heures après la fin de l'exposition. Le nombre d'extrasystoles au cours de la période pré-exposition est placé à 100 pour chaque individu. Compte tenu de la durée de suivi des animaux et du cycle lumineux au sein de l'animalerie, une période d'extinction de la lumière initiant la phase d'activité des animaux au cours de la période nocturne modifie transitoirement la fréquence cardiaque vers une augmentation qui provoque naturellement une diminution transitoire du nombre d'extrasystoles sur une période de 1 à 2 heures.

Intervalle QT : rat, cobaye, homme

La durée de l'intervalle QT traduit la durée de repolarisation des ventricules. Chez l'homme, la durée de cet intervalle varie en fonction de la fréquence cardiaque (et donc de l'intervalle RR, intervalle séparant 2 contractions cardiaques). Il existe donc diverses formules de correction, disponibles dans la littérature pour corriger cette relation entre QT et RR. L'étude de la variation de la durée de l'intervalle QT a montré que contrairement à l'homme, la durée de l'intervalle QT ne varie pas en fonction de la fréquence cardiaque chez le rat (figure 48). Alors que chez l'homme, la durée de l'intervalle QT est fortement corrélée à la fréquence cardiaque, il apparaît qu'elle ne l'est pas du tout chez le rat.

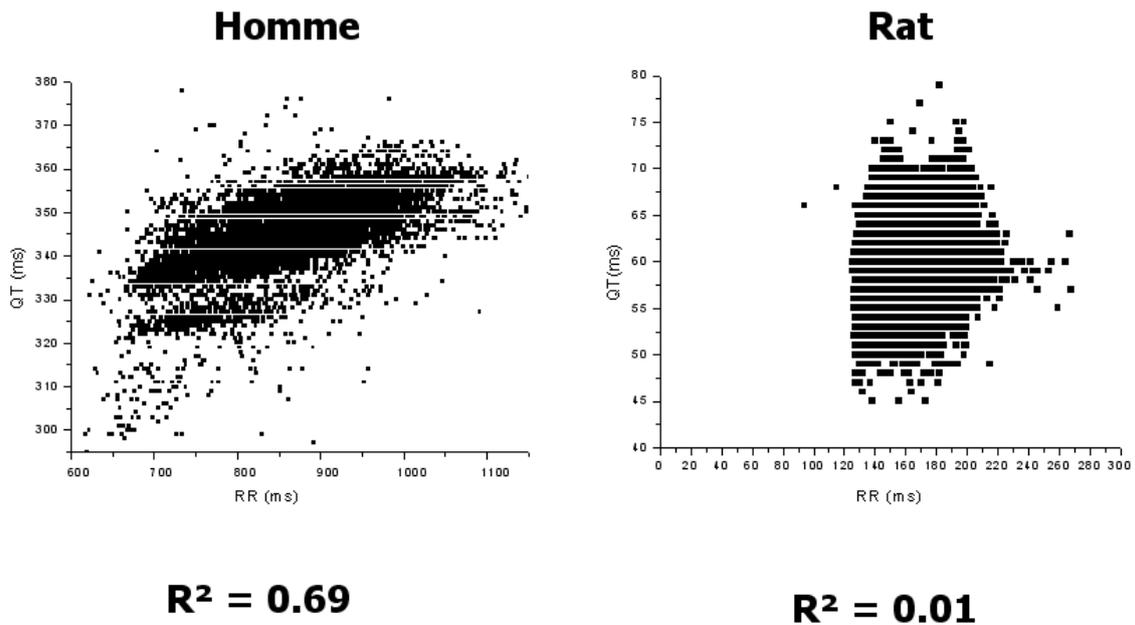


Figure 48 : Durée de l'intervalle QT en fonction de la durée de l'intervalle RR et coefficient de corrélation ( $R^2$ ) chez l'homme et le rat.

En cardiologie, une augmentation de la dispersion de la durée de l'intervalle QT constitue un pronostic défavorable. Afin d'évaluer l'impact de la pollution Diesel sur cet intervalle nous avons donc étudié deux autres espèces : le cobaye et le hamster.

Les résultats montrent (figure 49) que la variation de la durée de l'intervalle QT en fonction de l'intervalle RR ne se retrouve pas chez le hamster. En revanche, elle existe chez le cobaye.

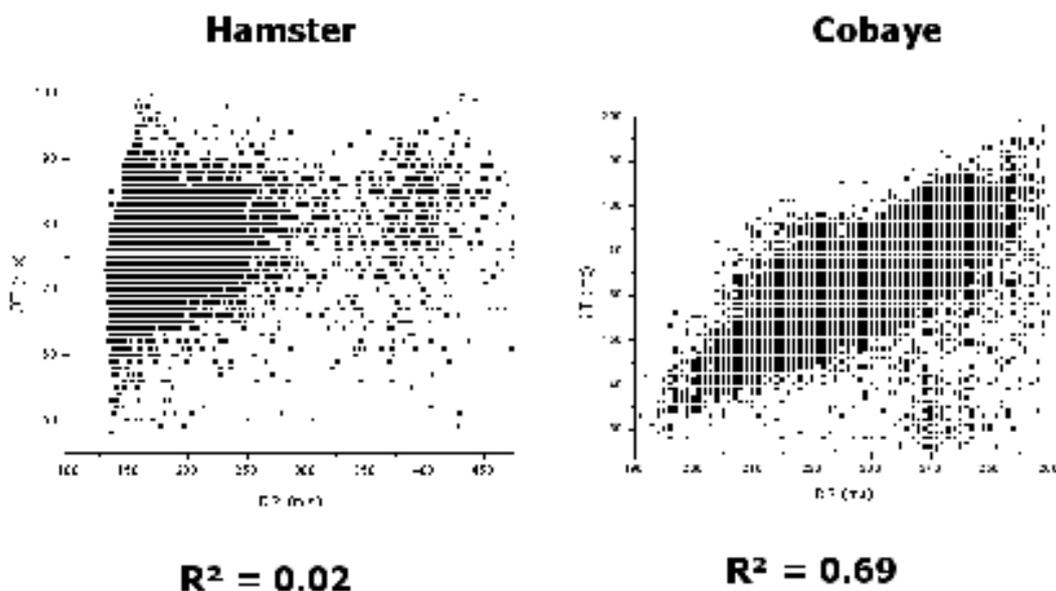


Figure 49 : Durée de l'intervalle QT en fonction de la durée de l'intervalle RR et coefficient de corrélation ( $R^2$ ) chez le hamster et le cobaye.

### 2.4.1.2 Résultats Test Signe – Rats Sains

Les tableaux suivants présentent les variations de la durée de l'intervalle RR et des paramètres HRV, observées chez des rats sains exposés à des échappements diesel dilués 50 fois. Deux configurations ont été testées : échappements diesel non filtrés (phase gazeuse et phase particulaire) et échappements diesel filtrés (phase gazeuse uniquement) ceci afin d'évaluer un éventuel effet de la phase particulaire.

Echappements Non filtrés dilués 50 fois

Les animaux ont été exposés 2 fois par semaines pendant deux périodes de 4 semaines chacune de ces périodes étant séparée de 2 semaines de récupération. L'espacement des expositions permet un retour de l'électrophysiologie cardiaque à la normale et de considérer chaque exposition comme indépendante de la précédente, ayant pour intérêt de limiter le nombre d'animaux implantés tout en augmentant le nombre d'expositions analysées.

Les tableaux suivants présentent les résultats obtenus pour chacune de ces périodes et pour l'ensemble des expositions (première et seconde périodes de 4 semaines).

#### Première période de 4 semaines

	Exposition vs Pré-exposition  3	Post-Exposition vs Exposition	4 Post-Exposition vs Pre-Exposition  5
Intervalle RR	↗ +2.27	↘ -10.54 **	↘ -8.27 **
SDNN	↘ -0.71	↘ -0.71	↘ -1.11 *

RMSSD	↘ -1.06 *	↗ -0.68	↘ -0.38 **
HRV index	↘ -0.02	↘ -0.02	↘ -0.04
Pourcentage ES	↔ 0	↔ 0	↔ 0

Tableau 8 : Evolution des paramètres de variabilité

n= 36 \* : P&lt;0.05 \*\* : P&lt;0.01

- **Seconde période de 4 semaines**

	Exposition vs Pré-exposition	Post-Exposition vs Exposition	Post-Exposition vs Pré-Exposition
Intervalle RR	↗ +13.99	↘ -17.01 **	↘ -3.02
SDNN	↗ +0.48	↘ -0.33	↗ +0.15
RMSSD	↘ -0.51	↘ -0.20 *	↘ -0.71
HRV index	↗ +0.03	↘ -0.05	↘ -0.02
Pourcentage ES	↗ +6.10 <sup>-5</sup>	↗ +16.10 <sup>-5</sup> *	↗ +22.10 <sup>-5</sup>

Tableau 9 : Evolution des paramètres de variabilité

n= 36 \* : P&lt;0.05 \*\* : P&lt;0.01

	Exposition vs Pré-exposition	Post-Exposition vs Exposition	Post-Exposition vs Pré-Exposition
Intervalle RR	↗ +5.93	↘ -12.65 **	↘ -6.72 *
SDNN	↘ -0.55	↘ -0.23	↘ -0.79 *
RMSSD	↘ -0.85 *	↗ +0.10 *	↘ -0.75 **
HRV index	↗ +0.01	↘ -0.04	↘ -0.03

Pourcentage ES	↗ +9.78 10 <sup>-5</sup>	↗ +1.65.10 <sup>-4</sup> *	↗ +6.88.10 <sup>-5</sup>
----------------	--------------------------	----------------------------	--------------------------

- **Première et seconde périodes de 4 semaines**

n= 72      \* : P<0.05      \*\* : P<0.01

Tableau 10 : Evolution des paramètres de variabilité : Echappements Filtrés dilués 50 fois

Les animaux ont été exposés durant 4 semaines à des échappements filtrés (efficacité de filtration: 99%). Les animaux ont donc été uniquement exposés à la phase gazeuse des échappements diesel. Le tableau ci-dessous présente les résultats obtenus pour l'ensemble des expositions et la totalité des animaux.

	Exposition vs Pré-exposition	Post-Exposition vs Exposition	Post-Exposition vs Pre-Exposition
Intervalle RR	↗ +4.55	↘ -24.08 **	↘ -19.53 *
SDNN	↗ +0.45	↘ -0.60	↘ -0.15
RMSSD	↘ -0.27	↘ -0.04	↘ -0.32
HRV index	↘ -0.14	↗ +0.03	↘ -0.11 *

n= 18    \* : P<0.05      \*\* : P<0.01

Tableau 11 : Evolution des paramètres de variabilité Rats rendus insuffisants cardiaques  
Echappements Filtrés

	Exposition vs Pré-exposition	Post-Exposition vs Exposition	Post-Exposition vs Pre-Exposition
<b>Intervalle RR</b>	↘ <b>-8.00</b>	↘ <b>-20</b>	↘ <b>-30</b>
<b>SDNN</b>	↘ <b>-0.20</b>	↘ <b>-3.00</b>	↘
<b>RMSSD</b>	↘ <b>-1.70</b>	↘ <b>-0.50</b>	↘ <b>-0.80</b>

<b>HRV index</b>	<b>↘ -0.02</b>	<b>↘ -0.1</b>	<b>↘ -0.1</b>
<b>% ES</b>	<b>↘ -0.05</b>	<b>↘ -0.002</b>	<b>↘ -0.05</b>

Tableau 12 : Evolution des paramètres de variabilité rats insuffisants cardiaques

n= 16 \* : P&lt;0.05 \*\* : P&lt;0.01

## Echappements Non Filtrés

	Exposition vs Pré-exposition	Post-Exposition vs Exposition	Post-Exposition vs Pre-Exposition
<b>Intervalle RR</b>	<b>↘ - 1.00</b>	<b>↘ -16.0</b>	<b>↘ -17.00</b>
<b>SDNN</b>	<b>↘ - 0.07</b>	<b>↘ -0.56</b>	<b>↘ -0.63</b>
<b>RMSSD</b>	<b>↘ - 0.91</b>	<b>↘ -0.76</b>	<b>↘ -1.67</b>
<b>HRV index</b>	<b>↘ - 0.03</b>	<b>↘ -0.06</b>	<b>↘ -0.065</b>
<b>% ES</b>	<b>↘ - 1.25</b>	<b>↗ +0.07</b>	<b>↗ -1.19</b>

n= 32

Tableau 13 : Evolution des paramètres de variabilité \* : P&lt;0.05

\*\* : P&lt;0.01

## 5.1.1.1 Résultats Test Signe – Rats rendus insuffisants cardiaques par ligature coronaire

## Echappements Filtrés

	Exposition vs Pré-exposition	Post-Exposition vs Exposition	Post-Exposition vs Pre-Exposition
<b>5.1.2 RR</b>	<b>↘ -8.00</b>	<b>↘ -20</b>	<b>↘ -30</b>

<b>SDNN</b>	↘ <i>-0.20</i>	↘ <i>-3.00</i>	↘
<b>RMSSD</b>	↘ <i>--1.70</i>	↗ <i>-0.50</i>	↘ <i>-0.80</i>
<b>HRV index</b>	↘ <i>-0.02</i>	↘ <i>-0.1</i>	↘ <i>-0.1</i>
<b>%ES</b>	↘ <i>-0.05</i>	↘ <i>-0.002</i>	↘ <i>-0.05</i>

Tableau 14 : Evolution des paramètres de variabilité

## Echappements Non Filtrés – Première Série d'exposition de 4 semaines

	Exposition vs Pré-exposition	Post-Exposition vs Exposition	Post-Exposition vs Pre-Exposition
5.1.3 RR	↘ <i>-1.00</i>	↘ <i>-16.0</i>	↘ <i>-17.0</i>
<b>SDNN</b>	↘ <i>-0.07</i>	↘ <i>-0.56</i>	↘ <i>-0.63</i>
<b>RMSSD</b>	↘ <i>-0.91</i>	↘ <i>-0.76</i>	↘ <i>-1.67</i>
<b>HRV index</b>	↘ <i>-0.03</i>	↘ <i>-0.06</i>	↘ <i>-0.065</i>
<b>%ES</b>	↘ <i>-1.25</i>	↗ <i>+0.07</i>	↘ <i>-1.19</i>

Tableau 15 : Evolution des paramètres de variabilité

En conclusion, pour les émissions non post-traitées, la filtration des émissions paraît supprimer l'impact sur la réduction du RMSSD chez le rat sain et chez le rat insuffisant cardiaque. Ceci laisse supposer que pour ces émissions faiblement oxydantes, la phase particulaire semble être responsable de cet effet. Il paraît important de souligner que le RMSSD est le seul paramètre de variabilité subissant une variation statistiquement significative lors de l'exposition aux émissions diluées.

