Université du Québec
INRS- Institut Armand Frappier

PROPRIÉTÉS PRO-INFLAMMATOIRES *IN VITRO* ET *IN VIVO* DES NANOPARTICULES DE TiO_2.

Par
David Gonçalves

Mémoire présenté
pour l'obtention du
grade de maître ès sciences
en sciences expérimentales de la santé

Jury d'évaluation

Président du Jury et examinateur interne	M. Michel Charbonneau, PhD INRS-Institut Armand Frappier
Examinateur externe	Mme Caroline Gilbert, PhD Centre de recherche en rhumatologie et immunologie, Université Laval
Directeur de recherche	M. Denis Girard, PhD INRS-Institut Armand Frappier

© droits réservés de David Gonçalves 2010

Remerciements

La nanotoxicologie est une discipline émergence. Dès ma première entrevue avec Dr. Denis Girard, mon directeur de recherche, j'étais emballé par ce projet en nanotoxicologie. Je ne savais pas toutefois, à ce moment là, à quel point j'allais apprécier faire de la recherche dans ce domaine. La rédaction de ce mémoire c'est l'aboutissement de deux belles années de travail qui ont passé excessivement vite. La bonne ambiance qui règne dans notre laboratoire y est pour quelque chose. À ce chapitre, merci à Francois Binet, Jamila Ennaciri, Francis Antoine, Jean-Cristophe Simard, Marie-Michelle Simon, Théo Stafford Richard et Francis Vallières. Évidemment, les judicieux conseils, l'enthousiasme et le support offert par le Dr. Girard y sont aussi pour beaucoup. Merci Denis! Je ne peux également oublier de mentionner ma famille : ma mère Térésa, mon père José et mon petit frère Luis Filipe, qui m'ont supporté durant les périodes de stress et d'incertitudes reliées à mon cheminement scolaire et personnel. J'aurais toutefois encore besoin de leur support car j'entame maintenant un doctorat dans le laboratoire du Dr. Girard. Je ne peux qu'espérer que les prochaines années soient le reflet des deux dernières.

Table des matières

Remerciements…….....iii

Table des matières…….iv

Liste des abréviations……...vii

Liste des figures et des tableaux…….....viii

Résumé…….....ix

Introduction…….....1

SECTION 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE……3

1: SYSTÈME IMMUNITAIRE : RAPPELS ……..4

1.1 : Composantes de l'immunité…….....4

1.1.1 Coopération entre immunité innée et acquise…….....4

1.1.2 Cytokines ……..5

1.1.3 Chimiokines……5

1.1.4 Cellules de l'immunité spécifique……..6

1.1.4.1 Lymphocytes B…….6

1.1.4.2 Lymphocytes T…….7

1.1.5 Cellules NK.....7

1.1.6 Cellules de l'immunité non-spécifique……...8

1.1.6.1 8Cellules dendritiques……8

1.1.6.2 Macrophages……..8

1.1.6.3 Les granulocytes……9

2: LE NEUTROPHILE ET L'INFLAMMATION…….9

2.1 L'inflammation et ses caractéristiques…….9

2.2 Le neutrophile et ses caractéristiques……..10

2.2.1 Le développement du neutrophile……11

2.2.1.1 Les stades de développement du neutrophile…….12

2.2.2 Constituants du neutrophile……..14

2.3 Fonctions du neutrophile…….....15

2.3.1 Chimiotaxie et adhésion……15
2.3.2 La phagocytose…….....16
2.3.3 Destruction des corps étrangers…….17
2.3.3.1 Élimination dépendante de l'oxygène……18
2.3.3.2 Élimination indépendante de l'oxygène…….19
2.3.3.2.1 Dégranulation……..19
2.3.3.3 Les NET…….20

2.3.4 La synthèse protéique……20
2.3.4.1 Cytokines et chimiokines……...21

2.3.5 L'élimination des neutrophiles……..22
2.3.5.1 Apoptose…….23
2.3.5.1.1 Voie extrinsèque……..24
2.3.5.1.2 Voie intrinsèque (ou mitochondriale)……..25
2.3.5.1.3 Apoptose induite en réponse au stress du Réticulum Endoplasmique……...25

3 : LES NANOPARTICULES……....26
3.1 Applications des Nanoparticules et présence dans l'environnement……...27
3.2 La nanotoxicologie……...29
3.3 Les familles de nanoparticules…….31
3.4 Les nanoparticules de Dioxide de Titane (TiO_2)……..31
3.4.1 Provenance……31
3.4.2 Applications et voies d'absorption……31
3.4.3 Distribution……32
3.4.4 Effets sur le processus inflammatoire……...33
3.4.4.1 Effets sur le neutrophile…….34

SECTION 2 : LES ARTICLES SCIENTIFIQUES……..35

Résumé en français de l'article #1……..36

Résumé en français de l'article #2……..44

SECTION 3 : DISCUSSION ET CONCLUSION…….74

BIBLIOOGRAPHIE...…….82

ANNEXE ……..89

Liste des abréviations

Ac : anticorps
CD : cellule dendritique
Cellule T_H : cellule T *Helper*
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
CSH : cellules souches hématopoïétiques
CRGN : carragénine
Cyt c : cytochrome c
fMLP: formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine
Ig: immunoglobulines
LPS: lypopolysaccharide
MPO: myéloperoxidase
NM : nanomatériaux
NNI : *National Nanotechnology Initiative*
NP : nanoparticules
NET : *neutrophil extracellular traps*
PS: phosphatydilsérines
PMN : polymorphonucléaires ou neutrophiles
RCPG : récepteur couplé aux protéines G
RcT : récepteur T
RE : réticulum endoplasmique
ROS : espèces réactives de l'oxygène
ER stress : stress du réticulum endoplasmique
SI : système immunitaire
SD : superoxide dismutase
UPR : *unfolded Protein Response*

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : L'hématopoïèse……..12
Figure 2 : Les stades de développement des PMN…….14
Figure 3 : Élimination d'un microorganisme par les voies indépendantes et dépendantes de l'oxygène……..17
Figure 4: Classification des granules chez le neutrophile……..20
Figure 5 : Nanovoiture organique, observée par microscopie à effet tunel……..28

Tableau I: Exemples de produits qui utilisent des nanoparticules et des nanomatériaux..29

Résumé

L'utilisation des nanoparticules (NP) de dioxide de titane (TiO_2) engendre des questionnements quand au risque à la santé des humains qui y deviennent de plus en plus exposés. Nous avons entrepris des travaux qui nous permettent d'avoir une meilleure compréhension des propriétés inflammatoires des NP de TiO_2. Nos résultats montrent que le TiO_2 exerce des effets pro-inflammatoires *in vitro* puisqu'il est un important agoniste du neutrophile. En effet, les NP de TiO_2 ont induit des changements morphologiques chez les PMN de façon concentration dépendante. La phosphorylation des résidus tyrosine, ainsi que des MAPK p38 et ERK 1/2, induite par le TiO_2 révèle également sont potentiel activateur. Ces NP modulent également les fonctions du PMN. L'inhhibition concentration dépendante de l'apoptose et la production de cytokines suite à des expositions prolongées en sont la preuve. Nous avons également découvert que le TiO_2 induit une infiltration leucocytaire de type neutrophilique et une production d'agents pro-inflammatoires *in vivo* chez la souris à l'aide du modèle murin de la poche d'air. Collectivement, ces travaux ont permis de classer la NP de TiO_2 comme étant pro-inflammatoire et ont également permis d'établir une approche expérimentale permettant dans le futur de caractériser les NP selon leur degré de potentiel inflammatoire.

Étudiant

Directeur de recherche

Introduction

L'inflammation est une réponse physiologique normale du corps humain à une blessure ou traumatisme. Les causes de l'inflammation sont diverses. Des remèdes, narcotiques, toxiques, pesticides (agents chimiques), silice, quartz (poussières), traumatismes, brûlures, radiations (agents physiques), bactéries, virus, champignons (agents biologiques), peuvent tous être des agents causals d'une inflammation. Celle-ci est caractérisée, entre autre, par une augmentation de la migration des leucocytes, tels les neutrophiles, vers le foyer inflammatoire. Le neutrophile, ou aussi appelé polymorphonucléaire (PMN) car il a un noyau polylobé, est le globule blanc le plus abondant dans le sang chez l'humain (50-75%). Plus de la moitié de la production cellulaire de la moelle osseuse est consacrée à la production de PMN. Les PMN sont les premières cellules à se rendre au site inflammatoire. Elles y arrivent avant les macrophages et elles y libèrent une importante quantité de cytokines. Pour ces raisons les neutrophiles sont considérés comme les chefs d'orchestre de l'inflammation. Tous les agents qui ont le potentiel de moduler l'inflammation ont nécessairement un effet sur l'état d'activation et les fonctions du neutrophile, cellule clé lors de l'inflammation. À cet effet, plusieurs études ont démontré que les fonctions des neutrophiles peuvent être fortement affectées chez les travailleurs exposés à divers polluants, xénobiotiques et agents étrangers. Il est donc étonnant de constater que malgré qu'il y ait un nombre important d'études s'intéressant au potentiel inflammatoire des nanoparticules (NP), peu d'entre elles se penchent véritablement sur les questions reliées aux effets directs des NP sur les PMN.

