

# PREMIERE EVALUATION DES PROPRIETES GENOTOXIQUES DE L'AIR SUR LE LITTORAL DUNKERQUOIS A L'AIDE DU TEST *TRADESCANTIA* [TRAD-MCN]

Marie-Amélie RZEPKA-CUNY<sup>1</sup>  
Chantal VAN HALUWYN<sup>2</sup>  
Damien CUNY<sup>2</sup>

<sup>1</sup> : Association pour la Prévention de la Pollution Atmosphérique Nord-Pas-de-Calais  
marzepka@appanpc.fr

<sup>2</sup> : Université Lille Nord de France, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Laboratoire des Sciences Végétales et Fongiques.

## RESUME

*Le test des micronoyaux sur les inflorescences de Tradescantia paludosa clone 4430 permet de détecter les effets génotoxiques des polluants atmosphériques sur le matériel chromosomique. Ce test a été réalisé sur des inflorescences exposées sur six sites du littoral dunkerquois. Les résultats montrent une fréquence plus importante de micronoyaux par rapport au témoin sur tous les sites sauf le site rural, ce qui met en évidence la génotoxicité de l'air sur l'ensemble de la zone industrielle urbaine. En outre, les effets observés sont plus importants sur les sites industriels, ce qui peut être mis en relation avec les teneurs plus élevées de COV sur ces sites. Ainsi, cette étude novatrice sur le littoral dunkerquois a permis de mettre en évidence les propriétés génotoxiques du cocktail de polluants de l'air issus des sources industrielles et urbaines auquel la population est exposée.*

## I- INTRODUCTION

Il est communément admis aujourd'hui que la pollution atmosphérique peut avoir des effets aigus et chroniques sur la santé humaine (Kampa et Castanas, 2008 ; WHO, 2005). De nombreuses études épidémiologiques ont montré que l'exposition aux niveaux ambiants de pollution de l'air augmente le risque de morbidité et de mortalité lié aux maladies respiratoires et cardiovasculaires (Pope et al., 2002). Plusieurs études suggèrent également que la pollution atmosphérique pourrait être en cause dans l'augmentation du taux de certains cancers, comme celui du poumon (Cohen,

2000). Au sein de la région Nord-Pas de Calais, qui figure au premier rang des régions françaises en termes d'incidence et de mortalité par cancer, le littoral dunkerquois constitue un secteur où la population est particulièrement exposée à la pollution atmosphérique. En effet, c'est une zone de trafic dense lié au transport de personnes et de marchandises, au sein de laquelle de nombreuses installations industrielles (métallurgiques, sidérurgiques, traitement des métaux, activités pétrolières) sont implantées, notamment sur le bord de mer. Il existe aujourd'hui de nombreuses techniques physico-chimiques permettant de mesurer les concentrations de polluants atmosphériques en routine ou ponctuellement. Toutefois, ces techniques ne permettent pas de détecter l'ensemble des composés présents dans le cocktail de polluants, et de mener des études à grande échelle avec une densité d'équipements importante (Brunialti et Frati, 2007). En outre, les capteurs physico-chimiques donnent la concentration des polluants dans l'air, que l'on peut comparer aux valeurs guides et aux valeurs limites définies par la loi en fonction de la toxicité de ces composés, mais ne permettent pas d'évaluer les effets cumulés de ce mélange de polluants sur la santé humaine. En effet, si la toxicité de nombreux composés pris séparément est connue, on dispose en revanche de peu de données concernant leurs interactions en mélange dans l'air (effets synergiques, cumulatifs ou antagonistes) (Villarini et al., 2009 ; Carreras, 2006 ; Isidori et al., 2003). Ces limites impliquent l'utilisation de méthodes complémentaires afin d'évaluer les risques biologiques liés à la présence des polluants. Les études épidémiologiques chez l'homme sont incontournables mais longues et difficiles à mettre en œuvre, aussi l'utilisation d'organismes biologiques exposés *in situ* peut fournir des informations sur les effets biologiques du cocktail de polluants et constituer une première approche dans l'évaluation du risque pour les populations exposées. Ainsi les techniques de biosurveillance végétale à l'aide de végétaux supérieurs (parmi lesquels on peut citer *Nicotiana tabacum* et *Tradescantia paludosa*) conviennent particulièrement pour la détection des effets génotoxiques des polluants atmosphériques, notamment en raison de la sensibilité de ces végétaux aux stress environnementaux (Claxton et Woodall, 2007 ; Gopalan, 1999).