#### 5.1.3.1 Résultats Test Signe – Cobayes Echappements Totaux

## 4 expositions par semaine pendant 2 semaines soit n=8

	Exposition vs Pré-exposition	Post-Exposition vs Exposition	Post-Exposition vs Pre-Exposition
5.1.4 RR	↘ <b>-7.00</b>	≈	↘ <b>-7.00</b>
<b>SDNN</b>	↘ <b>-1.77</b>	↗ <b>+0.85</b>	↘ <b>-0.92</b>
<b>RMSSD</b>	↘ <b>-1.07</b>	↗ <b>+0.43</b>	↘ <b>-0.64</b>
<b>HRV index</b>	↘ <b>-0.10</b>	↗ <b>+0.17</b>	↗ <b>+0.07</b>

Tableau 16 : Evolution des paramètres de variabilité

## Echappements Totaux

## 3 expositions par semaine pendant 4 semaines

6	Exposition vs Pré-exposition	Post-Exposition vs Exposition	Post-Exposition vs Pre-Exposition
6.1.1 RR	↘ <b>-4.54</b>	↘ <b>-17.17</b>	↘ <b>-21.71</b>
<b>SDNN</b>	↘ <b>-2.70</b>	↗ <b>+0.84</b>	↘ <b>-1.86</b>
<b>RMSSD</b>	↘ <b>-0.53</b>	↘ <b>-0.69</b>	↘ <b>-1.22</b>
<b>HRV index</b>	≈	↘ <b>-0.08</b>	↘ <b>-0.08</b>

Tableau 17 : Evolution des paramètres de variabilité

Comme observé chez le rat, une réduction du RMSSD est observée chez le cobaye exposé aux émissions totales diluées. De plus chez le cobaye, le SDNN semble lui aussi affecté. De même que chez le rat sain, il n'a pas été observé de survenue d'évènements arythmiques chez le cobaye sain exposé aux émissions de moteurs Diesel non post-traitées.

Durée de l'intervalle QT

Les tableaux suivants présentent l'évolution de la durée de l'intervalle QT et des QT corrigés chez les cobayes exposés aux échappements Diesel dilués 50 fois durant une, deux, trois et quatre semaines d'exposition.

Il apparaît clairement chez le cobaye que l'exposition aux échappements provoque une élévation de l'intervalle QT en données corrigées de la fréquence dès la deuxième semaine d'exposition.

Cette élévation de la durée de l'intervalle QT est un pronostique défavorable pour la fonction cardiaque.

Compte tenu de l'impossibilité rencontrée à mettre en œuvre une insuffisance cardiaque chronique dans le modèle de cobaye, l'expérimentation n'a pu être réalisée que chez l'animal sain.

Tableau 18 : Durée de l'intervalle QT (non corrigé) de cobayes exposés aux échappements

<b>Durée QT</b>	Exposition vs Pré-exposition	Post-Exposition vs Exposition	Post-Exposition vs Pre-Exposition
Une semaine d'exposition	↘	↘	↘ *
Deux semaines d'exposition	↗	↘ *	↗
Trois semaines d'exposition	↗	↘ *	↘
Quatre semaines d'exposition	↗ *	↘ **	↘ *

\* : P&lt;0.005

\*\* : P&lt;0.001

Tableau 19 : Durée des QT corrigés de cobayes exposés aux échappements

<b>Durée QTc2bis</b>	Exposition vs Pré-exposition	Post-Exposition vs Exposition	Post-Exposition vs Pre-Exposition
Une semaine d'exposition	↗	↘	↘
Deux semaines d'exposition	↗ *	↘	↘
Trois semaines d'exposition	↗ *	↘ *	↘
Quatre semaines d'exposition	↗ *	↘ **	↘

\* : P&lt;0.005

\*\* : P&lt;0.001

L'augmentation de la durée de l'intervalle QT observée chez le cobaye sain est un pronostic cardiaque défavorable. Ce phénomène n'a pas été observé chez le rat. Cependant, les différences observées pour la régulation de la durée de l'intervalle QT entre le rat et le cobaye peuvent éventuellement être à l'origine de ces différences interspécifiques quant à la sensibilité des paramètres électrophysiologiques cardiaques aux émissions diluées de moteur Diesel.

## 6.2 INFLUENCE DES SYSTEMES DE POST-TRAITEMENT SUR L'ECG RATS SAINS ET INSUFFISANTS CARDIAQUES DEUXIEME CAMPAGNE D'EXPOSITION (2006)

### 6.2.1 La Catalyse d'oxydation et le role potentiel du NO<sub>2</sub> dans les effets de la catalyse d'oxydation .

Les résultats d'études antérieures effectuées sur tissu pulmonaire en cultures organotypiques nous avaient conduits à incriminer le NO<sub>2</sub> surproduit lors du traitement des émissions par catalyse d'oxydation comme l'un des principaux candidats impliqués dans les manifestations toxiques induites par les émissions ainsi post-traitées.

Cette hypothèse avait d'ailleurs été confirmée par les travaux effectués en résonance paramagnétique électronique montrant une forte contribution du NO<sub>2</sub> à l'élévation du potentiel oxydant de ces émissions.

Pour compléter ce faisceau d'hypothèses, nous avons poursuivi en accord avec la discussion menée lors du dernier colloque primequal (Avignon 2006) les investigations liées au NO<sub>2</sub> puis à l'Ozone.

Les conditions expérimentales décrites ci-dessous sont les suivantes :

Air enrichi en NO<sub>2</sub> 4ppm (à l'aide du banc de génération de polluants)

Emissions non catalysées (amont du catalyseur d'oxydation upstream)

Emissions non catalysées, enrichies en NO<sub>2</sub> 4ppm (à l'aide du banc de génération de polluants)

Emissions traitées par catalyse d'oxydation (Aval Catalyseur, downstream) contenu en NO<sub>2</sub> 4ppm.

Ces expérimentations ont été réalisées en inhalation chez des rats sains (Sham) et insuffisants cardiaques (MI).

Résultats Biochimiques

Les prélèvements d'organes pour les études biochimiques ont été réalisés après une série de trois inhalations quotidiennes de 3 heures.

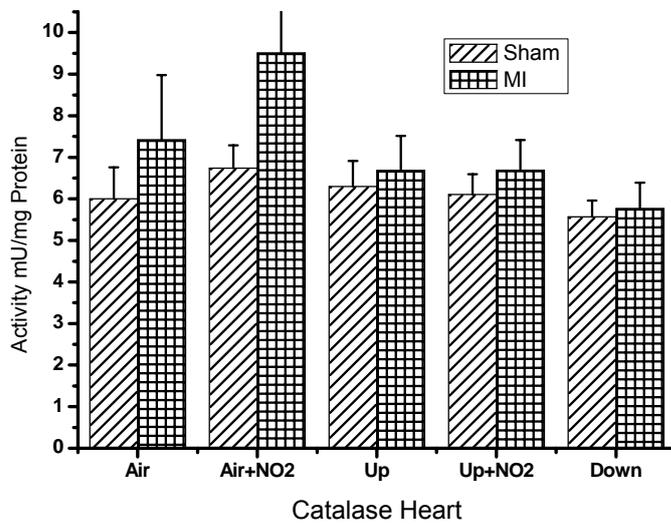


Figure 50 : activité de la catalase cardiaque chez les rats sains et insuffisants cardiaques : impacts du NO2 et de la catalyse d'oxydation

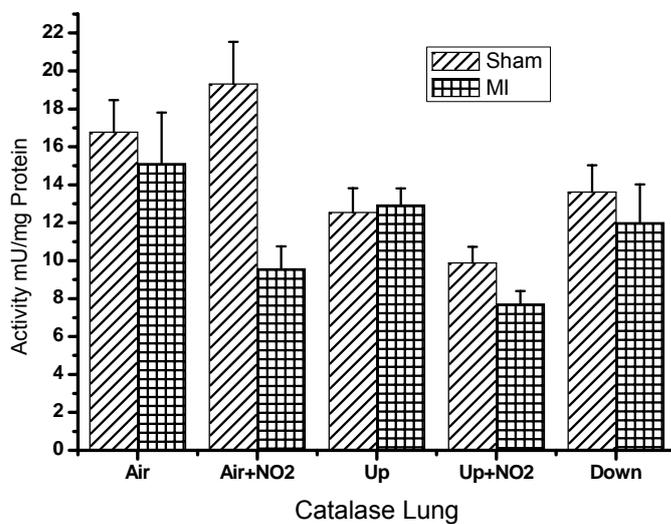


Figure 51 : activité de la catalase pulmonaire chez les rats sains et insuffisants cardiaques : impacts du NO2 et de la catalyse d'oxydation

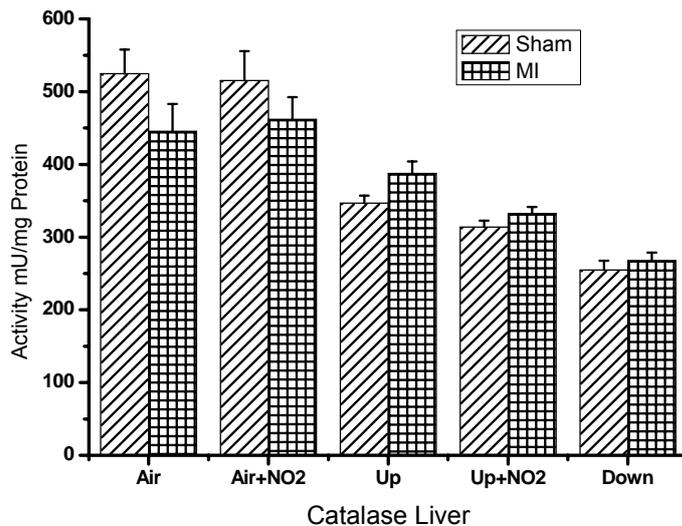


Figure 52 : activité de la catalase hépatique chez les rats sains et insuffisants cardiaques : impacts du NO<sub>2</sub> et de la catalyse d'oxydation

Les impacts sur la catalase cardiaque sont restés très limités. Par contre il est noté une diminution significative de la catalase hépatique et pulmonaire chez les rats sains et MI exposés aux émissions de moteur amont, amont dopé et catalyseur d'oxydation, le NO<sub>2</sub> seul n'ayant pas démontré d'effet significatif à l'exception du poumon des animaux insuffisants cardiaques.

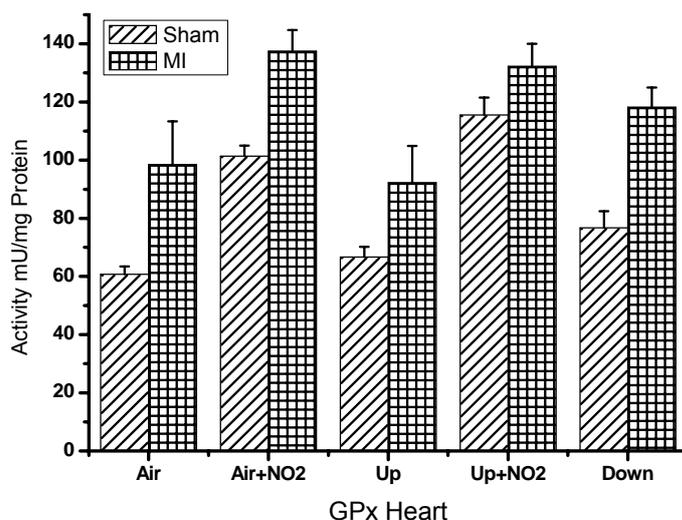


Figure 53 : activité de la glutathion peroxydase cardiaque chez les rats sains et insuffisants cardiaques : impacts du NO2 et de la catalyse d'oxydation

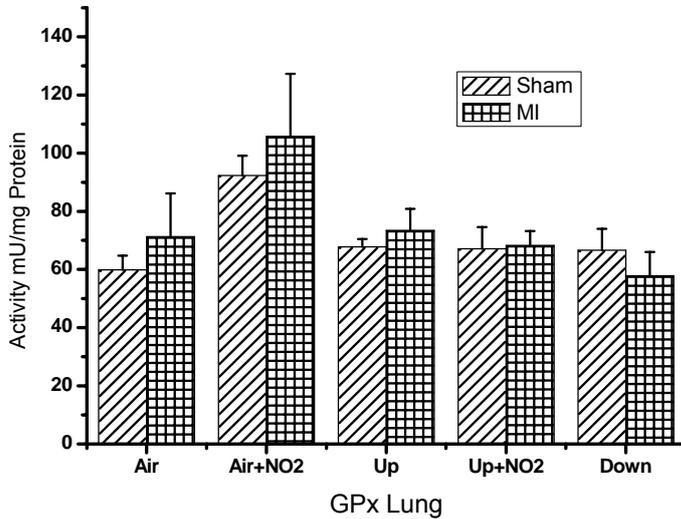


Figure 54 : activité de la glutathion peroxydase pulmonaire chez les rats sains et insuffisants cardiaques : impacts du NO2 et de la catalyse d'oxydation

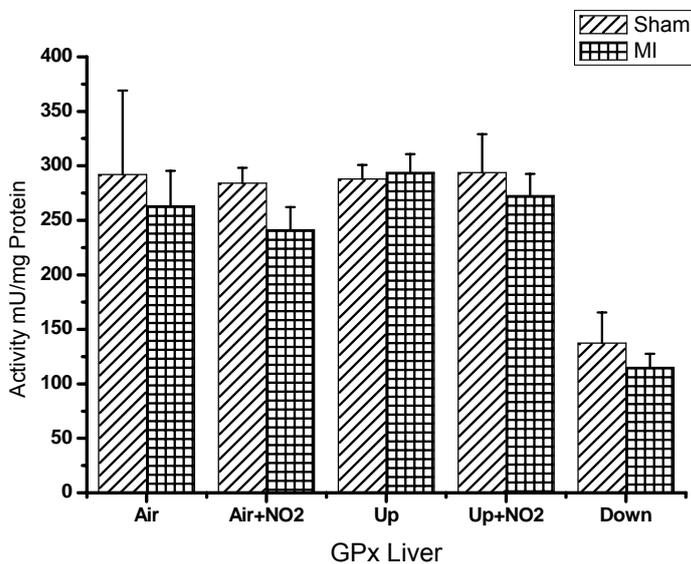


Figure 55 : activité de la glutathion peroxydase hépatique chez les rats sains et insuffisants cardiaques : impacts du NO2 et de la catalyse d'oxydation

En dehors d'une forte diminution de la GPx hépatique lors de l'exposition aux émissions catalysées, il n'a pas été observé de réponse hépatique.