Une NP est définie comme "toute particule ayant au moins une dimension entre 1 et 100 nanomètres". Les NP ont des applications diverses dans divers domaines tels que la médecine, l'aérospatiale, l'agriculture, le secteur militaire et du transport pour n'en nommer que quelques uns. Par conséquent, l'exposition des humains aux NP devient de plus en plus un souci bien réel. La nanotoxicologie, un domaine en pleine expension, découle de cette nouvelle réalité. Autre constat, d'un point de vue inflammatoire, peu d'études évaluent l'effet des NP à l'aide de modèles *in vitro* et *in vivo* en parallèle.

Le but de la présente étude est d'étudier l'effet de plusieurs NP sur le processus inflammatoire *in vitro* et *in vivo* à l'aide du modèle murin de la poche d'air utilisé à maintes reprises par le passé dans notre laboratoire pour évaluer ces mêmes effets, mais causés soit par des cytokines ou encore des xénobiotiques. La première NP avec laquelle nous avons décidé d'entreprendre nos expériences est le dioxide de Titane (TiO_2). Nous l'avons choisi comme NP de départ car elle est utilisée dans de nombreuses applications telles que les crèmes solaires, les colorants alimentaires et les implants dentaires par exemple. *In vitro*, nous étions intéressés à savoir si les NP de TiO_2 étaient capables d'activer le PMN avec des tests tels les changements morphologiques, la phosphorylation des résidus tyrosine ainsi que des *mitogen activated protein Kinase* (MAPK). On voulait aussi savoir si elles étaient capables d'affecter certaines des fonctions principales comme l'apoptose et la libération de cytokines. *In vivo*, nous voulions déterminer si les NP de TiO_2 sont capables d'induire une infiltration leucocytaire dans la poche d'air murine, puis tenions à identifier les types cellulaires attirés par la NP. Ce modèle permet également de déterminer les médiateurs d'inflammation sécrétés dans la poche d'air par les cellules. Nous avions également comme deuxième objectif, d'établir une approche scientifique afin d'initier un classement des NP en fonction de leurs effets pro-inflammatoires.

SECTION 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE

Note :

La section revue de littérature débute avec un brève revue des principaux concepts et composantes du système immunitaire, suivit par une revue extensive du neutrophile, cellule clef de l'inflammation. La revue de littérature se termine avec une qui porte sur la pertinence d'étudier les effets que certaines nanoparticules peuvent avoir sur le processus inflammatoire.

1 SYSTÈME IMMUNITAIRE : RAPPELS

1.1 Composantes de l'immunité.

Le système immunitaire (SI) a deux composantes : l'immunité innée (ou non spécifique) et l'immunité acquise (ou spécifique). La première permet de résister aux maladies qui ne sont pas spécifiques à un pathogène précis et est la première ligne de défense du SI alors que la deuxième a un haut degré de spécificité et c'est elle qui confère à l'organisme la capacité de développer une mémoire immunologique (Kuby J 2000). Le SI est constitué d'un ensemble varié de types cellulaires situés dans divers tissus tels que le thymus, la moelle osseuse, la rate, les ganglions lymphatiques et d'autres organes lymphoïdes répartis dans le corps. Les cellules souches hématopoïétiques, localisées dans la moelle osseuse, sont à l'origine de toutes les cellules du SI. Elles sont pluripotentes et ont la capacité de régénérer la totalité du système immunitaire. Elles se divisent suivant deux voies principales, soit en progéniteur de cellules lymphoïdes, qui deviendront des cellules de l'immunité acquise telles que les lymphocytes T et B, soit en progéniteur de cellules myéloïdes, qui deviendront des cellules de l'immunité inné telles que les macrophages et neutrophiles (Tryphonas H. 2005).

1.1.1 Coopération entre immunité innée et acquise.

Il y a coopération entre l'immunité innée et acquise ce qui en bout de ligne, augmente l'efficacité du SI lorsque les macrophages ou les PMN rencontrent des microbes, ceux-ci sécrètent des molécules semblables à des hormones immunorégulatrices, des cytokines,

qui activent la réponse immunitaire acquise. À l'inverse, le SI acquis produit des signaux qui stimulent et augmentent l'efficacité des réponses naturelles (Kuby J 2000).

1.1.2 Cytokines

La communication intercellulaire du SI se fait via un réseau de cytokines et chimiokines, des glycoprotéines solubles de petit poids moléculaire. Elles peuvent être considérées comme les hormones du système immunitaire. Toutefois, contrairement aux hormones elles n'originent pas d'une glande mais de différents types cellulaires. De plus, des cytokines différentes peuvent produire le même effet (phénomène de redondance), alors que chaque hormone, a une fonction précise. Les cytokines agissent près du site de production de façon paracrine (d'une cellule à une autre cellule proche) ou autocrine (sur la cellule elle même) alors que les hormones agissent de façon endocrine (passe à travers la circulation avant d'atteindre la cible qui peut être très distante). Enfin, à l'opposé des hormones, le nombre important de cellules cibles et un large spectre d'action caractérisent les cytokines. Ce sont toutes des caractéristiques qui sont biologiquement importantes car elles sont un moyen d'assurer une bonne régulation des fonctions cellulaires. Si une cytokine vient à flancher, d'autres compensent. Elles sont impliquées dans plusieurs activités biologiques comme l'immunité innée et acquise, l'hématopoïèse, l'inflammation, la prolifération et différenciation cellulaire, l'angiogénèse, la survie cellulaire, etc. Pour ces raisons, il est possible d'évaluer la progression de processus cellulaires ou de maladies en évaluant les variations des concentrations de cytokines. En conséquence, il y a un vif intérêt clinique en ce qui concerne les cytokines. Dans certaines maladies, comme l'arthrite rhumatoïde par exemple, il est pertinent de se demander si c'est la cytokine qui cause la maladie ou la maladie qui favorise la production de cytokine (Abbas A. K. 2007; House R. 2007).

1.1.3 Chimiokines

La chimiotaxie est définie comme étant le déplacement des cellules vers un stimulus chimique. Il existe des médiateurs d'inflammation comme les leukotriènes, ou encore des

protéines du complément qui attirent divers leucocytes dans un site inflammatoire mais ils procèdent de façon non spécifique. En revanche, les chimiokines ont la capacité d'attirer des leucocytes de façon spécifique et pourraient être impliquées dans des processus aussi différents que la maturation cellulaire, l'angiogenèse et la croissance tumorale, etc. Tous les leucocytes expriment une variété de récepteurs aux chimiokines. Les neutrophiles et les éosinophiles par exemple sont très sensibles aux chimiokines, comme l'IL-8, un puissant facteur chimiotactique (Rottman 1999).

1.1.4 Cellules de l'immunité spécifique

Le lymphocyte, qui provient de la lignée lymphoïde, joue un rôle central dans l'immunité spécifique. Ces cellules représentent de 20 à 40% des leukocytes du sang chez l'humain. Il existe deux classes de lymphocytes : Les lymphocytes T et B. Ce sont ces cellules qui confèrent au SI la capacité de spécificité par l'entremise de leur récepteurs antigène-spécifiques (O'Gorman M. R. 2008).

1.1.4.1 Le lymphocyte B

La principale fonction des lymphocytes B est de produire des anticorps (ou immunoglobuline) spécifiques à des antigènes quelconques. Ce sont les acteurs de la réponse humorale. Les anticorps se situent à la surface du lymphocyte ou ils sont sécrétés. Il existe cinq classes d'immunoglobulines (ou isotypes): IgM, IgG, IgA, IgD et IgE ayant chacune des rôles spécifiques. Toutes les immunoglobulines (Ig) ont des caractéristiques de base communes mais il y a beaucoup plus de variabilité dans la région de l'anticorps (Ac) qui se lie à l'antigène (Ag). Un individu typique a potentiellement des millions d'Ac différents, chacun ayant des séquences d'acide aminé uniques sur leur site de liaison anticorps-antigène. En effet, un Ac est composé de deux sections distinctes : La section responsable de la fixation de l'Ag et une portion constante qui confère à l'Ac son rôle biologique. Les fonctions biologiques des Ig sont : 1) d'activer le complément (l'effecteur majeur de la branche humorale du SI qui permet entre autres la lyse des cellules

étrangères, l'opsonisation, l'activation des réponses inflammatoire et l'élimination des complexes immuns). 2) De participer à l'opsonisation d'un agent étranger (les opsonines permettent d'augmenter la phagocytose et l'efficacité de destruction des microorganismes). 3) Favoriser la cytotoxicité dépendante des anticorps ou ADCC (liaison d'Ac spécifiques à une cellule cible pour induire sa lyse cellulaire par les cellules NK, neutrophiles ou éosinophile) (Kuby J 2000; O'Gorman M. R. 2008).