Parmi les méthodes existantes, le test *Tradescantia* Trad-MCN est couramment utilisé pour évaluer la génotoxicité des polluants dans l'environnement (Monarca et al., 2001 ; Guimaraes et al., 2000), et plus particulièrement adapté à la détection des effets clastogènes (cassures de l'ADN) induits par la pollution de l'air (Klumpp et al., 2006 ; Guimaraes et al., 2000). Mis au point par Ma (1978), il consiste à mesurer la fréquence des micronoyaux formés dans les cellules mères de

pollen de *Tradescantia*. En effet, certaines substances peuvent induire la formation de petites masses de chromatine dans le cytoplasme, qui ressemblent à de petits noyaux, que l'on appelle des micronoyaux. Schématiquement, la formation de ces micronoyaux peut se faire de deux façons (figure 1). Dans les deux cas, après la division cellulaire, un fragment de chromatine reste dans le cytoplasme de l'une des cellules filles.

Le test Trad-MCN a été utilisé dans de nombreuses études en laboratoire pour tester la clastogénécité de différents composés chimiques, tels que les carburants mixtes diesel/soja (Ma et al., 1983), l'éthylbenzène (Ma et al., 1986), le formaldéhyde (Knasmüller et Ma, 1993), le toluène (Ma et al., 1996) ou encore l'ozone (Rodrigues et al., 1996) et le dioxyde de soufre (Knasmüller et Ma, 1993). Le test Trad-MCN a également été réalisé *in situ*, dans le cadre de l'évaluation des impacts des polluants de l'air à proximité de différents types de sources industrielles, telles que des incinérateurs et décharges (Fomin et Hafner, 1998; Ma et al., 1996; Sadowska et al., 1994), des usines de caoutchouc et chimiques (Kim et al., 2003; Monarca et al., 2001), mais également des sources liées au trafic automobile en milieu urbain (Mereiles et al., 2009; Villarini et al., 2009; Misik et al., 2007; Isidori et al., 2003). Dans le cadre du programme LIFE (EUROBIONET), la génotoxicité des polluants atmosphériques urbains a été évaluée via ce test, dans 10 villes européennes en 65 sites de mesure (Klumpp et al., 2006).

Ce travail a pour but de réaliser une première évaluation des propriétés génotoxiques des polluants atmosphériques

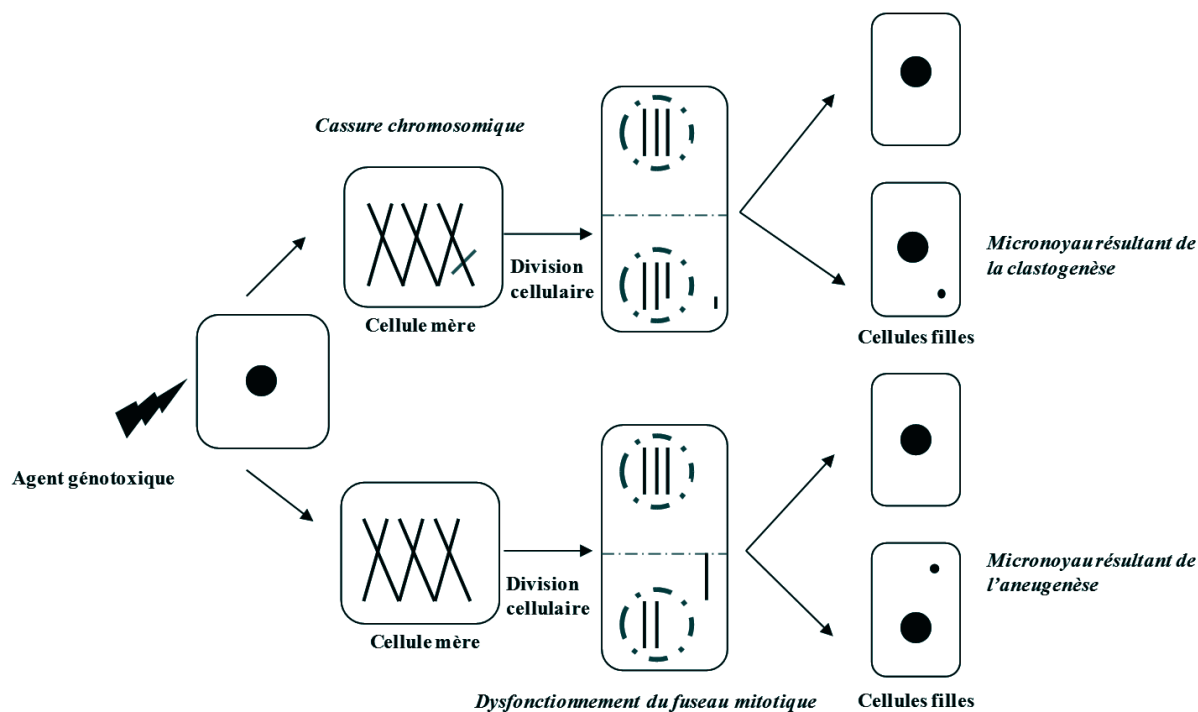
sur l'environnement du littoral dunkerquois à l'aide du test *Tradescantia* Trad-MCN. Si l'utilisation de ce test pour l'évaluation de la génotoxicité de l'air extérieur est relatée dans la bibliographie internationale, il n'existe que très peu de recherches de cette nature menées en France récemment. Cette étude présente donc un caractère innovant, tant dans sa réalisation *in situ* sur le littoral dunkerquois où se côtoient les sources de pollution atmosphérique industrielles et urbaines, que dans la mise en œuvre de la culture *in vitro* des plants de *Tradescantia paludosa clone 4430* afin de travailler sur des individus identiques, évitant ainsi les biais liés aux variations naturelles entre les individus.