De façon très intéressante, pour l'ensemble des conditions contenant une concentration de NO<sub>2</sub> de 4ppm, il est observé une élévation de l'activité cardiaque de la glutathion peroxydase. L'activité de la GPx cardiaque s'est révélée être plus élevée chez les rats MI que chez les rats sains, mais le profil d'induction de cette activité est analogue entre les deux populations d'animaux.

En ce qui concerne l'activité de la GPx pulmonaire, seule la condition NO<sub>2</sub> dans l'air a provoqué une augmentation significative de cette activité, cela tant chez les rats sains que chez les rats MI. L'impact du NO<sub>2</sub> sur l'induction de la GPx pulmonaire a déjà été rapporté dans la littérature pour des expositions par inhalation à de fortes concentrations et des durées supérieures à deux semaines (Ichinose et Sagai 1982)

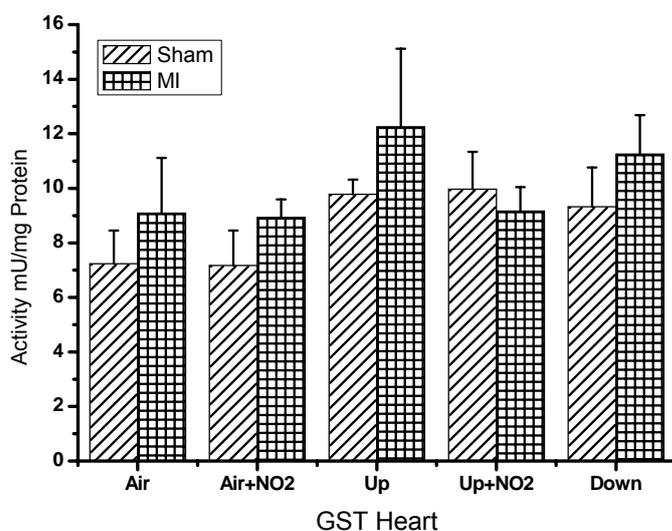


Figure 56 : activité de la glutathion-S-transférase cardiaque chez les rats sains et insuffisants cardiaques : impacts du NO<sub>2</sub> et de la catalyse d'oxydation

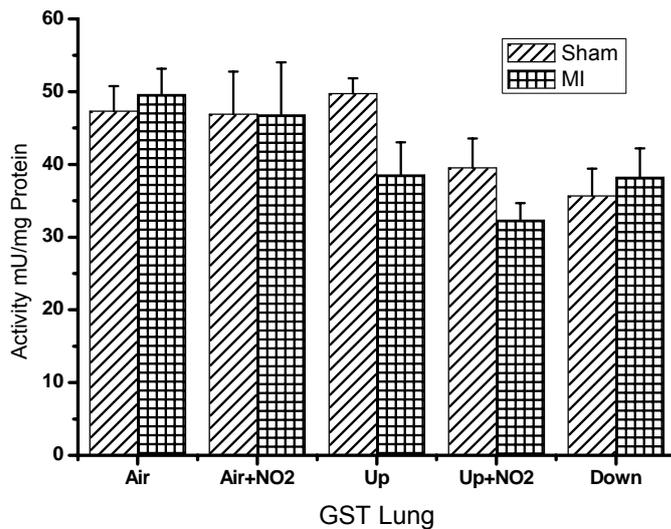


Figure 57 : activité de la glutathion-S-transférase pulmonaire chez les rats sains et insuffisants cardiaques : impacts du NO<sub>2</sub> et de la catalyse d'oxydation

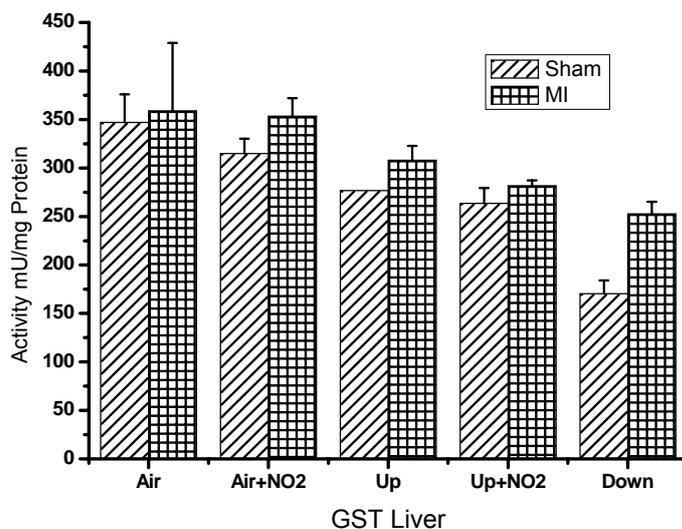


Figure 58 : activité de la glutathion-S-transférase hépatique chez les rats sains et insuffisants cardiaques : impacts du NO<sub>2</sub> et de la catalyse d'oxydation

L'activité de la glutathion-S-Transferase hépatique a été diminuée de façon significative après inhalation d'émissions catalysées.

Au niveau pulmonaire, cette activité a été diminuée par l'inhalation d'émissions dopées au NO<sub>2</sub> et par les émissions catalysées.

Au niveau cardiaque, une tendance à l'élévation de l'activité GST est observée, pour l'ensemble des conditions expérimentales comportant l'inhalation d'émissions de moteurs.

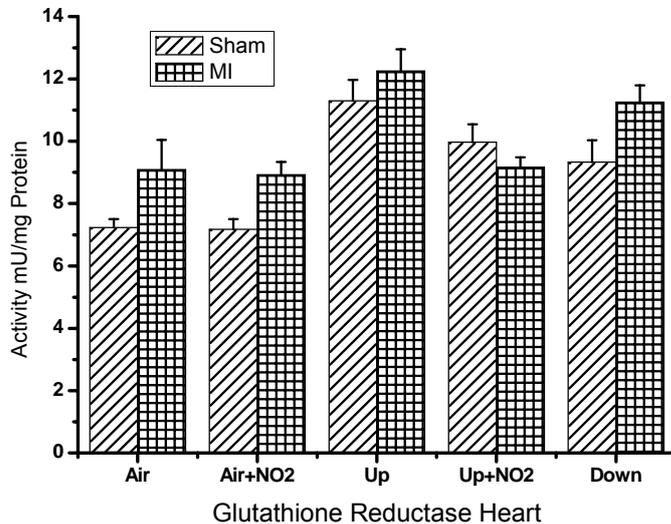


Figure 59 : activité de la glutathion réductase cardiaque chez les rats sains et insuffisants cardiaques : impacts du NO<sub>2</sub> et de la catalyse d'oxydation

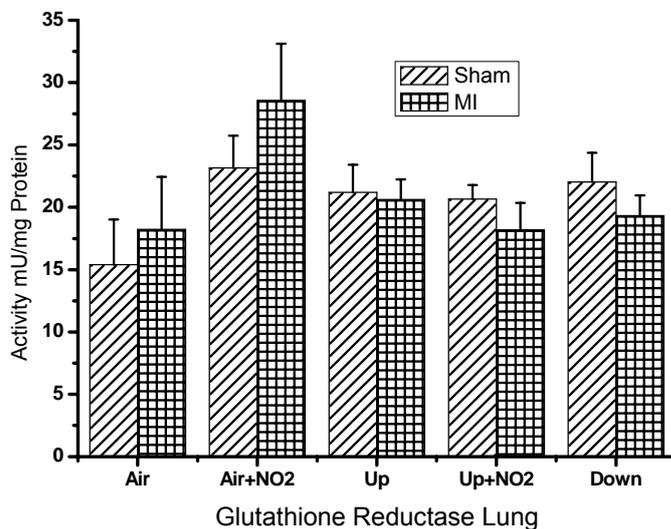


Figure 60 : activité de la glutathion réductase pulmonaire chez les rats sains et insuffisants cardiaques : impacts du NO<sub>2</sub> et de la catalyse d'oxydation

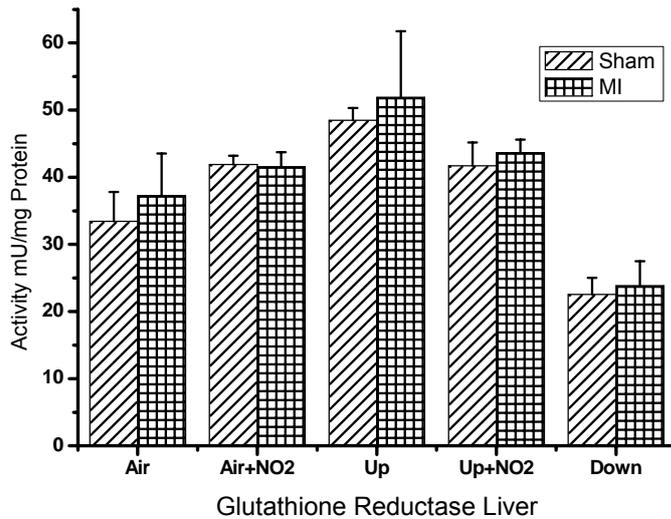


Figure 61 : activité de la glutathion réductase hépatique chez les rats sains et insuffisants cardiaques : impacts du NO<sub>2</sub> et de la catalyse d'oxydation

L'activité de la Glutathion réductase hépatique a été diminuée par les émissions catalysées, alors qu'elle était augmentée par les émissions non post-traitées. De façon intéressante il n'est pas noté de différence entre les émissions dopées au NO<sub>2</sub> et le NO<sub>2</sub> dans l'air, qui montrent un effet intermédiaire entre les émissions non post traitées et les émissions catalysées.

L'activité de la GRED Pulmonaire a été peu affectée par ces différentes conditions expérimentales, en dehors d'une élévation modérée induite par le NO<sub>2</sub> dans l'air, qui n'est pas retrouvée avec les émissions dopées en NO<sub>2</sub> ni catalysées.