1.1.4.2 Le lymphocyte T

Les lymphocytes T sont les médiateurs de l'immunité cellulaire. Leur site de maturation est le thymus, d'où leur nom. Alors que les lymphocytes B reconnaissent les pathogènes extracellulaires, les lymphocytes T eux, identifient et détruisent les cellules infectées par des pathogènes intracellulaires. Contrairement aux cellules B, les cellules T ne reconnaissent pas l'antigène libre ou soluble. Les récepteurs de cellules T (RcT) sont membranaires et ne reconnaissent les Ag que lorsqu'ils sont liés à une molécule du soi, le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Les cellules T se divisent en deux sous types, soit en cellules T $CD4^+$ (T « helper ») soit en cellules $CD8^+$. Les premières sont des cellules qui régulent la réponse cellulaire et humorale. Les deuxièmes sont cytotoxiques envers les cellules infectées avec des pathogènes intracellulaires. Il est important que les cellules T $CD8^+$ soient régulées et contrôlées par les T « helper » (T_H) car les cellules $CD8^+$ ont la capacité de tuer des cellules infectées du soi (Kuby J 2000; O'Gorman M. R. 2008).

1.1.5 Cellules NK

Il existe une autre population de leucocytes qu'on appelle lymphocytes « *Natural Killer »* à cause de leur morphologie, leur fonction et à cause de critères moléculaires. Cette cellule est généralement classée parmi les cellules de l'immunité innée plutôt que l'immunité spécifique mais elle fait partie un peu des deux types. Elle a des points en commun avec les cellules du système innée car elle n'as pas besoin de cellule T_H pour

être activée. Elle a aussi des points en commun avec les cellules du système acquis car elle a la capacité de différencier une cellule du soi qui doit être éliminée, d'une autre qui ne le doit pas. En effet, toutes les cellules du soi expriment le CMH de classe 1. Dans le cas des cellules tumorales ou infectées, le CMH1 est réprimé. La cellule NK reconnait cette situation et élimine ensuite la cellule(Kuby J 2000; Abbas A. K. 2007).

1.1.6 Cellules de l'immunité non-spécifique

Le système immunitaire inné est caractérisé par sa capacité à réagir rapidement face à un pathogène, un corps étranger, etc. Les divers types cellulaires qui font partie du SI inné sont souvent situés à divers points d'entrée potentiels des pathogènes. Parmi ces cellules, qui proviennent surtout de la lignée myéloïde, il y a les cellules dendritiques, les macrophages et les granulocytes (O'Gorman M. R. 2008).

1.1.6.1 Cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (CD) jouent un rôle important dans l'immunité innée et dans l'interaction entre l'immunité spécifique et non-spécifique car la majorité des cellules dendritiques apprêtent les Ag et le présentent aux cellules T_H. Elles sont munies de longues projections qui ressemblent à des dendrites de cellules nerveuses, d'où leur nom. Elles ont la capacité de phagocytose et de sécrétion de cytokines. Elles sont présentes dans la plupart des organes, tissus lymphoïdes et l'épithélium des muqueuses (Kuby J 2000; Abbas A. K. 2007).

1.1.6.2 Les macrophages

Les macrophages sont des cellules qui se retrouvent sous la forme de monocytes dans la circulation sanguine et lorsqu'ils atteignent les tissus ils deviennent des macrophages suite à une maturation. Une fois dans les tissus, ils s'activent et sont capables, par

phagocytose, de digérer des micro-organismes entiers ainsi que les débris cellulaires. C'est la fonction primaire des macrophages. Les macrophages ne répondent pas à une infection microbienne aussi vite que les PMN, mais ils ont une durée de vie bien plus élevée dans le site inflammatoire. Pour ces raisons, le macrophage est la cellule effectrice dominante dans les étapes tardives d'une réponse immunitaire innée (24 ou 48 heures après le début d'infection) (Kuby J 2000; Abbas A. K. 2007).

1.1.6.3 Les granulocytes

Les cellules granulocytaires comprennent les neutrophiles, basophiles et les éosinophiles. Ces trois types cellulaires partagent quelques caractéristiques. En premier lieu, ils ont des noyaux lobés. Celui du basophile est lobé, celui de l'éosinophile est bilobé et celui du neutrophile est polylobé. Les neutrophiles et les éosinophiles sont des phagocytes contrairement aux basophiles. Les PMN constituent de 50 à 75 % de tous les leucocytes chez l'humain, alors que les deux autres types de granulocytes ne dépassent pas 5%. Les éosinophiles et les neutrophiles sont des cellules mobiles qui peuvent migrer de la circulation sanguine vers les tissus. Le rôle phagocytaire des éosinophiles est moins important que celui des PMN. En revanche, les éosinophiles seraient spécialisés dans la défense contre les parasites. Enfin les basophiles ne sont pas phagocytaires. Ils médient leur action en libérant le contenu de leur granules jouant un rôle important dans certaines réponses allergiques dans le milieu (Kuby J 2000).

2: LE NEUTROPHILE ET L'INFLAMMATION

2.1 : L'inflammation et ses caractéristiques

L'inflammation peut se définir comme : Une réponse physiologique normale du corps d'un individu ou organisme à une « blessure, traumatisme ». Elle est caractérisée par des symptômes tels que la chaleur et la rougeur, à cause d'une augmentation de la circulation sanguine au niveau du site inflammatoire ainsi que par une vasodilatation des vaisseaux

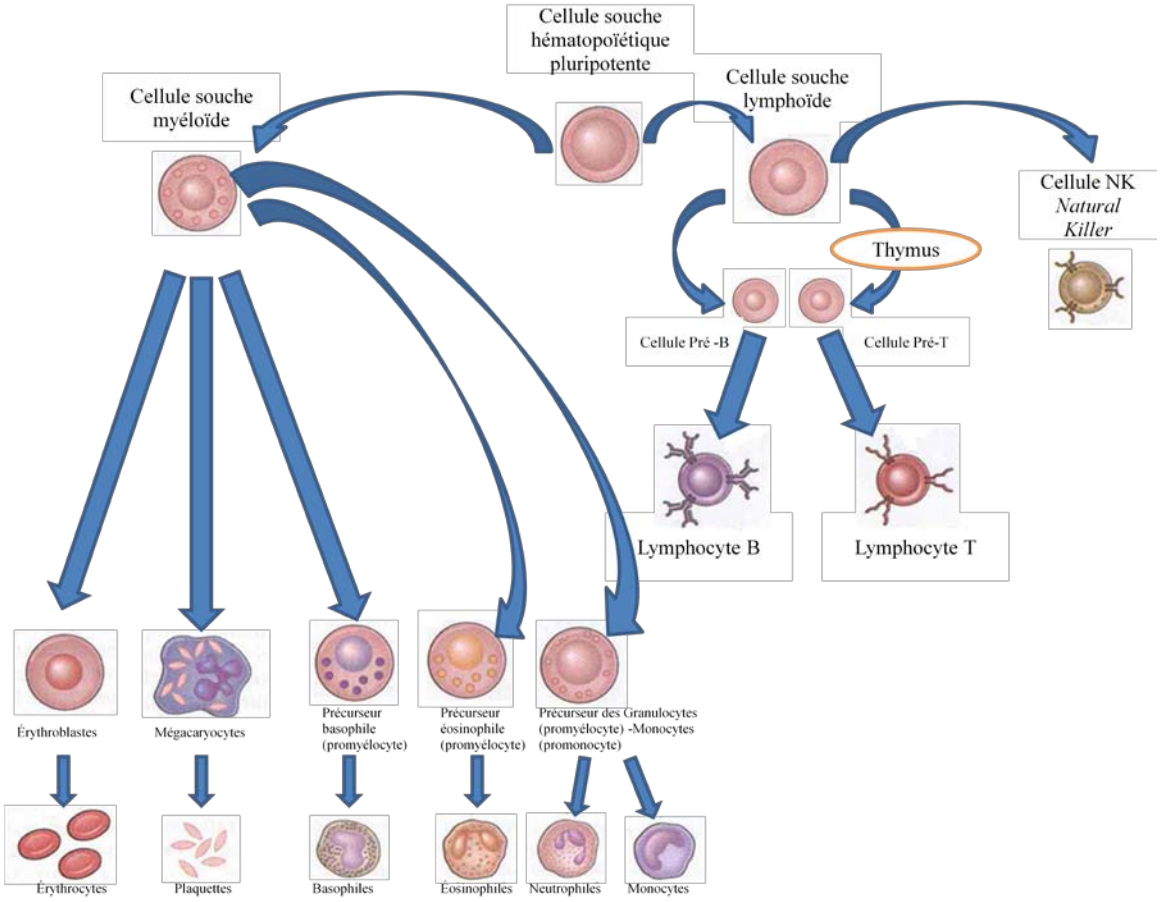
sanguins afin de diminuer la concentration des agents toxiques potentiels. Il y a également une augmentation de la perméabilité capillaire afin de faciliter le passage de molécules et médiateurs d'inflammation à travers l'endothélium. Éventuellement, on observe une migration des leucocytes (des PMN au début) vers le site inflammatoire afin d'éliminer les pathogènes et les débris. Parmi les autres symptômes lors d'une inflammation il y a bien sur, la douleur. Celle-ci est causée par l'œdème et la relâche d'agents algogéniques (id est : qui provoquent la douleur) et finalement perte de fonction causée par l'enflure et la douleur. Toutefois, en général, une inflammation a un début rapide et s'étend sur une courte période. Elle comprend trois phases distinctes : 1) L'initiation : Un agent initie la réponse inflammatoire, 2) L'amplification : Il y a recrutement de cellules et produits pro-inflammatoires, 3) La résolution : Il y a résolution lorsque les cellules et les débris sont éliminés par d'autres phagocytes comme les macrophages. C'est ainsi qu'une inflammation aigue typique se déroule. Dans le cas d'une inflammation chronique (une inflammation persistante), il y a aussi un influx de lymphocytes vers le site inflammatoire. La persistance de l'antigène peut mener à des conséquences pathologiques telles que des lésions tissulaires importantes (Kuby J 2000; Girard 2007).