## II- MATERIEL ET METHODES

### 1- Culture *in vitro*

Le Test *Tradescantia* Micronoyau (Trad-MCN) s'effectue sur les cellules mères de pollen des plants de *Tradescantia clone 4430 de hirtutiflora x subcaulis*. Afin de travailler sur une population homogène possédant le même génome, les plants ont été produits par culture *in vitro* avec la collaboration de l'Institut Agricole et Horticole de Genech, à partir de quelques plants fournis par le LIEBE de l'Université de Metz.

La culture *in vitro* consiste en la mise en culture des entrenœuds prélevés sur les plants de *Tradescantia* dans des tubes contenant un milieu nutritif gélosé. Les tubes sont ensuite placés en chambre de culture. Le protocole de culture *in vitro* s'articule en 5 étapes : la préparation du milieu, la préparation



**Figure 1** : schématisation de la formation des micronoyaux (d'après Cotelle, 1999). Les substances clastogènes forment des micronoyaux en cassant l'ADN, alors que les substances aneugènes perturbent le fonctionnement du fuseau mitotique, empêchant la montée au pôle des chromatides lors de la division cellulaire.



des tubes, la préparation des plantes, la désinfection et la mise en culture. Le succès de la culture dépend des capacités de croissance de la plante, mais aussi en grande partie des précautions prises à tous moments dans le mode opératoire pour éviter les contaminations des milieux. Ainsi, le choix d'un milieu de culture adapté, le coulage des milieux, la désinfection des entre-nœuds, et le repiquage constituent des points cruciaux, dont dépend toute contamination ultérieure bactérienne ou fongique, qui ont fait l'objet d'une mise au point particulière.

Des tubes à essai contenant le milieu de culture gélosé sont préparés. Les plantes sont lavées délicatement à l'eau déminéralisée, puis les feuilles sont découpées à la base. Les tiges sont ensuite coupées en fragments contenant un nœud et éventuellement un bourgeon. Les fragments ainsi obtenus sont ensuite répartis dans des tubes en polypropylène. La désinfection des fragments se fait en les immergeant brièvement dans de l'alcool à 70°, puis dans de l'Eau de Javel à 25% pendant 30 minutes. Après rinçage à l'eau déminéralisée, les extrémités des fragments de tiges blanchies par l'eau de Javel sont ôtées et les fragments de tige sont disposés dans les tubes à essai, en les enfonçant légèrement dans la gélose. Les tubes sont ensuite placés en chambre de culture où la température est régulée à 25°C le jour et 17°C la nuit. La photopériode est de 16 heures de jour / 8 heures de nuit. Les plants qui se développent correctement *in vitro* sont ensuite repiqués dans du sol contenant du terreau et de la perlite puis placés en réacclimatation dans la serre. Une centaine de plants de *Tradescantia* a ainsi été obtenue.

## 2- Exposition et récolte

### Exposition

Deux expositions ont été réalisées : la première au mois de juin 2007, la seconde au mois de juillet 2007. Les inflorescences de *Tradescantia* ont été exposées sur six stations de typologies variées : un site rural, deux sites urbains, et trois sites industriels. Le site « Rural » est situé à Wormhout, à une vingtaine de kilomètres au sud de l'agglomération dunkerquoise. Les deux sites urbains (« Urbain 1 » et « Urbain 2 ») sont situés en atmosphère urbaine, respectivement dans l'enceinte d'un lycée de Grande Synthe, et à l'angle d'un carrefour très fréquenté au centre de Dunkerque. Les trois sites industriels (« Industriel 1 », « Industriel 2 » et « Industriel 3 ») sont situés à proximité de trois usines dont les activités prédominantes sont respectivement la pétrochimie, la chimie des polymères et la sidérurgie. Un lot d'inflorescences est disposé dans la serre de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille, afin de servir de témoin.