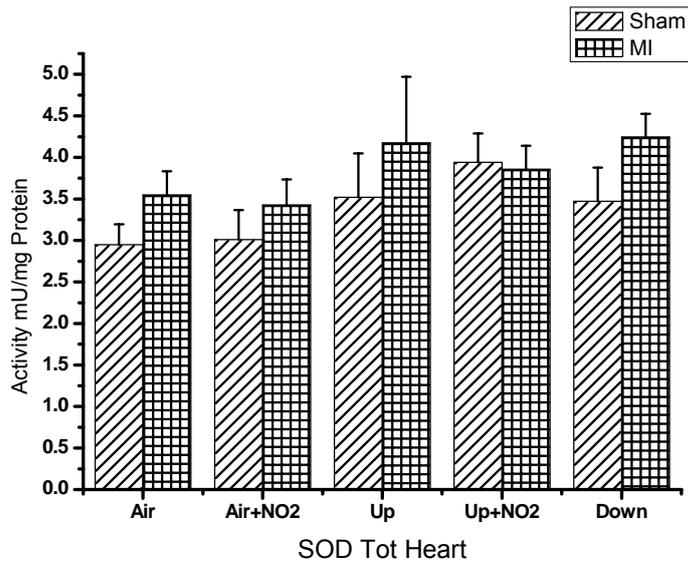


Figure 62 : activité de la superoxyde dismutase totale cardiaque chez les rats sains et insuffisants cardiaques : impacts du NO2 et de la catalyse d'oxydation

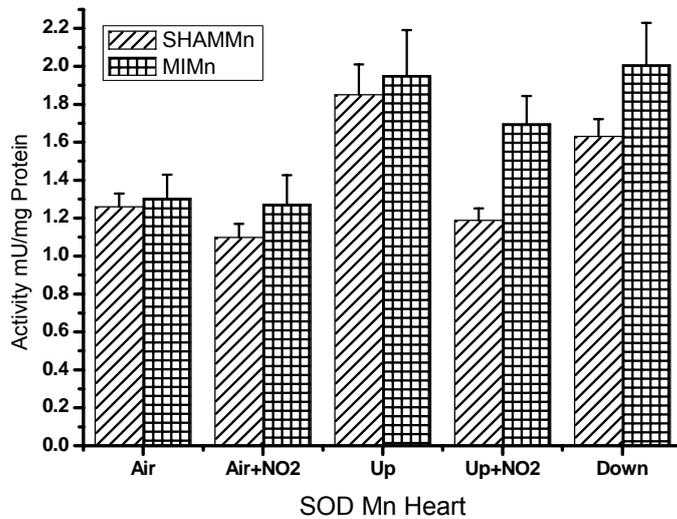


Figure 63 : activité de la superoxyde dismutase Mn dépendante cardiaque chez les rats sains et insuffisants cardiaques : impacts du NO2 et de la catalyse d'oxydation

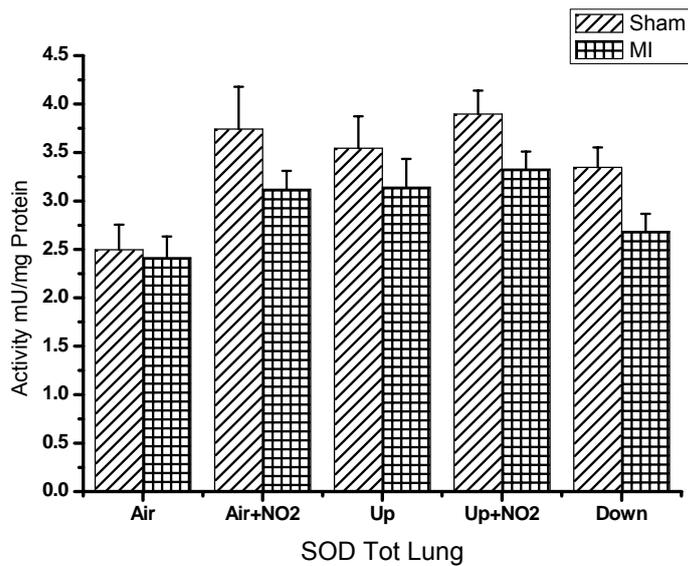


Figure 64 : activité de la superoxyde dismutase totale pulmonaire chez les rats sains et insuffisants cardiaques : impacts du NO2 et de la catalyse d'oxydation

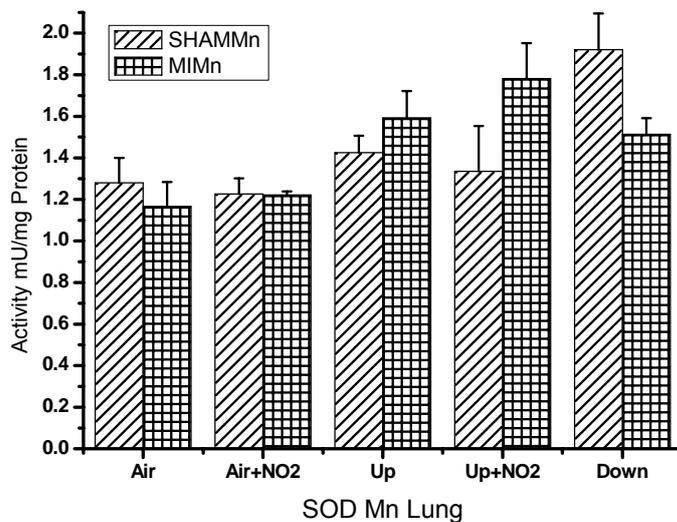


Figure 65 : activité de la superoxyde dismutase Mn dépendante pulmonaire chez les rats sains et insuffisants cardiaques : impacts du NO2 et de la catalyse d'oxydation

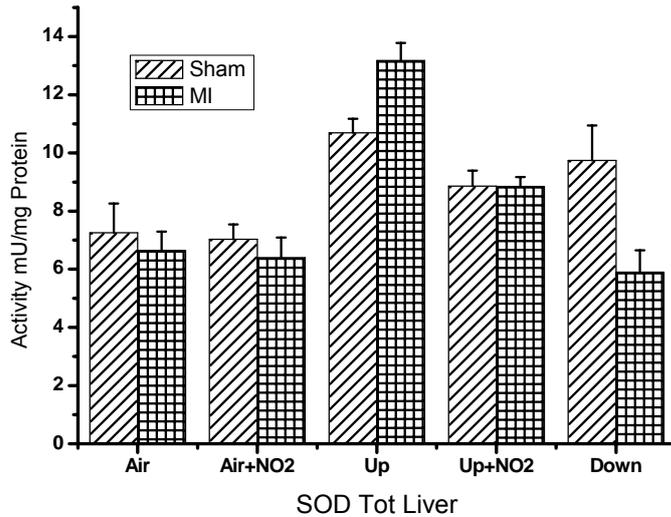


Figure 66 : activité de la superoxyde dismutase totale hépatique chez les rats sains et insuffisants cardiaques : impacts du NO2 et de la catalyse d'oxydation

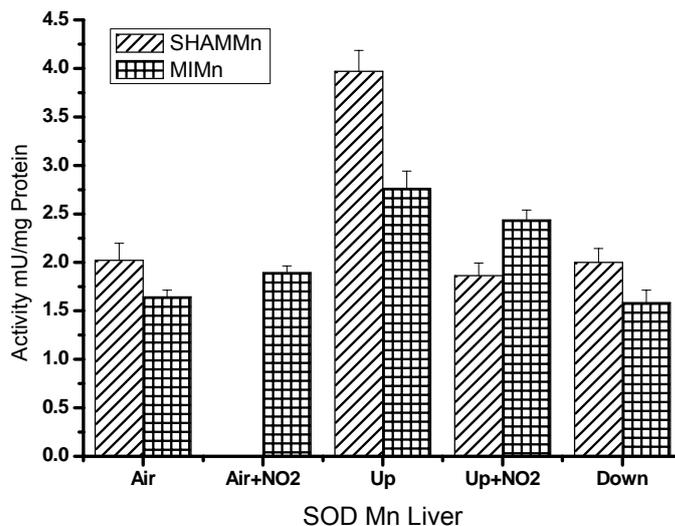


Figure 67 : activité de la superoxyde dismutase Mn dépendante hépatique chez les rats sains et insuffisants cardiaques : impacts du NO2 et de la catalyse d'oxydation

Une élévation modérée de la SOD totale cardiaque est observée pour l'ensemble des situations comportant des émissions moteur. La composante Mn dépendante de l'activité SOD cardiaque semble être à l'origine de cette élévation.

Une élévation modérée de la SOD totale pulmonaire est observée pour l'ensemble des situations comportant des émissions moteur. De même que pour l'activité cardiaque, l'isoforme Mn dépendante semble être responsable de cette augmentation.

En ce qui concerne l'activité de la SOD hépatique, peu de modifications sont observées en dehors d'une augmentation significative lors de l'exposition aux émissions non traitées.

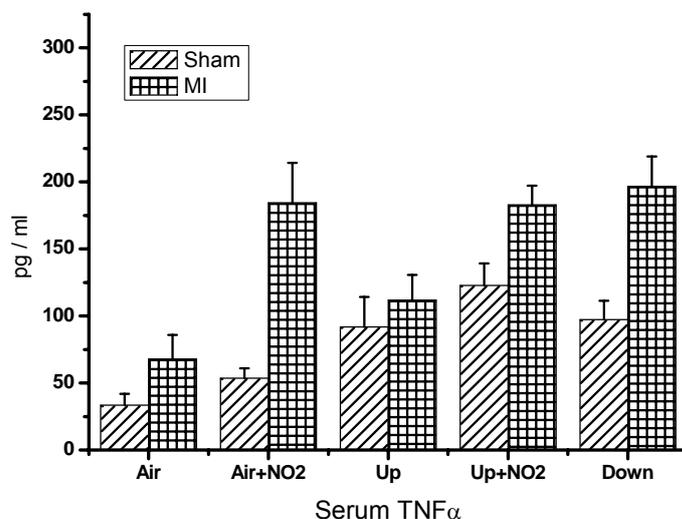


Figure 68 : Concentration du TNFalpha sérique chez les rats sains et insuffisants cardiaques : impacts du NO2 et de la catalyse d'oxydation

Une élévation des concentrations sériques de TNFa est observée pour l'ensemble des conditions comportant 4ppm de NO2 chez les animaux insuffisants cardiaques. L'élévation observée après inhalation d'émissions non post-traitées est plus modérée que lors de l'exposition au NO2. Cette élévation de TNFa pourrait être liée au stress oxydant induit par le NO2. En effet, le stress oxydant est connu pour provoquer une élévation du TNFa sérique. De plus, Devalia et al.1993 ont clairement démontré ce type d'impact in vitro sur des cultures de cellules épithéliales bronchiques exposées de façon aiguës à des concentrations de NO2 <1ppm. Il faut cependant noter que ces auteurs rapportent des effets non linéaires en

fonction de la concentration de NO<sub>2</sub> et de la durée d'exposition sur la production de cytokines telles que le TNFalpha, l'IL8, le GM-CSF. Il est vraisemblable que cette non linéarité de réponse puisse se produire en ce qui concerne l'adaptation des défenses anti-oxydantes lors de l'exposition au NO<sub>2</sub>. Les observations de Devalia pourraient en partie expliquer quelques unes des différences de réponses observées entre les études B et C.

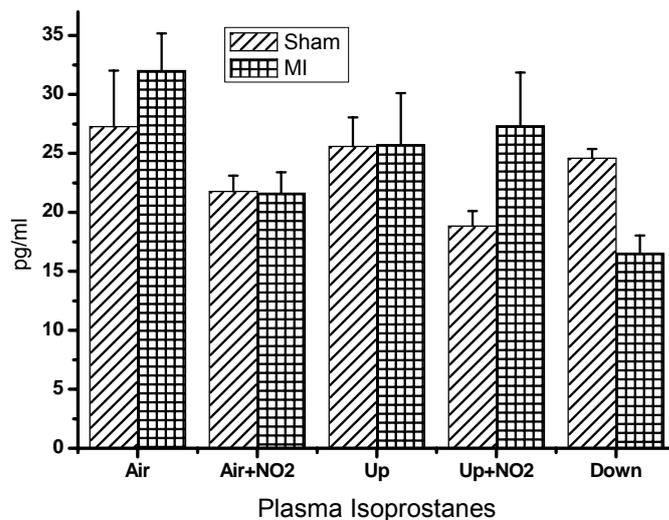


Figure 69 : Concentrations plasmatiques d'isoprostanes chez les rats sains et insuffisants cardiaques : impacts du NO<sub>2</sub> et de la catalyse d'oxydation

Malgré les conditions de stress oxydant induites par les différentes conditions expérimentales, il n'a pas été observé de variation significative des concentrations plasmatiques d'isoprostanes. Il est important de rappeler qu'une élévation de concentrations plasmatiques d'isoprostanes traduit la survenue d'un stress oxydant, mais que l'absence de modification des concentrations plasmatiques d'isoprostanes ne permet pas d'exclure la survenue d'un stress oxydant. En effet, les variations des concentrations plasmatiques d'isoprostanes sont souvent associées à des stress oxydants impliquant la mise en jeu de radicaux hydroxyles. Si comme nous en faisons l'hypothèse le NO<sub>2</sub> est l'un des principaux triggers dans nos expérimentations, celui ci est connu pour induire principalement

la production de peroxinitrites, d'anions superoxydes et de peroxyde d'hydrogène mais peu ou pas de radicaux hydroxyles lorsqu'il y a du CO<sub>2</sub> en contact avec le peroxynitrite, ce qui est le cas dans l'environnement interne pulmonaire. Ceci pourrait de nouveau conforter le NO<sub>2</sub> comme étant l'un des principaux triggers des observations réalisées.

Conclusions de l'étude enzymatique :

Il est clairement démontré dans cette partie que les situations comportant une concentration élevée de NO<sub>2</sub> soit par dopage soit par catalyse d'oxydation des émissions induisent un stress oxydant systémique important. Il apparaît très clairement que le poumon n'est pas la seule cible touchée par ce stress oxydant et que des adaptations des capacités de défenses anti-oxydantes sont observées tant au niveau cardiaque qu'hépatique.

La situation provoquant le stress oxydant le plus marqué apparaît être clairement l'inhalation d'émissions traitées par catalyse d'oxydation.

Ces études in vivo confirment les résultats des études in vitro réalisées dans le laboratoire U644/CERTAM sur cultures organotypiques de tissu pulmonaire dans le cadre du programme MAAPHRI, dont une brève récapitulation est donnée ci-dessous.

	Diesel Exhaust (Low NO <sub>2</sub> /NO ratio)		Diesel Exhaust (High NO <sub>2</sub> /NO ratio)		NO <sub>2</sub> Alone
	Total	Filtered	Total	Filtered	
ATP	=	=	-	-	-
GPx	+ =	+ =	+	+	+
GST	+	+	=	=	=
Catalase	+ =	+ =	++	+	++
GSH	-	-	--	--	-
SOD	+	+	-	-	-
TNF $\alpha$	++	=	+ - $\odot$	+ - $\odot$	+ - $\odot$
8-OxoG	+	+ =	+++	+++	?

Les données en bleu correspondent à des émissions de moteurs Diesel non post-traitées comportant un faible ratio NO<sub>2</sub>/NO<sub>x</sub> (<0.15). Il apparaît clairement deux types d'impacts de ces émissions : un stress oxydant modéré lié à la phase gazeuse des émissions et un impact inflammatoire et sur l'apoptose essentiellement lié à la phase particulaire comme en atteste l'expérience de filtration en ligne de prélèvement.