2.2 Le neutrophile et ses caractéristiques

Les neutrophiles sont des cellules circulantes de 12 à 15 µm de diamètre et qui ont un noyau possédant de 3 à 5 lobes connectés. Leur concentration sanguine est d'environ 3 à 5 x 10^6 cellules/ml. Ils offrent une excellente protection contre les bactéries et champignons. Ce sont des cellules matures qui ne se divisent pas et qui se développent dans la moelle osseuse à partir de cellules souches hématopoïétiques CD34+. Au cours du processus de maturation, les différents types de granules qui leur confèrent la capacité de tuer des microorganismes se forment. Attirés dans le site inflammatoire, ils reconnaissent l'agent causal de l'inflammation, s'activent, éliminent l'agent étiologique et le processus de mort cellulaire programmée (apoptose) s'enclenche. Les neutrophiles apoptotiques sont ensuite ingérés soit par des macrophages et/ou des cellules dendritiques, ce qui facilite la résolution de l'inflammation (Mollinedo, Borregaard et al. 1999; Abbas A. K. 2007; O'Gorman M. R. 2008; Binet F. 2009) .

2.2.1 Le développement du neutrophile

L'hématopoïèse représentée sur la **figure 1,** est le processus par lequel les cellules du sang humain sont fabriquées. Les cellules souches hématopoïétiques (C.S.H) CD34+ sont pluripotentes, c'est-à-dire qu'elles ont la capacité de régénérer la totalité du SI chez un individu. Ce sont d'ailleurs ces cellules qui sont utilisées lors des transplantations effectuées dans le but de reconstituer le SI. C'est un phénomène qui survient dans la moelle osseuse. Les C.S.H. ont la capacité de se différencier suivant deux voies principales : Soit elles se différencient en progéniteur lymphoïde, soit en progéniteur myéloïde. En ce qui concerne les PMN, ils passent par le stade myéloblaste, promyélocyte, myélocyte, métamyélocyte, neutrophiles « band » et deviennent enfin des neutrophiles matures (Abbas A. K. 2007).



(Inspiré de Abbas, 2007)

Figure 1. L'hématopoïèse : Le développement des diverses cellules du sang suit différentes voies. Toutefois, toutes proviennent d'une cellule souche commune comme on peut voir sur cet arbre hématopoïétique.

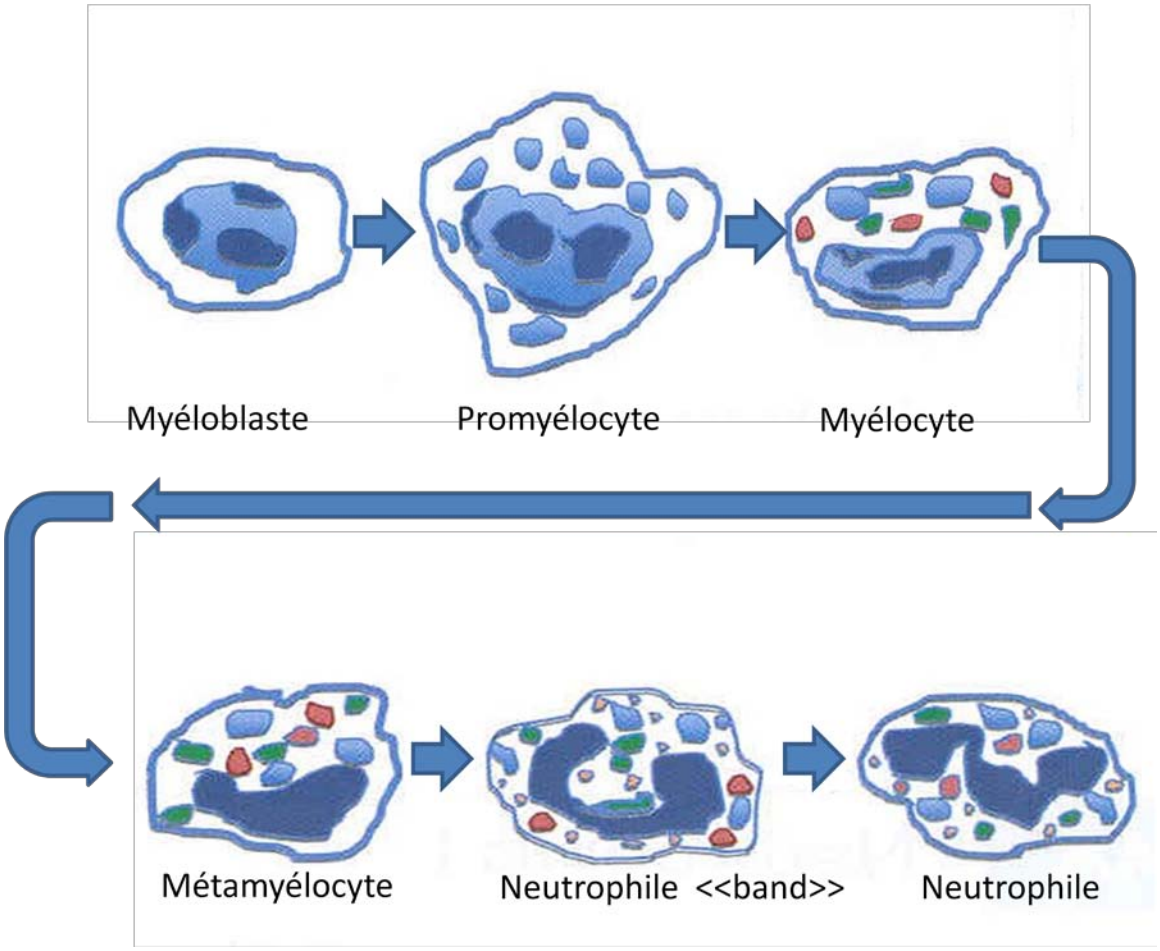
2.2.1.1 Les stades de développement du PMN

La régulation de l'hématopoïèse est contrôlée par les facteurs de stimulation des colonies comme le GM-CSF, G-CSF, M-CSF et quelques cytokines comme l'IL-2, l'Il-3, l'IL-6 l'IL-7 et l'IL-11. Des facteurs comme le G-CSF et le GM-CSF, sont utilisés pour traiter des pathologies comme la neutropénie car ils induisent le neutrophile à quitter la moelle

osseuse pour rejoindre la circulation sanguine. Le développement du neutrophile est un processus prenant environ 14 jours (Serhan C 2010).

La première phase de développement du neutrophile est le stade "myéloblaste" **(Voir figure 2)**. À cette étape, le futur PMN est très peu différencié et a un gros noyau rond ou oval et le cytoplasme occupe peu de place. Le myéloblaste n'a pas de granules.

Le myéloblaste devient ensuite promyélocyte. C'est une cellule plus grosse que le myéloblaste. Le noyau est encore rond ou oval. L'apparition des granules azurophiles ou primaires se fait à cette étape. Au stade myélocyte, les granules secondaires apparaissent. La production de granules primaires est limitée au stade myéloblaste. Ainsi, à chaque nouveau stade de développement, le ratio granule primaires/granules secondaires diminue. Enfin, le noyau garde la même forme mais est plus petit que celui des promyélocytes. La phase suivante, c'est le stade métamyélocyte. Ce qui différencie le plus cette étape des autres c'est l'aspect du noyau qui a la forme d'un rein. De plus ces cellules sont pleines de granules primaires, secondaires et tertiaires. Contrairement aux stades cellulaires précédents, les métamyélocytes n'ont pas la capacité de division cellulaire. Les neutrophiles "band" ont un noyau qui s'apparente beaucoup à celui du stade mature. Des constrictions commencent à apparaître à ce moment. Lorsqu'il y a au moins deux lobes connectés, et que le cytoplasme du neutrophile devient légèrement de teinte rosée à cause des granules spécifiques, on parle alors d'une cellule polymorphonucléaire (Nader D ; Serhan C 2010).