Lors de chaque exposition, les inflorescences de *Tradescantia* sont placées dans des flacons en polypropylène dont on perce le bouchon vissable de 5 trous. Ces flacons sont remplis aux trois quarts avec de la solution de Hoagland (1,6 g de milieu de Hoagland en poudre (Sigma) dans 1 litre d'eau ultra pure). Les feuilles des tiges des inflorescences sont coupées, et les 5 inflorescences sont glissées dans les orifices percés dans

les bouchons à cet effet. L'exposition dure 24 heures.

### Récolte

Le jour de la récolte, les inflorescences sont coupées et immergées immédiatement dans de la solution de Carnoy (1 volume d'acide acétique dans 3 volumes d'éthanol). Elles sont conservées dans cette solution pendant une nuit au moins à 4 °C à l'obscurité. La fixation permet de bloquer les divisions cellulaires. Les inflorescences sont ensuite placées dans une solution d'éthanol à 70% et conservées dans des flacons fermés, au froid et à l'obscurité, jusqu'à observation ultérieure.

## 3- Observation des micronoyaux

Le protocole suivi est celui décrit par Cotelle (1999). Les bourgeons sont disposés selon leur taille sur une plaque de verre, placée sur un contraste noir. Ils sont disséqués les uns après les autres afin d'isoler les anthères. Les anthères sélectionnées doivent être de couleur jaune pâle.

Une goutte de carmin acétique à 1% (mélange de 22,5 ml d'acide acétique dans 37,5 ml d'eau ultra pure, puis ajout de 0,5 g de carmin en poudre à l'acide) est ajoutée et les anthères sont délicatement écrasées pour libérer les cellules mères de pollen.

Pour observer les micronoyaux formés lors de la division cellulaire, les cellules des bourgeons doivent se trouver au début du stade tétrade. La présence d'une enveloppe entourant les quatre futures cellules issues de la division, observable à un grossissement de 200, indique que les cellules sont effectivement à ce stade. Dans ce cas, une seconde goutte de carmin acétique est ajoutée, puis une lamelle est posée. Les lames sont chauffées légèrement sur une flamme et pressées délicatement avec la paume de la main pour vérifier l'intégrité de la membrane entourant les cellules. Ne sont conservées que les lames au bon stade pour le comptage des micronoyaux. Afin d'éviter les confusions avec des cristaux de colorants par exemple, des critères précis ont été établis pour identifier correctement les micronoyaux. Ainsi, la situation dans le cytoplasme entre la membrane nucléaire et la membrane cytoplasmique, l'absence de contact avec le noyau (ou un très faible contact via une fraction de chromatine très fine), la forme arrondie et l'aspect comparable à celui du noyau après variation de la mise au point du microscope sont les caractéristiques retenues pour discriminer les micronoyaux.

Pour chaque site, 5 lames présentant des cellules au stade tétrade sont montées. Dans un second temps, le comptage des micronoyaux se fait sur les lames examinées à un grossissement de 400. Trois cents tétrades sont observées par lame, soit 1500 tétrades au total pour un site. Les résultats sont exprimés en nombre de micronoyaux pour 100 tétrades, et comparés en réalisant une ANOVA grâce au logiciel Statistica -V6 (Statsoft INC).



### III- RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats exposés ci-dessous sont interprétés par sites, mais également par typologies (industriel, urbain, rural, contrôle).

#### 1- Résultats de la première exposition

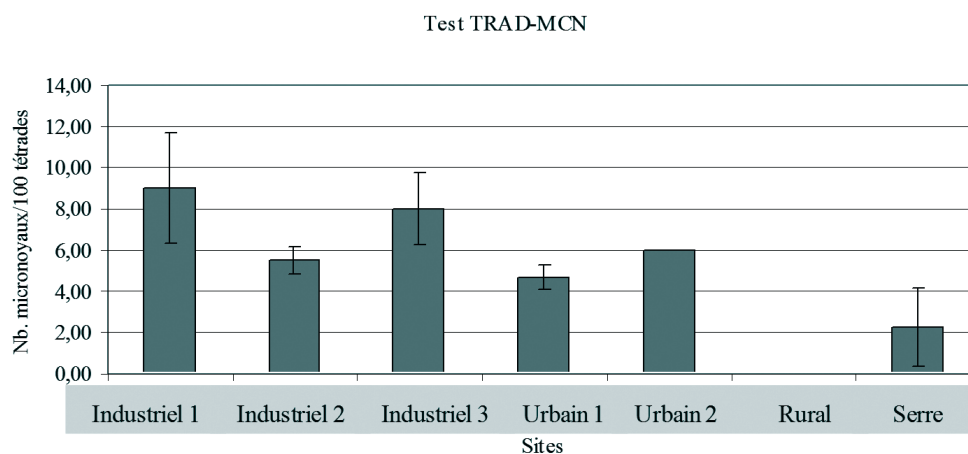
Les résultats de la première exposition sont présentés sur la figure 2. Les significativités des différences entre chacun des sites sont présentées dans le tableau 1.