Les données en rouge correspondent à des émissions de moteurs Diesel pot-traitées par catalyse d'oxydation, comportant un fort ratio NO<sub>2</sub>/NO<sub>x</sub> (0.5). Il apparaît une diminution de la viabilité tissulaire (déplétion en ATP) une induction de la glutathion peroxydase et de la catalase, une importante déplétion de glutathion, une diminution d'activité de la superoxyde dismutase, une forte élévation de 8-oxo-guanine et une induction modérée de TNF $\alpha$ , signant la survenue d'un stress oxydant majeur, peu modifié par la filtration des émissions, ce qui incrimine la phase gazeuse des émissions.

Les données en vert sont obtenues avec du NO<sub>2</sub> dilué dans l'air propre à une concentration identique à celle retrouvée dans les échappements catalysés. Le profil de réponse est analogue à celui observé avec les émissions catalysées, démontrant ainsi la capacité du NO<sub>2</sub> à reproduire

les effets des émissions catalysées sur les paramètres mesurés reflétant la viabilité tissulaire et le stress oxydant.

### 6.2.2 Résultats ECG

Les résultats acquis au cours de la première année nous avaient conduits à observer que les animaux MI apparaissaient plus sensibles que les rats sains en terme de troubles du rythme et du contrôle cardiaque induits par les émissions de moteurs Diesel.

Nous nous sommes principalement attachés à une analyse fine des résultats obtenus chez les rats insuffisants cardiaques, par une évaluation des variations des paramètres de variabilité d'une part, et des principales séquences représentatives de troubles du rythme identifiés et quantifiés par analyse en dynamique symbolique.

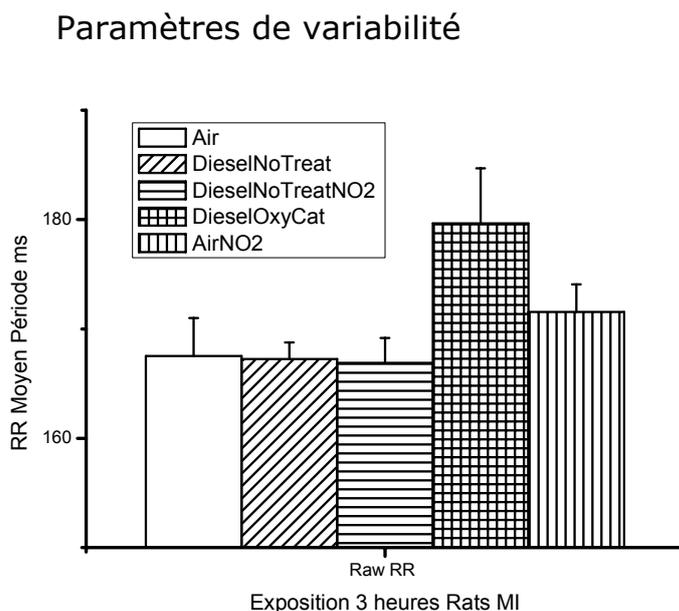


Figure 70 : Evolution de la fréquence cardiaque chez 6 rats insuffisants cardiaques chroniques

Une bradycardie modérée mais significative est observée lors de l'inhalation de NO<sub>2</sub> dans l'air. Une bradycardie marquée est observée lors de l'inhalation d'émissions traitées par catalyse d'oxydation. Il s'agit de

données moyennées sur la totalité de la période d'exposition. Comme nous le montrerons plus bas, la cinétique de survenue de cette bradycardie est relativement rapide puisqu'elle est observée dès la 100<sup>ème</sup> à la 120<sup>ème</sup> minute après le début de l'inhalation.

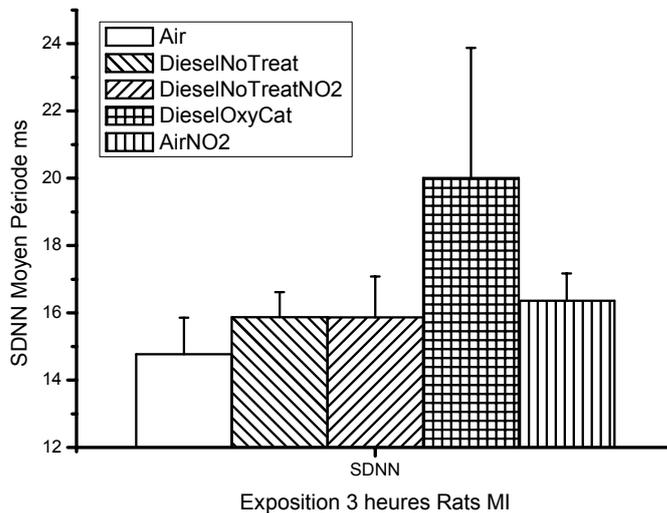


Figure 71 : Evolution variabilité du rythme cardiaque chez 6 rats insuffisants cardiaques chroniques (18 expositions) : le SDNN

Une tendance à l'augmentation du SDNN est observée lors de l'ensemble des conditions expérimentales. Une importante élévation du SDNN est observée lors de l'exposition aux émissions traitées par catalyse d'oxydation. Cette élévation est essentiellement liée à la survenue de la bradycardie observée dans cette dernière condition.

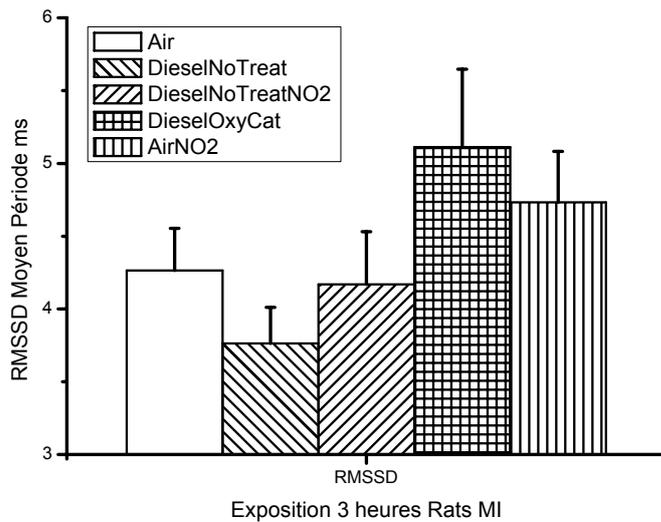


Figure 72 : Evolution variabilité du rythme cardiaque chez 6 rats insuffisants cardiaques chroniques (18 expositions) : le RMSSD

Comme décrit dans les résultats de la première expérimentation sur émissions non traitées, nous avons reproduit la baisse du RMSSD dans cette condition expérimentale, qui semble réversée par le dopage des émissions avec le NO<sub>2</sub>. Une tendance non significative à l'élévation est observée

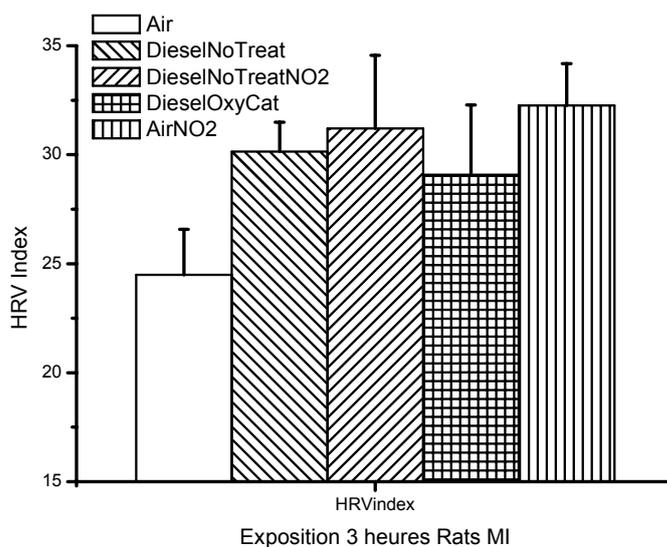


Figure 73 : Evolution variabilité du rythme cardiaque chez 6 rats insuffisants cardiaques chroniques (18 expositions) : le HRV index

### Analyse par Dynamique symbolique

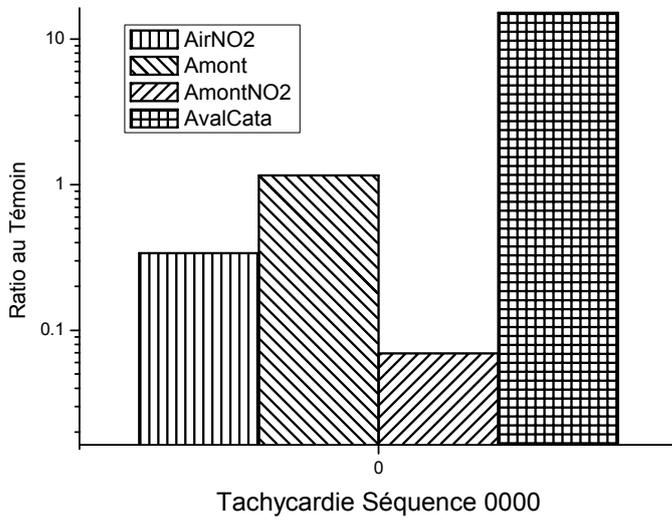


Figure 74 : Occurrence de séquences tachyarythmiques d’une durée supérieure à 4 battements consécutifs (les résultats présentent la médiane)

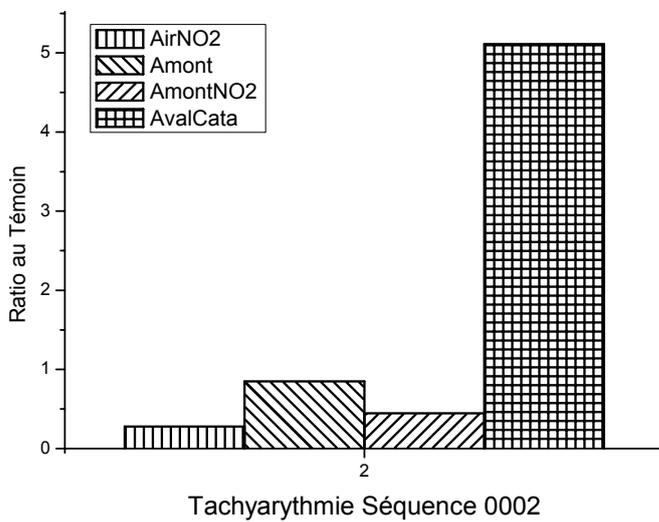


Figure 75 : dénombrement des épisodes de tachyarythmie (les résultats présentent la médiane)

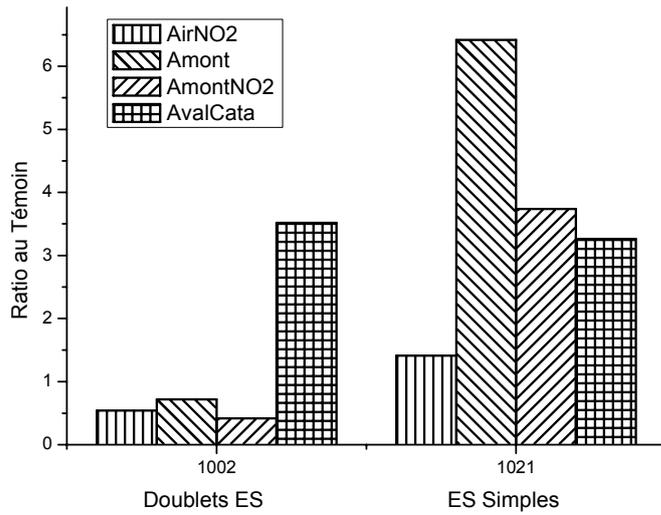


Figure 76 : Occurrences d’extrasystoles isolées et de doublets d’extrasystoles (les résultats présentent la médiane)

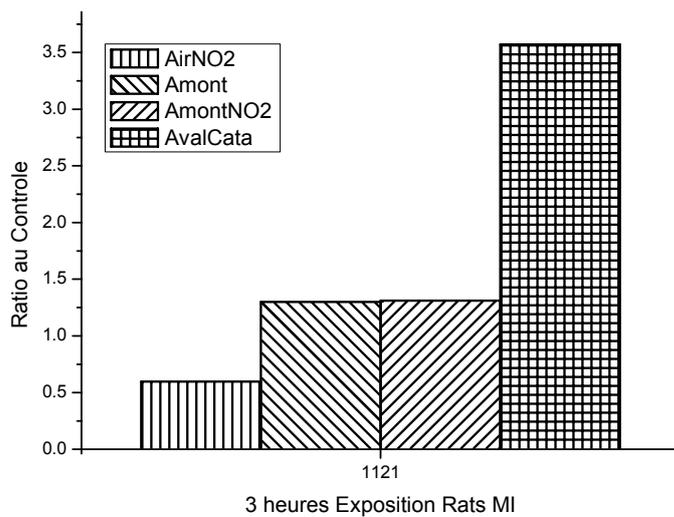


Figure 77 : Occurrences d’extrasystoles en ratio par rapport à la période pré-exposition (les résultats présentent la médiane)