(Inspiré de Serhan, 2010)

Figure 2. Les stades de développement du PMN

2.2.2 Constituants et structure du neutrophile

En plus de leur noyau polylobé charactéristique, ces phagocytes sont connus pour les différents granules qu'ils contiennent dans leur cytoplasme. Il y a d'abord les granules azurophiliques ou primaires, qui ont une affinité pour le colorant azure A. Il y a également des granules secondaires (ou spécifiques) et tertiaires (ou gélatinase). Une

dernière catégorie de granules existe et apparait dans les étapes finales de la maturation du neutrophile : Ce sont les vésicules sécrétoires. Pour que les NTs puissent être fonctionnels, ils doivent également posséder des récepteurs de surface aux cytokines et aux chimioattractants présents dans la circulation, ainsi que des protéines d'adhésion leur permettant de se lier aux cellules endothéliales activées. Les récepteurs pour les différents stimuli inflammatoires sont présents de façon significative seulement à la surface des PMN matures. La plupart des facteurs de croissance *(Growth factors)* et les cytokines se lient à diverses classes de récepteurs de type Tyrosine Kinase, alors que les chimioattractants eux, se lient plutôt à des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) (Serhan C 2010).

2.3 Fonctions du neutrophile

2.3.1 Chimiotaxie et adhésion

Lors d'une infection, les PMNs quittent la moelle osseuse (où ils sont produits) et circulent ensuite dans le sang. Au niveau du site inflammatoire de nombreux médiateurs d'inflammation tels que la thrombine et l'histamine ou encore des cytokines (comme IL-1 et TNF-α) provoquent sur les cellules endothéliales la surexpression des intégrines et des sélectines. Quant à eux, les neutrophiles expriment des mucines (ex : PSGL-1) qui se lient aux sélectines. Ces liaisons permettent aux neutrophiles présents dans la circulation de rouler sur l'endothélium près du site inflammatoire. Des chemoattractants et des cytokines comme l'IL-8 activent le neutrophile, ce qui induit un changement conformationnel des molécules d'adhésion à la surface des PMN. Ceci leur permet d'adhérer plus fermement à l'endothélium et de transmigrer vers le tissu affecté, un phénomène appelé diapédèse. Une fois dans le tissu, les PMN activés se déplacent dans le sens du gradient des chémoattractants (produits par des corps étrangers, des cellules en nécrose ou encore par les cellules endothéliales), car ils expriment alors un grand nombre de récepteurs sensibles à ces molécules. Ils expriment également un plus haut taux de récepteurs aux Fc des anticorps et de récepteurs au complément facilitant ainsi la liaison

aux pathogènes opsonisés et leur phagocytose, une des fonctions les plus importantes des PMN.

Les PMN sécrètent aussi des cytokines et des chémoattractans comme la MIP-1α et la MIP-1β dans le but d'attirer des neutrophiles supplémentaires ainsi que d'autres types cellulaires comme les macrophages. Les macrophages libèrent à leur tour d'autres cytokines comme l'IL-1, l'Il-6 et le TNF-α qui induisent entre autres, la coagulation, une augmentation de la perméabilité et une augmentation de molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1 qui se fixent aux intégrines des lymphocytes et des monocytes. Les macrophages induisent aussi une augmentation de l'expression de la sélectine E, présente sur les cellules endothéliales, qui se lie aux molécules d'adhésion du neutrophile. En général, l'ordre de transmigration des leucocytes vers le site inflammatoire est le suivant : Les PMNs en premier lieu, suivis par les monocytes et par les lymphocytes. Évidemment, tout le processus d'adhésion leucocytaire dans la réponse inflammatoire est très important pour qu'il y ait un bon déroulement de la réponse inflammatoire (Kuby J 2000).

2.3.2 La phagocytose

La phagocytose est le processus par lequel certaines cellules du système immunitaire innée, incluant les neutrophiles (des phagocytes professionnels), engloutissent des particules de diamètre > 0,5µm. Les phagocytes reconnaissent les particules à phagocyter à l'aide de récepteurs de surface. Cela entraîne une polymérisation des filaments d'actine et une invagination de la membrane cellulaire. La particule est ensuite entourée par des extensions de la membrane plasmique du phagocyte, des pseudopodes, ce qui résulte en la formation d'un phagosome qui contient la particule ingérée. Des organelles comme les granules et les lysosomes fusionnent avec la membrane du phagosome et libèrent leur contenu microbicide. Ce processus est énergie dépendant et nécessite un important réarrangement du cytosquelette. La phagocytose et les mécanismes de destruction d'une particule étrangère (prochain chapitre) sont représentés à la **figure 3** (Abbas A. K. 2007; DeFranco L. 2007; O'Gorman M. R. 2008).

Les récepteurs de phagocytose, c'est-à-dire les récepteurs qui induisent directement l'internalisation des particules étrangères liées, se subdivisent en deux catégories : Ceux qui se lient directement à la particule étrangère et ceux qui se lient à la particule opsonisée. Ainsi, l'opsonisation augmente substantiellement l'efficacité de la phagocytose (DeFranco L. 2007).

2.3.3 Destruction des corps étrangers.

Le rôle principal des PMN est d'éliminer différents types de microorganismes ou de corps étrangers néfastes au niveau de la circulation sanguine ainsi que dans les tissus à l'aide de produits microbicides comme des oxydants, des peptides microbiens ou encore des enzymes lytiques. Ils y ont recours soit par des mécanismes dépendants de l'oxygène soit par des mécanismes indépendants de l'oxygène. L'ensemble des mécanismes d'élimination d'un corps étranger sont résumés dans les deux prochaines sections et représentés à la **figure 3.**

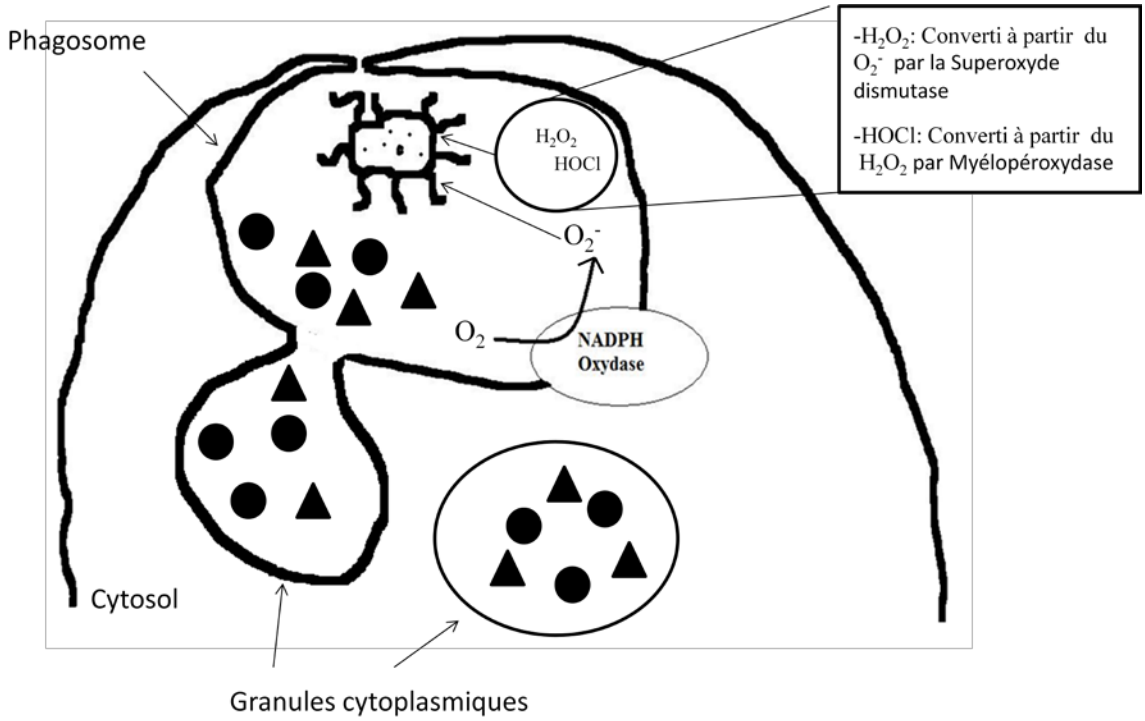


Figure 3. Élimination d'un microorganisme par les voies indépendantes et dépendantes de l'oxygène : Les divers types de granules cytoplasmiques sont schématisés par les triangles et les formes circulaires, concentrés à l'intérieur des vésicules sécrétoires.

2.3.3.1 Élimination dépendante de l'oxygène

Le premier mécanisme se réfère à la flambée oxydative qui se défini comme l'augmentation du métabolisme oxydatif des neutrophiles suivant l'ingestion du corps étranger, qui mène à la production d'espèces réactives oxydées (ROS pour *reactive oxygen species*) tel que l'anion superoxide (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'acide hypochloreux (HOCL). La génération des ces microbicides résulte en grande partie de l'activation de l'enzyme multiprotéique NADPH (*nicotin amine adenine dinucleotide phosphate*) oxydase qui transfert des électrons du NADPH au O_2, ce qui résulte en la formation du bactéricide qu'est l'anion superoxide O_2^-. Cette enzyme, qui est présente chez les phagocytes et découverte récemment chez une variété de cellules non-phagocytaires, est inactive dans les cellules au repos. Lorsqu'activée, le complexe protéique NADPH oxydase passe du cytosol au phagosome où le corps étranger se trouve et où le neutrophile y relâche également d'autres produits microbicides. Des mutations au niveau de la NADPH oxydase peuvent mener à une immunodéficience sévère nommée la maladie des granulomes qui est caractérisée par une baisse de l'efficacité avec laquelle les phagocytes éliminent les corps étrangers après les avoir phagocyté (Quinn and Gauss 2004; Girard 2007).