Nous observons un nombre significativement plus élevé de micronoyaux pour les sites industriels par rapport aux sites urbains (résultats non présentés).

Les sites présentant le nombre moyen de micronoyaux le plus élevé sont les sites Industriel 1 et Industriel 3. Il est significativement supérieur à celui des inflorescences de la serre et du site Urbain 1. Le nombre moyen de micronoyaux est du même ordre sur les sites Industriel 2, et Urbain 2. Il est proche de celui des inflorescences exposées dans la serre. Aucune cellule ne se trouvait au bon stade de division cellulaire pour permettre des observations sur le site Rural.

	Industriel 1	Industriel 2	Industriel 3	Urbain 1	Urbain 2	Serre
Industriel 1						
Industriel 2	NS					
Industriel 3	NS	NS				
Urbain 1	S	NS	S			
Urbain 2	NS	NS	NS	NS		
Serre	S	NS	S	NS	NS	

**Tableau 1** : significativités des différences entre les nombres de micronoyaux observés dans les inflorescences exposées sur les différents sites du 5 au 6/06/07.  
NS : non significatif ; S : significatif avec  $p < 0,05$ .



**Figure 2** : comparaison du nombre de micronoyaux (moyenne +/- écart type) observés dans les inflorescences exposées sur les différents sites du 5 au 6/06/07.

#### 2- Résultats de la deuxième période d'exposition

Les résultats de la seconde période d'exposition sont présentés sur la figure 3. Les significativités des différences entre chacun des sites sont présentées dans le tableau 2.

Nous observons à nouveau un nombre significativement plus élevé de micronoyaux pour les sites industriels par rapport aux sites urbains. La typologie rurale se détache des deux autres par son nombre plus faible de micronoyaux.

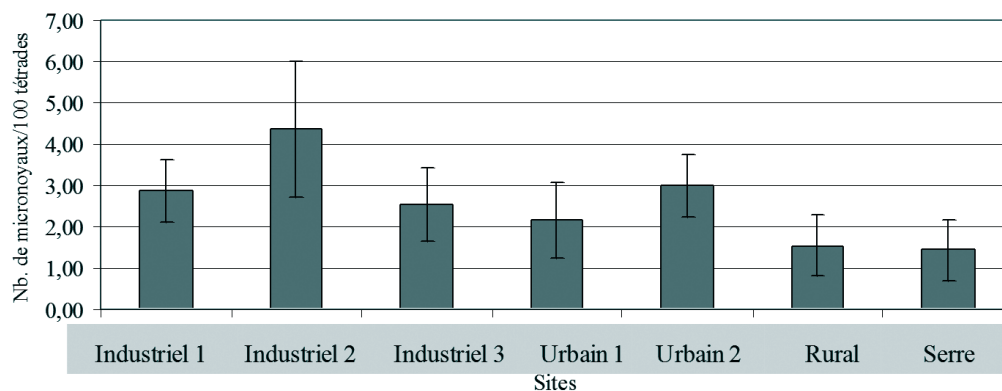
Le site Industriel 2 présente un nombre moyen de micronoyaux significativement plus élevé par rapport aux autres sites. Les sites Industriel 1, Industriel 3 et Urbain 2 présentent un nombre moyen de micronoyaux du même ordre, significativement plus élevé que celui de la serre. Le site Urbain 1 présente significativement moins de micronoyaux que les sites Industriel

	Industriel 1	Industriel 2	Industriel 3	Urbain 1	Urbain 2	Rural	Serre
Industriel 1							
Industriel 2	S						
Industriel 3	NS	S					
Urbain 1	S	S	NS				
Urbain 2	NS	S	NS	S			
Rural	S	S	S	NS	S		
Serre	S	S	S	NS	S	NS	

**Tableau 2** : significativités des différences entre les nombres de micronoyaux observés dans les inflorescences exposées sur les différents sites du 3 au 4/07/07.  
NS : non significatif ; S : significatif avec  $p < 0,05$ .



Test TRAD-MCN



**Figure 3** : comparaison du nombre de microneurons (moyenne +/- écart type) observés dans les inflorescences exposées sur les différents sites du 3 au 4/07/07.