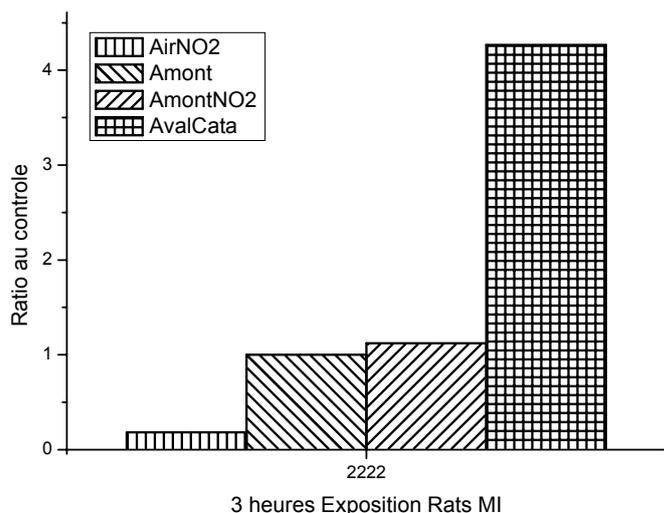


Figure 78 : Occurrence de séquences de plus de 4 battements consécutifs bradycardiques de bradyarythmies (les résultats présentent la médiane)

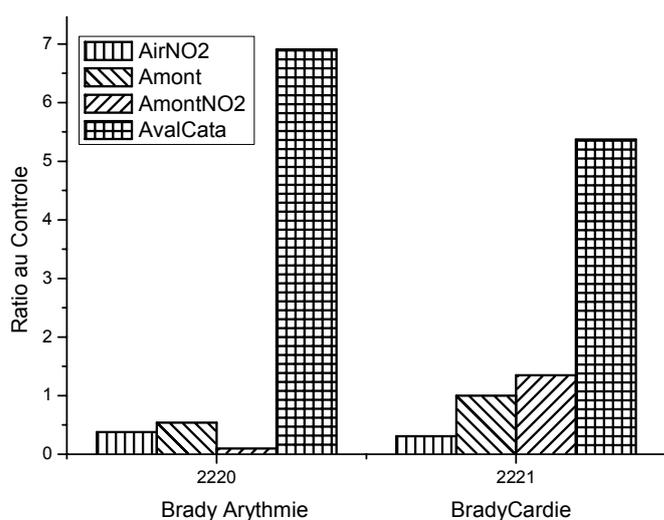


Figure 79 : Dénombrements des épisodes de bradyarythmies (les résultats présentent la médiane)

En conclusion de l'étude de survenue des arythmies, il apparaît très clairement que la situation la plus défavorable est observée en aval du catalyseur d'oxydation et que le NO2 à lui seul ne suffit pas à expliquer la totalité des phénomènes observés sur l'électrophysiologie cardiaque, il est très vraisemblable que d'autres espèces oxydantes soient émises en aval du catalyseur d'oxydation et viennent ajouter leurs

effets à celui du NO<sub>2</sub> seul, que l'on peut observer sur le RMSSD, la bradycardie et qui sont moins visibles sur la survenue d'arythmies.

### 6.3 CINETIQUE DE L'IMPACT DE L'INHALATION DE SUBSTANCES GAZEUSES OXYDANTES

#### 6.3.1 Les émissions Diesel Catalysées

##### 6.3.1.1 rats MI

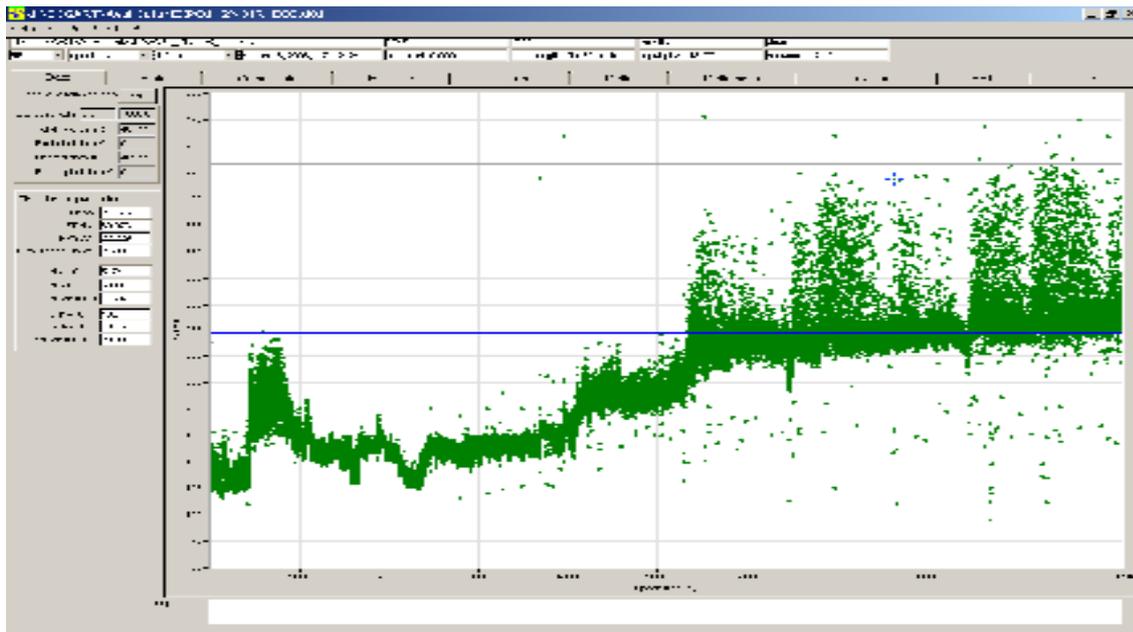


Figure 80 : Evolution temporelle de la durée des intervalles RR lors de l'exposition de rats insuffisants cardiaques chroniques à des émissions de moteurs Diesel traitées par catalyse d'oxydation. Une bradycardie initiale (<20 minutes) est suivie d'une bradycardie plus importante après 60 à 90 minutes d'exposition simultanée de la survenue de nombreuses bradyarythmies, signant un dérèglement majeur du contrôle de la fréquence cardiaque.

##### 6.3.1.2 rats Sains

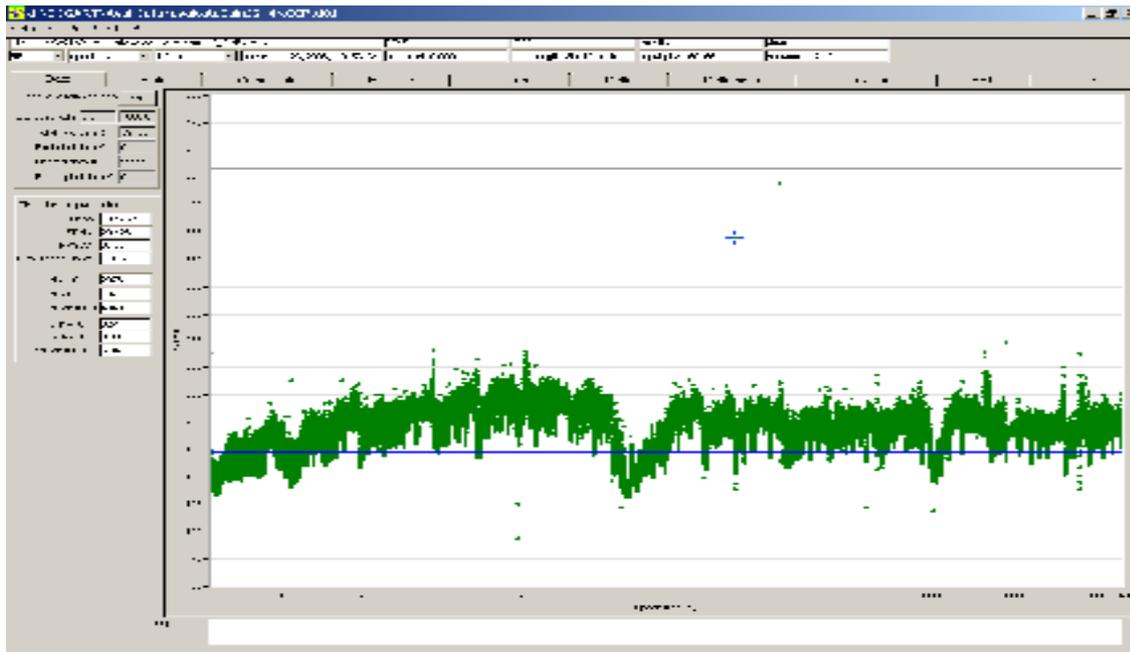


Figure 81 : Evolution temporelle de la durée des intervalles RR lors de l'exposition de rats sains à des émissions de moteurs Diesel traitées par catalyse d'oxydation

L'observation des séries temporelles de RR ci dessus montre que la survenue de la bradycardie au cours de l'inhalation d'émissions traitées par catalyse d'oxydation est un phénomène assez rapide. Alors que chez les rats sains seule une bradycardie s'installe avec une faible quantité de troubles arythmiques, il apparaît clairement chez le rat insuffisant cardiaque que l'installation de cette bradycardie ouvre la porte à la survenue de nombreux troubles brady-arythmiques.

Il est très important de noter que ces manifestations de bradycardies et de brady-arythmies n'ont jamais été observées lors des nombreuses expériences d'inhalation d'émissions non post-traitées, ces dernières ayant conduit essentiellement à la survenues de troubles de type extrasystoles et tachy-arythmies.

### 6.3.2 Le NO<sub>2</sub> Rat MI

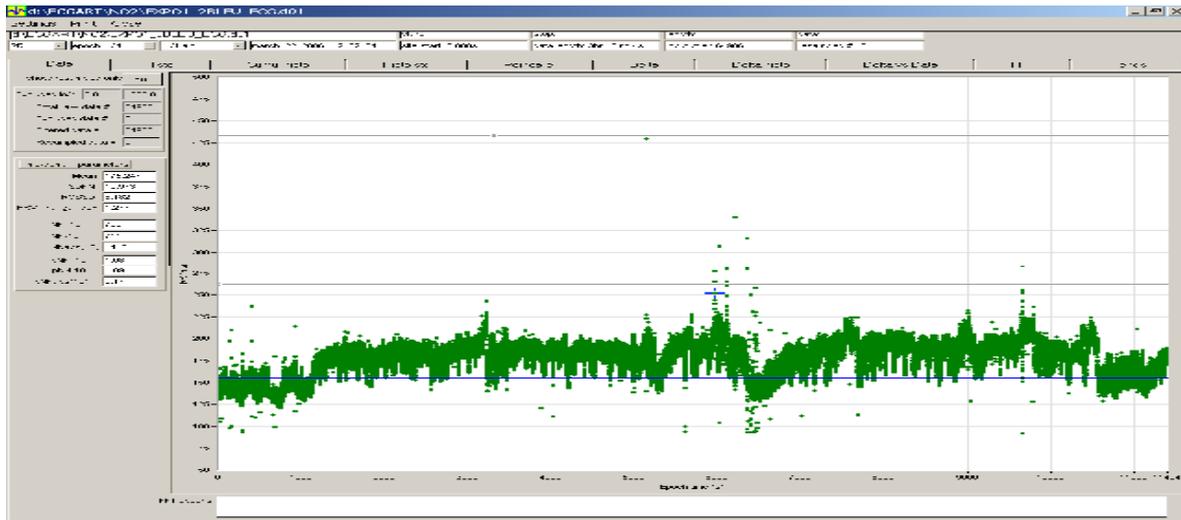


Figure 82 : Evolution temporelle de la durée des intervalles RR lors de l'exposition de rats insuffisants cardiaques chroniques à 4 ppm de NO<sub>2</sub> dans l'air

### Rats Sains

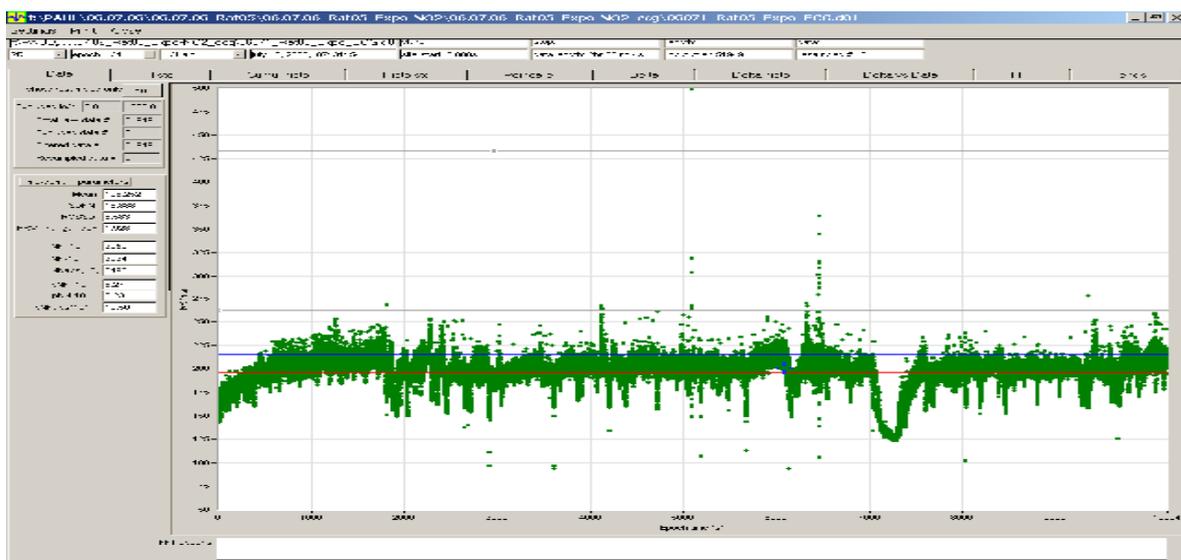


Figure 83 : Evolution temporelle de la durée des intervalles RR lors de l'exposition de rats sains à 4 ppm de NO<sub>2</sub> dans l'air

Lors de l'inhalation de NO<sub>2</sub> à la concentration de 4ppm, il est observée la survenue d'une bradycardie sensiblement de même amplitude chez le rat sain que lors de l'exposition aux émissions Diesel catalysées. Cependant, les conséquences de cette bradycardie sont restées plus modérées en terme de survenue de bradyarythmies chez le rat insuffisant cardiaque. Il

semble donc que le NO<sub>2</sub> soit capable de mimer l'induction de la bradycardie chez le rat sain et le rat insuffisant cardiaque, mais ne soit pas le composé suffisant à reproduire les nombreuses brady-arythmies observées avec les émissions Diesel catalysées .