Une deuxième enzyme, la superoxide dismutase (Oberdorster, Ferin et al.) converti le superoxide O_2^- en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui peut ensuite être converti par la myéloperoxydase (MPO) en acide hypochlorique (HOCl) qui a, tout comme le H_2O_2, une activité bactéricide importante.

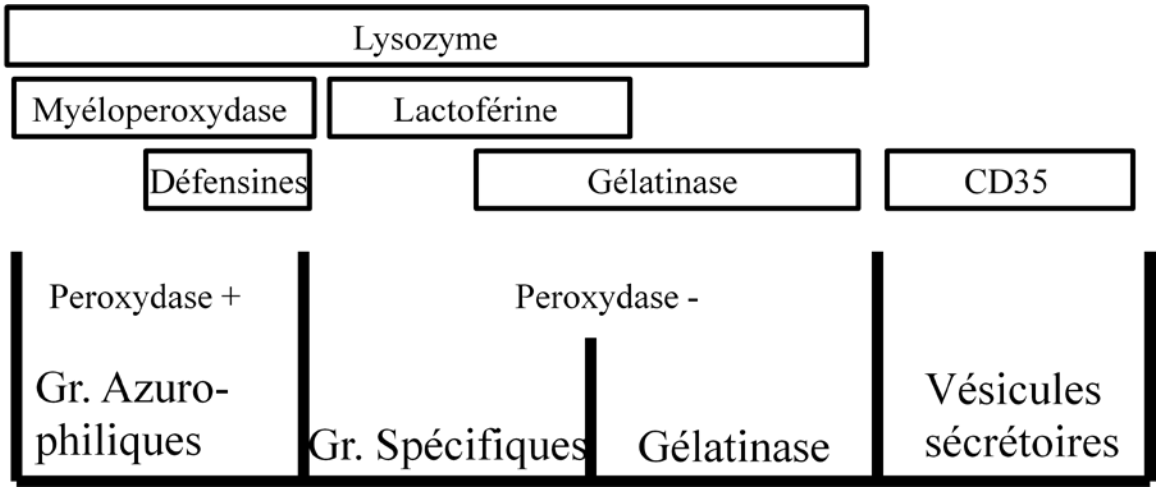
2.3.3.2 Élimination indépendante de l'oxygène

L'élimination indépendante de l'oxygène est en fait une des fonctions du PMN, la dégranulation. Cette dégradation de corps étranger nécessite aussi la fusion des granules avec le phagosome. Les granules primaires spécifiques et les granules de gélatinase contiennent des enzymes protéolytiques comme les lysozymes et les métalloprotéinases. La fonction de dégranulation sera décrite dans la prochaine sous section.

2.3.3.2.1 Dégranulation

Le nom du neutrophile est lié à ses granules, car ceux-ci peuvent être marqués avec des solutions neutres (ni acides, ni basiques). Ils sont concentrés à l'intérieur d'organelles, des granules et des vésicules sécrétoires, qui ont pour fonction de libérer leur contenu aux propriétés protéolytiques et bactéricides à l'extérieur de la cellule ou au niveau de la vacuole formée après la phagocytose du corps étranger. Les compartiments servent également d'importants réservoirs de protéines membranaires. En ce sens, les granules et les vésicules sécrétoires jouent un rôle critique au niveau de l'habilitée du neutrophile à interagir avec son environnement.

En ce qui concerne la classification des granules **(figure 4)**, il y a d'abord les granules peroxydase-positifs (les granules azurophiliques) qui contiennent la MPO**.** Ces granules peuvent être ensuite subdivisés en fonction de leur contenu en défensines (des peptides antimicrobiens de nature cationique). Les granules peroxydase négatif sont eux-mêmes subdivisés en granules secondaires, qui contiennent beaucoup de lactoférrine, et de gélatinase. Enfin, il y a les vésicules sécrétoires dont les membranes ont une grande importance grâce à de tous les récepteurs de surface qui s'y trouvent comme le récepteur du complément CR1 ou CD35. (Borregaard and Cowland 1997; Girard 2007; Serhan C 2010)



D'après Borregaard et Cowland, 1997

Figure 4: Classification des granules chez le neutrophile

2.3.3.3 Les NET

En plus des mécanismes oxygène dépendant et indépendant, les PMN possèdent un autre outil dans leur arsenal pour capturer et tuer les corps étrangers, soit les *neutrophil extracellular traps*, ou NET. Les NET ce sont des filaments de chromatine avec un diamètre d'environ 15 nm, auxquels sont adsorbés des peptides antimicrobiens. Ces filaments se produisent lorsque la membrane nucléaire ainsi que celle des granules se désintègrent et s'enlacent entre eux, ce qui crée une matrice capable d'emprisonner les corps étrangers et de les éliminer à cause de la grande quantité de molécules antimicrobiennes. Ce phénomène est actuellement considéré comme étant possiblement un mécanisme alternatif de mort cellulaire, qui n'est ni apoptotique, ni nécrotique et qui n'est pas dépendant de l'activation des caspases (Serhan C 2010).

2.3.4 La synthèse protéique

Le PMN n'est pas particulièrement reconnu pour sa capacité à synthétiser des molécules biologiques, car après tout il est dépourvu de ribosomes, sa demie-vie est très courte, et il

est incapable de se diviser. Toutefois, celui-ci est bel et bien capable d'intensifier la réponse inflammatoire en produisant de façon limitée des médiateurs d'inflammation tels que des cytokines et chimiokines ainsi que des récepteurs de surface nécessaires à la fixation des ligands, à la communication intercellulaire et à la fixation du PMN aux autres cellules. Les PMN produisent environ dix fois moins cytokines/chimiokines que les macrophages par exemple. Toutefois, il y a entre cinq à dix fois plus de neutrophiles dans la circulation que de macrophages et ce nombre est encore plus élevé aux sites inflammatoires. De plus, les neutrophiles arrivent aux sites inflammatoires bien avant les macrophages. Pour ces raisons, les PMN représentent une source de cytokines et chimiokines importante contribuant à l'orchestration de la réponse inflammatoire (Serhan C 2010).

2.3.4.1 Cytokines et chimiokines

Plusieurs agents peuvent induire la production de cytokines par les neutrophiles. Il y a entre autres des cytokines et des facteurs de croissance (ex : TGF-β, GM-CSF, l'IL-10, l'IL-4, etc), des chémoattractants comme le produit de décomposition bactérienne Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine (fMLP), des dérivés bactériens comme le Lypopolysaccharide (LPS), des champignons, des virus, des protozoaires et plus récemment découverts, les nanoparticules (Cassatella 1995; Gonçalves, Chiasson et al. 2010).

Parmi les cytokines et chimiokines sécrétées par les neutrophiles les plus abondantes, notons :

-MIP-1α : Favorise le recrutement de neutrophiles.

-Le TGF-β : Un facteur de croissance qui augmente la survie, le recrutement et l'activation du neutrophile et qui augmente la flambée oxydative et la phagocytose du PMN.

-L'Il-1α/β : Une cytokine qui coordonne la réponse inflammatoire, qui est chimio-attractante pour le neutrophile et qui augmente les protéines d'adhésion sur les cellules

endotheliales pour faciliter la transmigration des leucocytes vers les sites inflammatoires (extravasation).

-TNF-α : Le *Tumor necrosis factor* α est sécrété par les macrophages et peut l'être aussi par le neutrophile lorsque stimulé. Parmi ses rôles, cette cytokine est capable de promouvoir la survie cellulaire, d'agir comme un puissant facteur chimiotactique et d'induire la sécrétion de cytokines par les macrophages et les cellules endothéliales pour augmenter l'adhésion des neutrophiles entre autres.

-L'Il-6 : Cette cytokine joue un rôle très important lors de l'inflammation aigue. Le neutrophile en produit très peu comparé aux monocytes. L'Il-6 a des caractéristiques pro- et anti-inflammatoires. Cette cytokine augmente la phagocytose du neutrophile ainsi que l'apoptose à fortes concentrations. L'Il-6 a donc aussi un rôle de cytokine protectrice car la mort cellulaire par apoptose empêche la libération du contenu toxique par le PMN. L'Il-6 augmente aussi l'expression du récepteur de l'Il-1α.

-GM-CSF (Granulocyte Macrophage colony-stimulating factor), et le G-CSF (Granulocyte colony-stimulating factor): Le GM-CSF et le G-CSF jouent un rôle important dans l'hématopoïèse. Ils augmentent entre autres, la survie, la prolifération et la différentiation du neutrophile aux stades précoces et lorsqu'il devient mature.

Les PMN sécrètent aussi des médiateurs anti-inflammatoires. Ainsi, des molécules comme le *transforming growth factor* (TGF-β) ont un double rôle : C'est un important chimioattractant des PMN mais c'est aussi une molécule anti-inflammatoire importante car elle est présente en quantité importante lors de la résolution, la dernière phase de l'inflammation (Fabian, Kletter et al. 1992; Cook 1996; Lagraoui and Gagnon 1997; Kuby J 2000; Huynh, Fadok et al. 2002; Kaplanski, Marin et al. 2003; Feldmann and Maini 2008; Serhan C 2010).