1 et Urbain 2. On observe cette fois des microneurons dans les inflorescences exposées sur le site Rural, mais en quantité significativement inférieure par rapport à tous les autres sites sauf Urbain 1. En effet, les sites Urbain 1 et Rural sont les seuls qui ne se différencient pas significativement de la serre.

**En résumé, le nombre moyen de microneurons est de façon générale plus faible en juillet qu'en juin. Lors des deux expositions, les effets clastogènes et aneugènes sont plus forts pour la typologie industrielle, particulièrement sur Industriel 1 en juin et sur Industriel 2 en juillet. Le site qui ressort comme le moins atteint est le site Rural.**

### 3- Discussion

Le taux de microneurons observés sur les différents sites varie en fonction de leur typologie et de la période d'exposition. Comme l'ont relaté précédemment certains auteurs (Klumpp et al., 2006 ; Guimaraes et al., 2000), ceci montre la sensibilité du *Tradescantia* à la pollution atmosphérique, et la possibilité de distinguer différents niveaux de pollution à petite échelle à l'aide du test Trad-MCN, et d'en suivre l'évolution (Misik et al., 2007).

Les résultats des deux périodes d'exposition présentent le même profil, avec des effets plus importants sur les sites industriels. Cependant, les effets observés ont tendance à être plus élevés lors de la première période d'exposition. Ceci peut s'expliquer par les conditions météorologiques notamment la pluviométrie plus forte lors de la seconde exposition, qui peut avoir entraîné une précipitation des polluants, se traduisant par une diminution des effets clastogènes et aneugènes chez *Tradescantia*. Ainsi, les nombres moyens de microneurons observés sur les sites industriels 1 et 3 sont relativement similaires en juin et juillet, mais diminuent tous deux lors de la seconde exposition. En revanche, le site industriel 2 se détache de ces deux sites, avec un nombre moyen de microneurons qui varie peu entre les deux périodes d'exposition. Le nombre plus élevé de microneurons comptés sur le site Industriel 1 lors de la première exposition peut s'expliquer par sa proximité par rapport à une usine pétrochimique, et la présence de concentration en toluène dans l'air plus importante (au moins

le triple) que sur les autres sites (résultats non présentés obtenus à l'aide de tubes passifs). Ceci suggère une corrélation entre le nombre de microneurons et la teneur en toluène de l'air, comme l'ont mis en évidence Kim et al. (2003). Les effets observés sur le site Industriel 2 sont plus homogènes entre les deux expositions. Nous pensons qu'ils sont à relier à la présence de différents composés dont l'éthylène, qui sont régulièrement déchargés à proximité des plants. Cette proximité de la source expliquerait la moindre influence des conditions météorologiques.

Sur les sites urbains, les inflorescences présentent un nombre de microneurons significativement plus faible que sur les sites industriels, au cours des deux expositions. Les effets observés ont tendance à être plus importants sur le site Urbain 2 par rapport au site Urbain 1. Le manque de données concernant le site Rural pour la première exposition ne permet pas de conclure, toutefois lors de la seconde exposition il a tendance à se détacher des autres sites par un nombre plus faible de microneurons.

Comme nous l'avons vu précédemment, le test Trad-MCN a fait l'objet d'applications à proximité de différents types de sources (incinérateurs, sites industriels, décharges, usines de caoutchouc, milieu urbain, zone de trafic intense, ...), même si certains auteurs soulignent sa meilleure sensibilité à la pollution urbaine (Villarini et al., 2009 ; Klumpp et al., 2006). Ainsi, Klumpp et al. (2006) dressent le bilan des résultats obtenus par le test Trad-MCN au cours du programme européen LIFE de biosurveillance de la qualité de l'air (1999 – 2002). Les résultats mettent en évidence un effet génotoxique élevé dans les sites urbains et principalement dans ceux soumis à la plus forte densité de trafic automobile. Par contre, parmi les sites industriels testés dans ce programme, un seul présentait une différence significative par rapport aux sites urbains et suburbains. Au contraire, dans notre étude, les effets sont plus importants pour la typologie industrielle. Cependant, lors de la seconde exposition, on note que le site Urbain 2, qui est soumis à une certaine densité de trafic présente des résultats du même ordre que les sites Industriels 1 et 3.