Il paraît important de rappeler ici que les mesures de potentiel oxydant par ESR des atmosphères NO<sub>2</sub> et émissions catalysées démontrent un potentiel oxydant supérieur dans les émissions catalysées que dans les émissions dopées au NO<sub>2</sub>, ou le NO<sub>2</sub> dans l'air. Il semble donc que d'autres espèces chimiques oxydantes soient co-générées par la catalyse d'oxydation parallèlement à l'oxydation du NO en NO<sub>2</sub>, qui puissent être responsables de la différence d'impact observée.

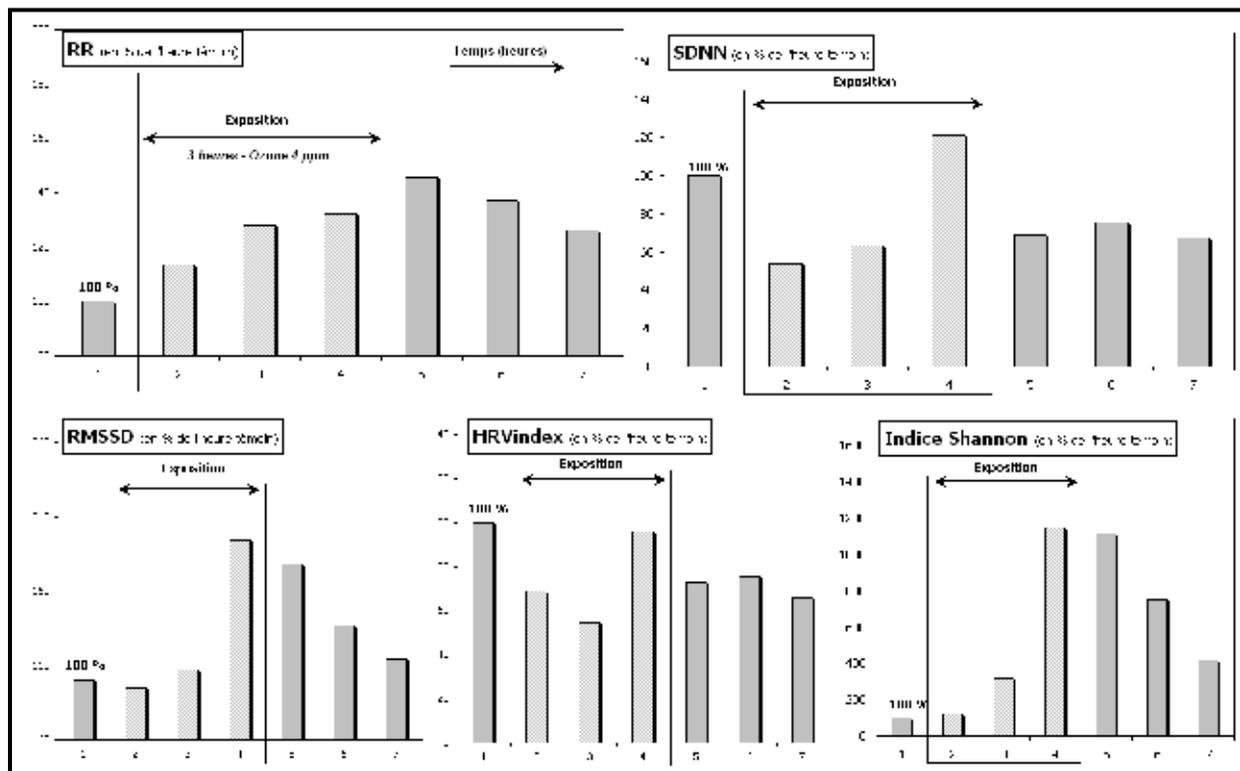
### 6.3.3 L'ozone

#### 6.3.3.1 4 ppm

##### – Paramètres HRV

La figure suivante présente l'évolution des paramètres HRV et de l'indice de Shannon de 4 rats sains implantés de capteurs télémétriques, exposés à une concentration d'ozone de 4ppm durant 3 heures pendant 2 jours consécutifs (*jour 1 et jour 2*).

Les graphiques représentent la moyenne des 4 animaux pour chaque heure



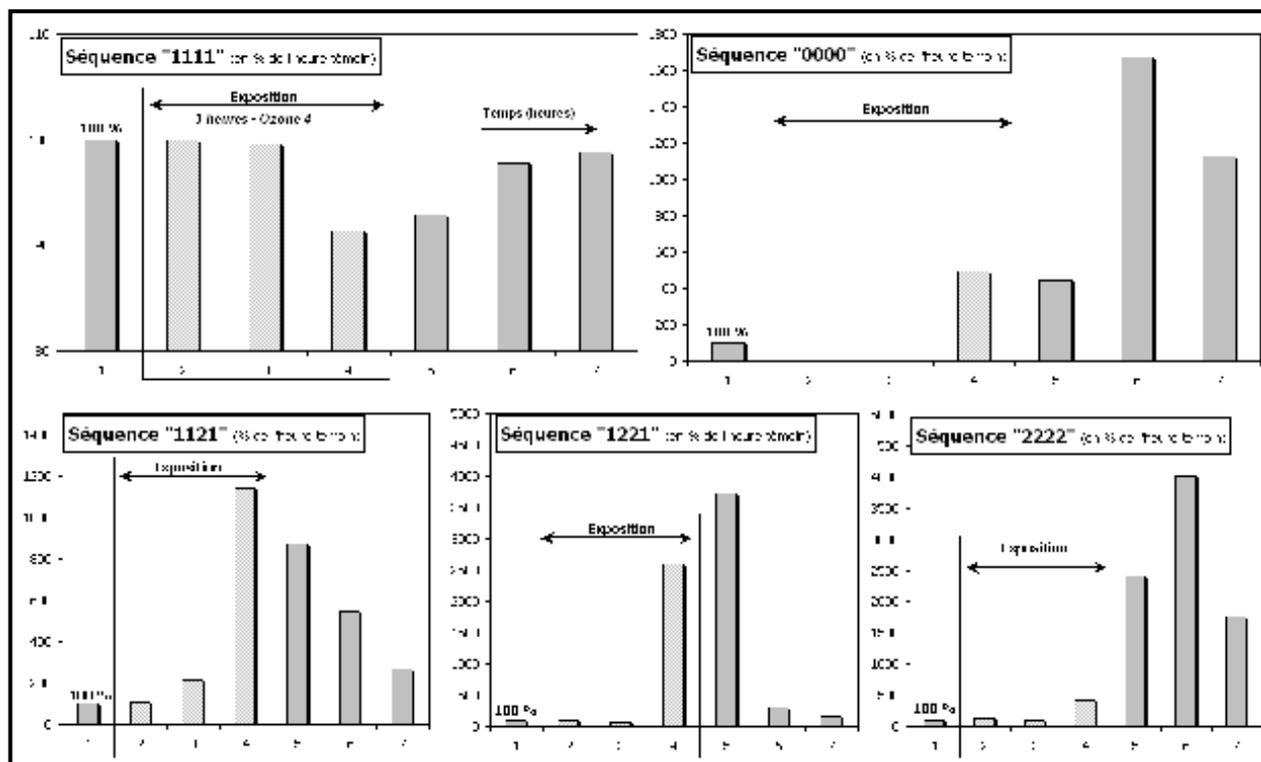
La figure 84 ci-dessus présente l'évolution des paramètres HRV et de l'indice de Shannon de 4 rats sains implantés de capteurs télémétriques, exposés à une concentration d'ozone de 4ppm durant 3 heures pendant 2 jours consécutifs (*jour 1* et *jour 2*).

Les graphiques représentent la moyenne des 4 animaux pour chaque heure d'enregistrement. Les analyses ont porté sur 1 heure d'enregistrement pré-exposition, 3 heures d'exposition et 3 heures de post-exposition. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à l'heure témoin pré-exposition (heure témoin = 100%).

La figure 85 suivante présente les fréquences de visites des principales séquences de dynamique symbolique de 4 rats sains implantés de capteurs télémétriques, exposés à une concentration d'ozone de 2ppm durant 3 heures pendant 2 jours consécutifs (*jour 1* et *jour 2*).

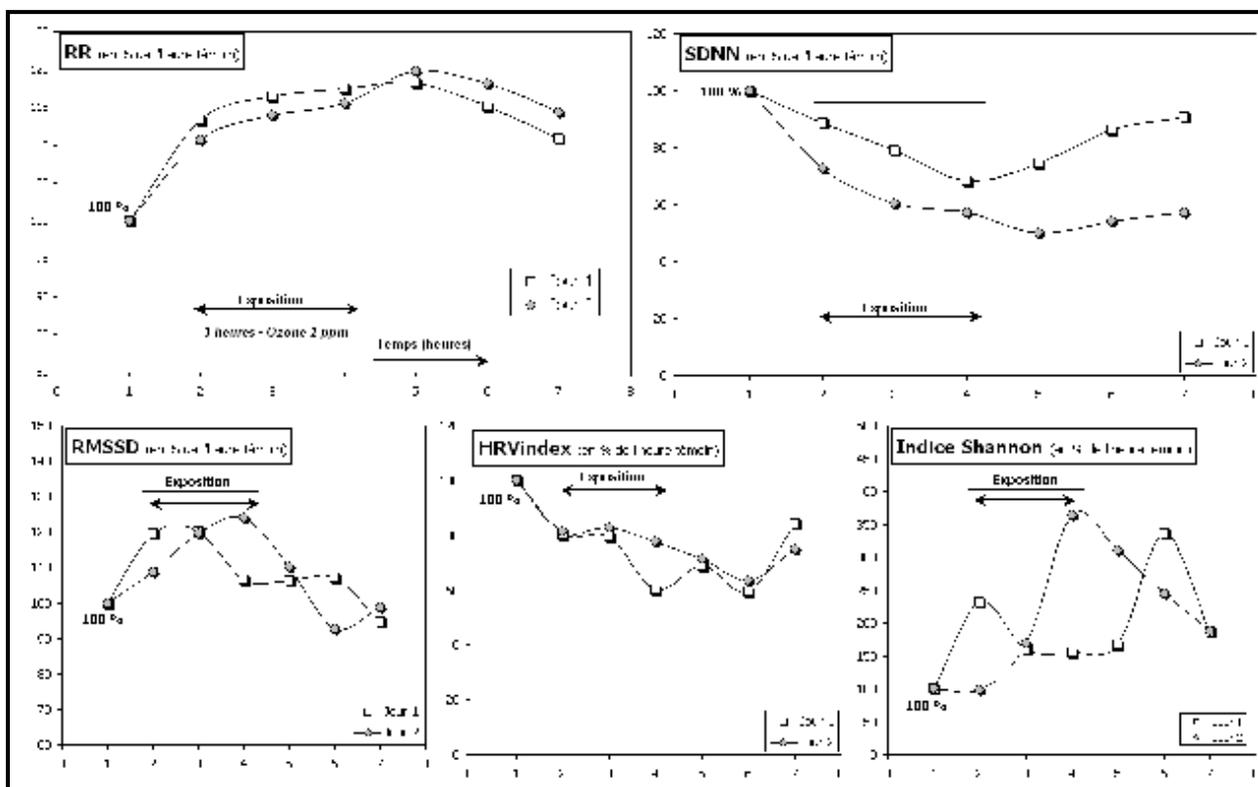
Les graphiques représentent la moyenne des 4 animaux pour chaque heure d'enregistrement du signal ECG. Les analyses ont porté sur 1 heure

d'enregistrement pré-exposition, 3 heures d'exposition et 3 heures de post-exposition. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à l'heure témoin pré-exposition (heure témoin = 100%).