2.3.5 L'élimination des neutrophiles

Tel que mentionné plus tôt, une quantité importante de PMN est produite par la moelle osseuse à chaque jour chez un adulte en santé. Ils représentent de 50 à 75 % de tous les

globules blancs chez l'humain. Pour qu'il y ait homéostasie, c'est-à-dire un nombre constant de PMNs dans la circulation sanguine, il existe un mécanisme de mort cellulaire programmée chez le neutrophile, qui est aussi une de ses fonctions les plus importantes, l'apoptose.

2.3.5.1. Apoptose

En général, la mort cellulaire peut survenir de deux façons : Soit par nécrose, soit par apoptose. Lorsqu'il y a mort cellulaire par nécrose, il y a généralement une libération du contenu cytoplasmique de la cellule dans le milieu, ce qui dans le cas du neutrophile n'est pas souhaitable car comme mentionné dans la section 2.3.3, le PMN possède une vaste quantité d'enzymes protéolytiques et des espèces oxydées très réactives, qui peuvent causer des dommages importants au niveau du tissu du site inflammatoire. À l'inverse, l'apoptose est un processus physiologique rigoureusement contrôlé ou programmé. La perturbation de l'apoptose des PMN, soit à la hausse soit à la baisse, est un problème dans les deux cas. Dans le premier cas, cela peut mener à une immunosuppression à cause du nombre réduit de PMN pour combattre les infections. Dans le second, l'accumulation des PMN, à cause d'une inhibtion de l'apoptose peut mener à une inflammation auto-immune. Une accumulation de cytokines telles que le GM-CSF et le G-CSF sont souvent observées dans ces cas. Ceci concorde avec le principe de résolution de l'inflammation, étape à laquelle il y a accélération de l'apoptose des PMN et également, une diminution des concentrations de cytokines pro-inflammatoires et de facteurs de survie (Simon 2003; Luo and Loison 2008; Serhan C 2010).

Lorsque les PMN se dirigent en apoptose, on observe plusieurs changements morphologiques telles qu'une réduction du diamètre de la cellule, l'apparition de vacuoles, une perte du noyau polylobé caractéristique (il y a condensation nucléaire), et au test de l'exclusion au bleu de trypan les PMN ne sont pas colorés contrairement aux cellules nécrotiques. Il y a aussi extériorisation des phosphatydilserines (PS) de l'intérieur vers l'extérieur de la membrane plasmique (permettent la reconnaissance des cellules apoptotiques par les macrophages). Les PS servent de marqueur des cellules apoptotiques

et peuvent être détectés à l'aide d'anticorps dirigés contre l'annexine V, qui ont une grande affinité envers les PS. La finalité de l'apoptose se traduit par la fragmentation de l'ADN et une régulation à la baisse des récepteurs de surface ainsi que des molécules d'adhésion. Parmi les récepteurs de surface dont l'expression est diminuée il y a ceux impliqués dans la phagocytose des particules opsonisées tels que le CD16 ou FcγRIII, le CD32 ou FcγRII (CD16 et CD32 reconnaissent la région FC des IgG), et le CD35 ou CR1 (reconnait des composantes du complément). L'expression des récepteurs pour des facteurs solubles chimioattractants comme le fragment protéique du complément C5a, est également réduite. L'expression de récepteurs jouant un rôle dans l'adhésion comme le ICAM-3 (CD50) est aussi diminuée (Homburg, de Haas et al. 1995; Hart, Ross et al. 2000).

L'apoptose du PMN peut être déclenché selon deux voies distinctes appelées voies extrinsèques et intrinsèques. Leur nom vient du fait qu'elles sont activées soit par facteurs externes ou internes aux PMN. Ces deux voies diffèrent au niveau des événements initiateurs déclenchant l'apoptose. Toutefois, les deux voies convergent pour activer une famille d'enzymes protéolytiques appelées caspases qui sont auto-activables par dimérisation. Les deux voies apoptotiques activent d'abord une procaspase (pro-caspase = forme inactive) initiatrice qui clive et active à son tour d'autres caspases effectrices en aval. Chez les PMN, seulement les caspases 1, 3, 4 et 7 à 10 existent. La caspase 2 est très peu exprimée (Santos-Beneit and Mollinedo 2000; DeFranco L. 2007).

2.3.5.1.1 Voie extrinsèque

La mort cellulaire programée des PMN peut être accélérée par plusieurs stimuli. Les PMN expriment de façon constitutive les récepteurs de mort de surface Fas qui doivent se lier à FasL (Fas Ligand) ou encore à des anticorps IgM anti-Fas pour qu'ils puissent accélérer l'apoptose. L'activation de Fas mène au clivage et à l'activation de la caspase 8 (caspase initiatrice) qui elle active ensuite la caspase effectrice 3. Celle-ci active alors la cascade de protéases et de nombreux autres substrats impliqués dans l'apoptose. Il y a aussi augmentation de la perméabilité mitochondriale suite à l'activation du facteur Bid,

ce qui mène à la libération de cytochrome c. La disruption de la mitochondrie est essentielle à la mort cellulaire induite par Fas. Ce processus est contrôlé ensuite par les gènes de la famille Bcl-2 et par différentes caspases effectrices. Certains membres de la famille Bcl-2 inhibent l'apoptose (Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Bfl-1), alors que d'autres la stimulent (Bax, Bak, Bik, Bad, Bcl-x_s) (Santos-Beneit and Mollinedo 2000; Luo and Loison 2008).

2.3.5.1.2 Voie intrinsèque (ou mitochondriale)

Cette voie implique la libération de cytochrome c (cyt c) par les mitochondries du PMN. Le cyt est une protéine associée à la membrane interne de la mitochondrie et qui fait partie de la chaîne respiratoire. Elle a pour rôle le transfert d'électrons. Une fois le cyt c libéré, celui-ci active la procaspase 9 et comme pour la voie intrinsèque, la caspase 3 est alors activée. Celle-ci active à son tour la cascade de protéases et les autres substrats impliqués dans l'apoptose. Encore une fois, les protéines de la famille Bcl-2, ont une grande influence sur le processus apoptotique car elles régulent soit à la hausse soit à la baisse, la production de cytochrome c, l'activation de la procaspase 9. Par le fait même, les protéines de la famille Bcl-2 ont aussi un important pouvoir régulateur sur l'activation de la voie extrinsèque (Li, Nijhawan et al. 1997; Santos-Beneit and Mollinedo 2000; Simon 2003).

2.3.5.1.3 Apoptose induite en réponse au stress du réticulum endoplasmique

À cause de l'existence d'une grande quantité de protéines ayant une mauvaise conformation, de grandes quantités de protéines chaperonnes sont présentes dans le réticulum endoplasmique (RE) pour les replier correctement. Toutefois, dans certaines conditions cytotoxiques, il peut y avoir accumulation de protéines mal repliées dans le RE, ce qui cause le stress du réticulum endoplasmique *(ER stress)*. Ce phénomène peut mener au développement de la *Unfolded Protein Response* (UPR) dont l'objectif est de réduire le nombre de protéines mal repliées en diminuant la traduction protéique et en augmentant un bon repliement protéique, ainsi que les fonctions de sécrétion et

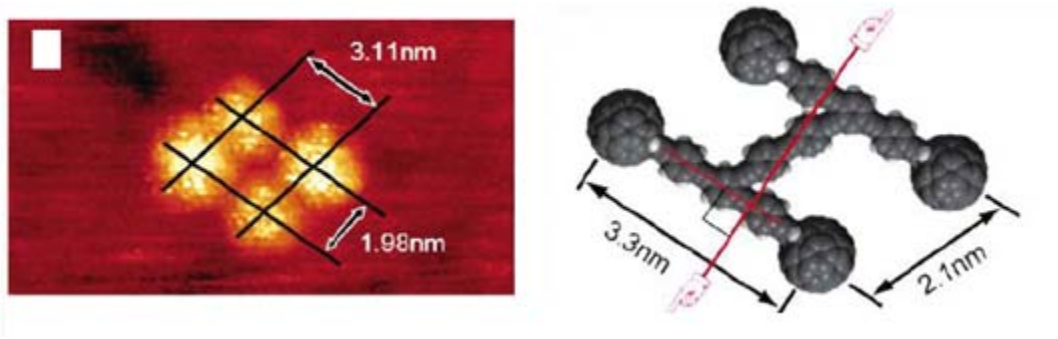
dégradation protéique. L'UPR est donc une stratégie de défense par la cellule. Par contre une réponse UPR prolongée peut induire l'apoptose via des mécanismes dépendants et indépendants de la mitochondrie. Toutefois les liens moléculaires causals entre le ER stress et ses effets sur la fonction apoptotique ne sont pas bien caractérisés (Binet, Chiasson et al. 2010).