## CONCLUSION

Cette étude montre une formation de micronoyaux plus importante sur tous les sites sauf le site rural par rapport au site témoin (serre). Ceci met en évidence la génotoxicité des polluants atmosphériques sur l'ensemble de la zone industrielle portuaire et la zone urbaine environnante. Les résultats de cette première évaluation sur le littoral dunkerquois à l'aide du test Trad-MCN sont en accord avec les études relatées dans la bibliographie, mettant en avant l'influence des activités industrielles, notamment l'impact des composés organiques volatils sur la génotoxicité de l'air en milieu industriel urbain, comme l'ont montré par ailleurs Misik et al. (2007). En outre, il apparaît au vu des résultats de ce test, que le cocktail de polluants issus des émissions liées aux industries et au trafic urbain, auquel est exposée la population locale, présente un caractère génotoxique. Comme l'ont mentionné certains auteurs, les effets génotoxiques détectés sur les cellules de *Tradescantia* informent sur le potentiel génotoxique de l'air mais ne peuvent être associés en l'état directement aux cancers observés chez l'Homme (Ma et al., 1994). Aussi, il pourrait s'avérer intéressant de coupler l'observation de micronoyaux dans les inflorescences de *Tradescantia* exposées régulièrement en différents points de l'agglomération dunkerquoise avec l'étude de données épidémiologiques, notamment l'étude d'indicateurs de santé, comme Mariani et al. (2009) l'ont fait dans une étude récente, montrant une corrélation entre la fréquence des micronoyaux et le taux de mortalité par maladies cardiovasculaires et cancer.

## REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans le cadre de l'IRENI (Institut de Recherche en Environnement Industriel) et a bénéficié du financement du Conseil Régional Nord-Pas de Calais. Nous remercions chaleureusement les partenaires scientifiques qui nous ont apporté leur aide pour la réalisation de ces travaux, plus particulièrement Sylvie Cotelle (LIEBE de l'Université de Metz) pour la mise en place du test *Tradescantia* micronoyaux et Muriel Picot (Laboratoire d'in vitro de l'Institut Horticole de Genech) pour la mise en place des cultures *in vitro*.

## BIBLIOGRAPHIE

Brunialti G. et Frati L. (2007). Biomonitoring of nine elements by the lichen *Xanthoria parietina* in Adriatic Italy: a retrospective study over a 7-year time span, *The Science of the Total Environment*, 387, p. 289-300.

Carreras H.A., Pignata M.L., Saldiva P.H.N. (2006). In situ monitoring of urban air in Cordoba, Argentina using the *Tradescantia*-micronucleus (Trad-MCN) bioassay, *Atmospheric Environment*, 40, p. 7824-7830.

Claxton L.D., Woodall Jr. G.M. (2007). A review of the mutagenicity and rodent carcinogenicity of ambient air. *Mutation Research*, 636, p.36-94.

Cohen A.J. (2000). Outdoor air pollution and lung cancer. *Environmental Health Perspectives*, 108 (Suppl. 4), p.743-750.

Cotelle S. (1999). Etude de la génotoxicité de matrices complexes à l'aide de plantes supérieures, *Thèse de Doctorat de L'Université de Metz, soutenue le 22 janvier 1999*.

Fomin A., & Hafner C. (1998). Evaluation of genotoxicity of emissions from municipal waste incinerators with *Tradescantia*-micronucleus bioassay (Trad-MCN), *Mutation Research*, 414, p. 139-148.

Gopalan H.N.B. (1999). Ecosystem health and human well being: the mission of the international program on plant bioassays, *Mutation Research*, 426, p.99-102.

Guimaraes E.T., Domingos M., Alves E.S., Caldini Jr N., Lobo D.J.A. (2000). Lichtenfels A.J.F.C. & Saldiva P.H.N., Detection of the genotoxicity of air pollutants in and around the city of Sao Paulo (Brazil) with the *Tradescantia*-micronucleus (Trad-MCN) assay, *Environmental and Experimental Botany*, 44, p.1-8.

Isidori M., Ferrara M., Lavorgna M., Nardelli A. & Parrella A. (2003). In situ monitoring of urban air in Southern Italy with the *Tradescantia* micronucleus bioassay and semipermeable membrane devices (SPMDs), *Chemosphere*, 52, p 121-126.

Kampa M., Castanas E. (2008). Human health effects of air pollution. *Environmental Pollution*, 151, p. 362-367.

Kim J.K., Shin H.S., Lee J.-H., Le, J.-J. et Lee J.-H. (2003) Genotoxic effects of volatile organic compounds in a chemical factory as evaluated by the *Tradescantia* micronucleus assay and by chemical analysis, *Mutation Research*, 541, p.55-61.

Klumpp A., Ansel W., Klumpp G., Calatayud V., Garrec J.P., He S., Peñuelas J., Ribas A., Ro-Poulsen H., Rasmussen S., Sanz M.J. & Vergne P. (2006). *Tradescantia* micronucleus test indicates genotoxic potential of traffic emissions in European cities, *Environmental Pollution*, 139, p.515-522.