### 6.3.3.2 Ozone 2ppm

La figure 86 ci-dessous présente l'évolution des paramètres HRV et de l'indice de Shannon de 4 rats sains implantés de capteurs télémetriques, exposés à une concentration d'ozone de 2ppm durant 3 heures pendant 2 jours consécutifs (*jour 1*



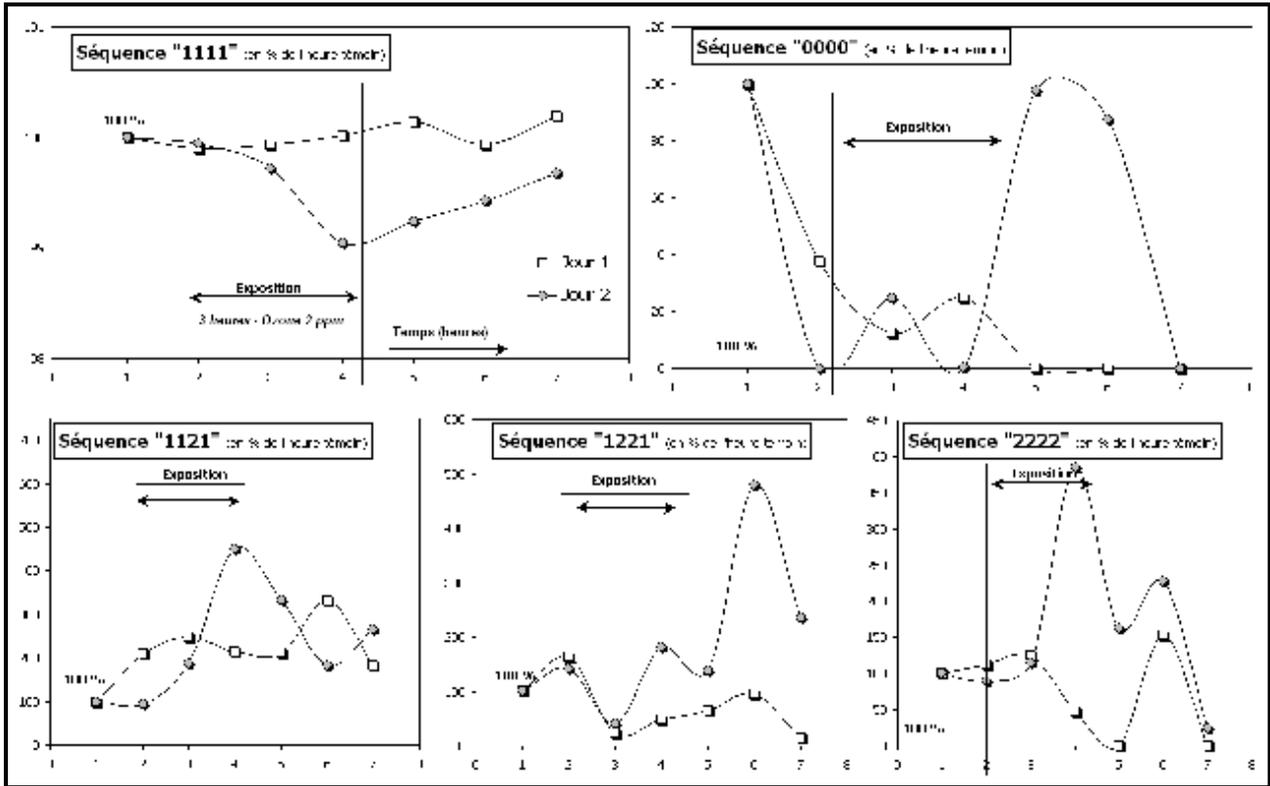
et *jour 2*).

Les graphiques représentent la moyenne des 4 animaux pour chaque heure d'enregistrement. Les analyses ont porté sur 1 heure d'enregistrement pré-exposition, 3 heures d'exposition et 3 heures de post-exposition. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à l'heure témoin pré-exposition (heure témoin = 100%).

De façon semblable aux observations faites lors de l'inhalation d'Ozone à 4ppm, il est retrouvé le même type de variation des paramètres HRV avec l'ozone à 2ppm : bradycardie et augmentation du RMSSD et élévation de l'indice de Shannon. Il semble que la réaction au deuxième jour soit retardée par rapport à celle observée au jour 1 d'exposition, et que comme pour les expositions aux émissions catalysées, un processus d'adaptation ou de défense se mette en place pour lutter contre l'agression oxydante.

La figure 87 ci-dessous Fréquences de visite des principales séquences - rats sains exposés durant 2 jours consécutifs à une concentration de 2 ppm d'ozone pendant 3 heures.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de variation par rapport à l'heure témoin, pré-exposition.



## 7 CONCLUSIONS :

- Impact des émissions de moteurs Diesel sur la fonction rénale :

Il n'a pas été observé de modification fonctionnelle rénale dans les conditions expérimentales utilisées au cours de notre étude.

Aucune modification de la filtration glomérulaire, de la protéinurie, de l'excrétion urinaire de la NAG et de la GGT, de l'excrétion urinaire des osmolytes n'ont pu être mises en évidence.

L'examen histopathologique n'a pas permis de déceler d'atteinte morphologique de la structure rénale, ni des membranes basales rénales.

La crainte évoquée en hypothèse pour se travail d'observer la survenue d'un syndrome de Goodpasture n'a donc pas été mise en évidence au cours de cette étude approfondie.

- Impact des émissions de moteurs Diesel sur la fonction de reproduction :

Il n'a pas été observé de modification sur la fonction de reproduction

- Impact des émissions de moteurs Diesel sur le stress oxydant systémique :

Un stress oxydant systémique est observé après exposition aux émissions de moteurs Diesel. Ce stress oxydant est mis en évidence par l'adaptation des défenses anti-oxydantes tissulaires en réaction à l'exposition aux émissions diluées. Ces réactions ne sont pas restreintes au tissu pulmonaire, mais ont été clairement retrouvées au niveau cardiaque, hépatique et rénal.

La technologie moteur, les dispositifs de post-traitement utilisés conduisent à des impacts d'intensités variables sur les différents organes et marqueurs du stress oxydant. L'état actuel des connaissances ne permet pas de donner une explication rationnelle à l'ensemble des manifestations observées sur les défenses anti-oxydantes. En effet, ces réponses ne sont généralement pas linéaires ni en fonction du temps ni en fonction de la dose mais traduisent un équilibre à un instant donné pour

une condition expérimentale. Il sera donc important de retenir de façon globale la notion de perturbation des défenses anti-oxydantes et leur adaptation de façon à prendre en charge de façon globalement la plus satisfaisante le stress oxydant périphérique

La condition expérimentale la plus délétère a été observée avec les émissions traitées par catalyse d'oxydation. Ces résultats sont corroborés par les études menées par résonance paramagnétique électronique menées par ailleurs dans le laboratoire (programme MAAPHRI), qui montrent très clairement que le potentiel oxydant des émissions de moteur Diesel traitées par catalyse d'oxydation est nettement supérieur à celui observé en présence de NO<sub>2</sub>, eux mêmes très supérieurs à celui des émissions non post-traitées.

- Impact des émissions de moteurs Diesel sur la fonction cardiaque : Développement de modèles d'insuffisance cardiaque chez une espèce alternative au rat :

Il ne nous a pas été possible d'induire une insuffisance cardiaque significative chez le cobaye par les techniques usuelles mises au point chez le rat telles que la ligature coronaire ou la cryoscopie de la paroi ventriculaire gauche.

Chez le hamster, la ligature coronaire s'est avérée très délétère et n'a pas permis d'obtenir une survie quantitativement suffisante pour permettre l'installation d'une insuffisance cardiaque chronique reproductible.

En ce qui concerne l'exploration du segment QT, les inconvénients de la mauvaise adaptabilité du QT à la fréquence cardiaque chez le rat sont retrouvés chez le hamster, alors que le cobaye se rapproche de l'homme pour cette adaptabilité, ce qui indiquait un intérêt de cette espèce pour ce paramètre.

Nous n'avons donc pas pu utiliser un modèle d'insuffisance cardiaque chronique chez le rongeur en alternative à l'espèce rat, chez une espèce adaptant la durée de l'intervalle QT par rapport à celle de l'intervalle RR.

L'exposition de cobayes sains aux émissions de moteur Diesel non post-traités induit une augmentation de la durée de l'intervalle QT. Ce point est un pronostic défavorable pour la fonction cardiaque. (pour mémoire, une élévation de la durée de l'intervalle QT lors des études de pharmacologie de sécurité du médicament est le plus souvent une cause d'arrêt de développement)

De même que chez le rat, les exposition de cobayes sains aux émissions diluées de moteur Diesel non post traité ont induit une diminution de la variabilité cardiaque, RMSSD et HRV index. Une telle réduction est également observée chez le rat sain et insuffisant cardiaque et a été rapportée chez l'homme dans plusieurs études expérimentales et épidémiologiques.

Alors que l'exposition des rats sains n'induit pas significativement de phénomènes arythmiques, l'exposition de rats insuffisants cardiaques induit une augmentation précoce du nombre d'extrasystoles ventriculaires, il n'est peu ou pas observés d'évènements arythmiques d'origine supra-ventriculaires. Les troubles observés avec les émissions non post traitées sont essentiellement d'origine ventriculaire. L'exposition répétée a conduit chez certains animaux insuffisants cardiaques à la survenue d'épisodes de bigéminie et de tachy-arythmies ventriculaires.

Le développement et la mise en œuvre de l'approche par dynamique symbolique sur les séries temporelles de RR a permis la quantification automatisée de ces épisodes, tant pour leur fréquence que pour leur durée, et a permis une approche rigoureuse des paramètres de variabilité cardiaque sur des séries importantes de battements (de l'ordre de 60 000 battements consécutifs pour chaque animal exposé pour une période de 3 heures. Ceci confère à nos travaux un poids statistique important dans l'évaluation des fréquences de survenue des troubles observés.

En ce qui concerne les émissions de moteurs Diesel traitées par catalyse d'oxydation, le profil de la réponse cardiaque montre un impact beaucoup

plus délétère que pour les émissions non post-traitées. Une importante bradycardie est observée tant chez le rat sain que chez le rat insuffisant cardiaque, conduisant à une élévation des paramètres de variabilité (RMSSD, SDNN). Cette élévation de variabilité ne saurait être considérée comme un paramètre positif, car elle est accompagnée, et/ou secondaire chez le rat insuffisant cardiaque de nombreux épisodes brady-arythmiques le plus souvent d'origine supra-ventriculaire, dénotant d'un dysfonctionnement vraisemblable du pacemaker auriculaire suite à une atteinte de l'énergétique cellulaire. Nous avons observé une similitude de profil de réponse électrophysiologique entre les émissions traitées par catalyse d'oxydation et des travaux mettant en jeu l'administration de roténone (inhibiteur du complexe I mitochondrial). Ces observations nous conduisent à avancer l'hypothèse d'un découplage de la chaîne respiratoire mitochondriale lors de l'exposition aux émissions de moteurs Diesel traitées par catalyse d'oxydation.

Les travaux menés avec le NO<sub>2</sub> et l'ozone, deux substances gazeuses connues pour leur potentiel oxydant et irritant, nous montrent un profil de réponse analogue, avec survenue d'une bradycardie tant chez le rat sain que chez le rat insuffisant cardiaque. Les troubles brady-arythmiques sont cependant moins marqués après exposition à l'ozone ou au NO<sub>2</sub> qu'après exposition aux émissions de moteurs Diesel traitées par catalyse d'oxydation. Cependant cette similitude d'impact laisse à penser que le profil de la réponse cardiaque observée semble avoir comme point commun l'intensité du potentiel oxydant de l'atmosphère inhalée.

L'étude réalisée avec le NO<sub>2</sub> dans l'Air et les émissions dopées au NO<sub>2</sub> montre qu'il est possible de reproduire au moins partiellement la variation du profil de la réponse cardiaque liée à la catalyse d'oxydation avec le NO<sub>2</sub> gaz. Nous rappellerons ici qu'au plan analytique, la catalyse d'oxydation modifie de façon importante le ratio NO<sub>2</sub>/NO<sub>x</sub> sans modifier les émissions globales de NO<sub>x</sub>, et que nous avons pu par ailleurs montrer une étroite corrélation entre potentiel oxydant des émissions, concentration en NO<sub>2</sub> et potentiel toxique pulmonaire.

Il semble que même si la totalité de la réponse cardiaque ne saurait être imputée au seul NO<sub>2</sub>, celui-ci soit un contributeur important à la variation du profil de la réponse cardiaque observée entre émissions non post-traitées et émissions traitées par catalyse d'oxydation.

En conclusion, ce travail innovant n'a à ce jour pas d'équivalent dans la littérature scientifique disponible. En effet, il s'agit de la première étude expérimentale réalisée en inhalation chez le rat vigile et non contraint soumis à des émissions de moteurs Diesel post-traitées par catalyse d'oxydation, et ou dopées avec du NO<sub>2</sub>. Il apparaît clairement que des différences importantes de réponses sont observées selon la technologie moteur (moteur monocylindre ancienne technologie, et moteurs à injection directe haute pression à rail commun) d'une part et en fonction de la nature du post-traitement des émissions d'autre part.

Il sera donc important d'être très vigilant à la lecture de la littérature sur le type de moteur (cylindrée, technologie) et la nature des post-traitements utilisés (catalyse d'oxydation, filtre) avant de globaliser la notion d'échappements Diesel pour la prise en considération de données et leur extrapolation à d'éventuels impacts sanitaires.

## 8 RECOMMANDATIONS

Au vu des résultats décrits ci dessus et compte tenu de l'impact potentiel de certains systèmes de post-traitement des émissions (en particulier le catalyseur d'oxydation), nous insistons sur toute l'importance qu'il y aura à l'avenir de mettre en oeuvre l'étude de l'innocuité potentielle des stratégies de dépollution des émissions de moteurs Diesel et de ne pas s'attacher qu'exclusivement à la réduction quelques polluants réglementés. La prise en compte du « potentiel toxique » de l'aérosol émis 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 (résultats programme MAAPHRI), 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 moteur Diesel. La prospective annoncée bien que non encore décidée laisse prévoir, selon les sources de l'AECC en terme d'émissions qualitatives et quantitatives de NO<sub>x</sub>, une aggravation du potentiel oxydant et des émissions de NO<sub>2</sub> des moteurs Diesel auxquelles les européens seront fortement exposés dans la circulation automobile au cours des dix à quinze prochaines années en attendant l'éventuelle succès des recherches menées sur l'élimination des oxydes d'azote émis par les véhicules légers.

Comme nous avons pu le montrer ci-dessus pour la catalyse d'oxydation, ces stratégies de dépollution (catalyse d'oxydation, stratégies de régénération des FAP, DéNO<sub>x</sub>) risquent donc de conduire à une modification importante de la typologie des immissions et par là même à la survenue de nouveaux impacts sanitaires cardiorespiratoires aigus, liés aux propriétés très oxydantes de ces nouvelles émissions, rendues nécessaires par l'évolution de la réglementation « Euro », impacts qu'il conviendra de faire prendre en considération par une meilleure information des autorités sanitaires et réglementaires sur ces questions.

---