Knasmüller S. & Ma T.H. (1993). Die Verwendung von *Tradescantia* zum Nachweis erbgutschädigender chemikalien in der Umwelt, in : Schöffl H., Schulte-Herma, R. & Tritthardt H.A. (eds), *Möglichkeiten und grenzen der reduktion von tierversuchen*, Springer, New York, p. 127-132.

Ma T.H., Cabrera G.L., Chen R., Gill B.S., Sandhu S.S., Vandenberg A.L., Salamone M.F. (1994). *Tradescantia* micronucleus bioassay. *Mutation Research*, 310, p. 221-230.

Ma T.H., Lower W.R., Harris F.D., Poku J., Anderson V.A., Harris M.M. & Bare J.L. (1983). Evaluation by the *Tradescantia* micronucleus test of the mutagenicity of internal combustion engine exhaust fumes



from diesel and diesel-soybeanoil mixed fuels, in: *Waters M.D., Sandhu S.S., Huisingsh J.L., Claxton L. & Nesnow S. (eds), Short term bioassays in the analysis of complex environmental mixtures II, Plenum Press, New York, p. 89-99.*

Ma T.H., Sparrow A.H., Schairer L.A. & Nauman A.F. (1978). Effects of 1,2-dibromoethane (DBE) on meiotic chromosomes of *Tradescantia*, *Mutation Research*, 58,p. 251-258.

Ma T.H., Xu C., Liao S., Mc Connell H., Jeong B.S. & Won C.D. (1996). In situ monitoring with the *Tradescantia* bioassays on the genotoxicity of gaseous emission from a closed landfill site and a incinerator, *Mutation research*, 359, p. 39-52.

Ma T.H., XU Z., Harris M.M. & Lin G. (1986). Dose-response of formaldehyde-fume-inducing chromosome damage in *Tradescantia* pollen mother cells, *Environmental Mutagenesis*, 8, p.49.

Mariani R.L., Jorge M.P.M, Pereira S.S, Melione L.P, Carvalho-Oliveira R., Ma T.H. & Saldiva P.H.N. (2009). Association between micronuclei frequency in pollen mother cells of *Tradescantia* and mortality due to cancer and cardiovascular diseases: A preliminary study in Sao José dos Campos, Brazil, *Environmental Pollution*, 157, p. 1767-1770.

Meireles J., Rocha R., Costa Neto A., Cerqueira E. (2009). Genotoxic effects of vehicle traffic pollution as evaluated by micronuclei test in *Tradescantia* (Trad-MCN), *Mutation Research*, 675, p. 46-50.

Misik M., Micieta K., Solenska M., Misikova K. , Pisarcýkova H., Knasmüller S.(2007).In situ biomonitoring of the genotoxic effects of mixed industrial emissions using the *Tradescantia* micronucleus and pollen abortion tests with wild life plants: Demonstration of the efficacy of emission controls in an eastern European city, *Environmental Pollution*, 145, p. 459-466.

Monarca S., Feretti D., Zanardini A., Moretti M., Villarini M., Spiegelhalder B., Zerbini I., Gelatt, U. & Lebbolo E.(2001) Monitoring airborne genotoxicants in the rubber industry using genotoxicity tests and chemical analyses, *Mutation Research*, 490,p.159-169.

Pope 3rd C.A., Burnett R.T., Thun M.J., Calle E.E., Krewski D., Ito K., Thurston G.D. (2002). Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *Journal of the American Medical Association*, 287, p. 1132-1141.

Rodrigues G.S., Madkour S.A. & Weinstein L.H. (1996), Genotoxic activity of ozone in *Tradescantia*, *Environmental and Experimental Botany*, 36, p. 45-50.

Sadowska A., Pluygers E., Narkiewicz M., Pawelczak A. & Lata, B. (1994). Environmental genotoxicity and cancer risk in humans: a combined evaluation correlating the results of the *Tradescantia* micronucleus assay in the field and human biomarker assessments in serum. I. The TRAD-MCN assay, *European Journal of Cancer Prevention*, 3,p. 69-78.

Villarini M., Fatigoni C., Dominici L., Maestri S. , Ederli L. , Pasqualini

S. , Monarca S. , Moretti M. (2009). Assessing the genotoxicity of urban air pollutants using two in situ plant bioassays, *Environmental Pollution*, 157, p. 3354-3356.

World Health Organization (WHO). (2005). The effects of air pollution on children's health and development: a review of the evidence. WHO Regional Office for Europe, 185 p., downloaded from /Shttp:/ /www. euro.who.int /airS.