3. LES NANOPARTICULES

La recherche sur les nanomatériaux (NM) et les nanoparticules (NP) profite à divers domaines tels que l'électronique, la biomédecine, la métallurgie, l'agriculture, le textile, les revêtements, les cosmétiques, l'énergie, les catalyseurs, etc. (Ostiguy 2004) Les NP ont le potentiel d'augmenter la qualité de la totalité des produits utilisés aujourd'hui. (The Royal Society and The Royal Academy of engineering 2004) Les NP sont des particules ayant au moins une dimension comprise entre 1 et 100 nm tel que défini par la *National Nanotechnology initiative* (NNI), aux États-Unis. Les NP peuvent être de forme sphérique, plates, ou encore avoir la forme d'un tube, tel qu'illustré à la figure 5. La matière à cette échelle est influencée par des lois de la physique de type classiques (Van des Waals, électrique, hydrogène, etc) et par des forces de type nucléaire. Cette matière se trouve pour ainsi dire dans une zone de transition car influencée par deux types de forces et grâce à ces forces, la nanomatière a des propriétés physiques (conductivité, réactivité, optiques) uniques. De plus, les ratios surface/volume sont particulièrement élevés chez les NP. À la nano-échelle, c'est les propriétés des atomes et des molécules à la surface des NP qui confèrent à cette dernière ses traits et caractéristiques. Pour ces deux raisons, la matière à l'échelle nanométrique présente des propriétés uniques et différentes de la même matière à plus grande échelle, d'où tout l'intérêt pour la nanomatière. (Ostiguy 2004; Ostiguy 2006; Webster 2009)

3.1 Applications des nanoparticules et présence dans l'environnement

Les propriétés uniques des NP étaient déjà utilisées par les Romains de l'ère préchrétienne. Ces derniers utilisaient des solutions d'or colloïdales, qui n'étaient ni plus ni moins que des solutions de NP d'or mélangées de façon homogène, pour colorer les verreries de différentes couleurs, le tout variant en fonction de la quantité d'eau ajoutée aux NP d'or. De nos jours, en médecine par exemple, l'intérêt des ingénieurs est de synthétiser des nanoparticules (ce qu'on appelle alors des nanomatériaux) aptes à être utilisées en imagerie, en ciblage thérapeutique, pour faciliter la radiothérapie et les diagnostiques, ou encore pour le traitement contre le cancer. En effet, des nano-systèmes anti-cancer sont présentement en développement. Ils pourront se lier exclusivement aux cellules cancéreuses, être détectés à l'aide d'un marqueur de surface ou détruire les cellules malignes tout en laissant le tissu sain intact (National Cancer Institute 2004). Il est donc important de réaliser qu'en médecine seulement, les applications potentielles sont nombreuses. Cela implique que nous serons exposés aux NP de plusieurs façons, pas seulement par inhalation mais aussi par ingestion, par absorption cutanée, par injection intra-veinale, sous cutanée ou encore intra musculaire (Oberdorster, Oberdorster et al. 2005; Ostiguy 2006; Bellucci 2009; Stephano 2009). Les NP sont aussi incorporées dans les recettes de produits de beauté et les crèmes solaires mais sont aussi utilisées en électronique et pour la fabrication de pneus, de batteries ou de filtres. Dans l'avenir, ils pourront même servir à transporter la matière à la nano-échelle, tel que démontré par Shirai et al. en 2005 **(figure 5)**, à l'aide d'une voiturette nanométrique formée d'un "chassis" de molécules organiques et de quatre roues ou sphères composées de 60 atomes de carbone (un fullerène) (Shirai, Osgood et al. 2005). Ainsi, les nanoparticules et les nanomatériaux se retrouveront de plus en plus dans notre environnement en quantité considérable car ces produits ont tous une durée de vie limitée et des fuites ou accidents peuvent avoir lieu lors du transport ou de la manipulation de ces matières.(Oberdorster, Oberdorster et al. 2005) Le **Tableau 1**, répertorie des produits dans lesquels des NP ou des nanomatériaux sont déjà intégrés (EPA-Nanotechnology-White-Paper 2007).



Tiré de Shirai et al.

Figure 5. Nanovoiture organique : Les 4 sphères (à gauche) servent de roues. Ce sont des NP de fullerènes. Observé par microscopie à effet tunnel.

Tableau I. Exemples de produits qui utilisent des nanoparticules et des nanomatériaux (adapté de : *Nanotechnology White Paper* de la l'agence de protection environnementale des États-Unis).

Santé et bien être	Informatique et électronique	Habitation	Alimentation	Autre
-Test de Grossesse -Pâte à dents -Bâton de golf -Raquettes de Tennis -Bas antibactériens -Pantalons antitaches -Cosmétiques -Filtres d'air -Crème solaire	-Écrans d'ordinateur haute définition -Composantes informatiques	-Peinture -Coussins antimicrobiens -Sofa/ matelas/ meubles/ antitaches	-Revêtements de casseroles et poêles non collants -Réfrigérateur résistants aux microbes -Huile de Canola	-Lubrifiants -Revêtements de surface

3.2 La nanotoxicologie

L'espoir que suscite la recherche sur les NP est très élevé étant donné leurs nombreuses applications potentielles. Toutefois, plus les NP seront utilisées dans diverses applications, plus les humains deviendront susceptibles d'y être exposés, ce qui peut dans certains cas être préjudiciable car les attributs qui rendent les NP intéressantes, sont les mêmes qui posent de nouveaux risques envers la santé humaine. Ceci explique pourquoi la nanotoxicologie (qui est une sous-discipline de la nanotechnologie) est en pleine expansion (Quinn and Gauss 2004; Ostiguy 2006; Fischer and Chan 2007).

La nanotoxicologie est une discipline très complexe. La toxicité d'une NP variera en fonction de sa composition chimique, son état d'agglomération, son diamètre, sa forme et sa charge de surface. Les petites NP pénètreront plus profondément dans le corps, alors que des NP comme les fullerènes par exemple (des NP composées de 60 atomes de carbone liés entre eux pour former une sphère parfaite), qui ont un grand diamètre, ne pénètreront pas aussi facilement. L'analyse du risque que posent ces particules est un défi unique en son genre. Il y a beaucoup de points d'interrogation. On ne sait pas exactement quelles caractéristiques autres que la composition, le diamètre et la forme de la NP affectent la toxicité. On sait très peu de choses sur leur destinée et leur transport dans l'environnement. Les voies d'absorption potentielles chez l'humain sont multiples (inhalation, dermique, ingestion ou même par injection), sans parler de la capacité qu'ont certaines NP de faire de la translocation (Kandlikar, Ramachandran et al. 2007). Ainsi, même s'il y a contamination, il est difficile de prédire l'absorption, la distribution et l'élimination d'une NP, tous des facteurs permettant de juger l'importance d'une exposition, à la suite d'une contamination.

Les études en nanotoxicologie nécessitent une approche unique, toutefois plusieurs critères d'études peuvent s'inspirer d'une science bien établie, qui est la toxicologie des particules. Par exemple, parmi l'ensemble des études en toxicologie des particules une tendance ressort : Les petites particules, et qui en l'occurrence ont un ratio surface/volume élevé, ont tendance à générer des espèces réactives oxydées (ROS). Les petites NP possèdent un plus grand rapport activité biologique/unité de masse, ce qui peut être désirable dans certains cas (i.e., action anti-oxydante, passage à travers des barrières cellulaires pour le ciblage thérapeutique) ou négatif dans d'autres cas (i.e., stress oxydatif, et fonctions cellulaires affectées) (Oberdorster, Oberdorster et al. 2005). Il est connu depuis longtemps que des particules ultrafines comme le quartz, la silice et l'asbestos par exemple, sont capables d'induire après inhalation ou instillation, de l'inflammation pulmonaire, de la cytotoxicité et peuvent affecter d'autres organes après diffusion dans la circulation. Ces effets ont aussi été observés après instillation pulmonaire de NP de dioxide de titane (TiO_2) dans divers modèles animaux (Nel, Xia et al. 2006).

3.3 Les familes de nanoparticules

Il y a une grande variété de nanoparticules et nanomatériaux et leur nombre ne fera qu'augmenter dans l'avenir. Il y a plusieurs façons de regrouper les NP. Certaines de ces dernières, peuvent se retrouver dans plus de un groupe à la fois :

-Il y d'abord les NP dont la formule chimique comprend le carbone, comme les fullerènes ou encore les nanotubes de carbone qui ont une résistance 100 fois supérieure à l'acier.

-Les NP comprenant un groupement métallique, comme le dioxide de titane (TiO_2), l'oxide de zinc, les *quantum dots*, les NP d'or, etc.

-Il existe aussi le groupe des dendrimères : Des polymères aux nombreuses ramifications arborescentes et aux cavités intérieures vides. Pour cette raison, ce sont des NP idéales pour le ciblage thérapeutique.

-Les NP organiques et inorganiques (dont le TiO_2 fait également partie)

(Ostiguy 2006; EPA-Nanotechnology-White-Paper 2007).

3.4 Les nanoparticules de Dioxide de Titane (TiO_2)

3.4.1 Provenance

Le dioxide de titane est un produit non combustible, thermiquement stable et inodore qui existe naturellement sous forme de poudre et qui se retrouve sous différentes formes cristallines dans des minéraux tels que l'anatase, le rutile et la brookite (Chen, Dong et al. 2009).

3.4.2 Applications et voies d'absorption

Dans le groupe des NP métalliques, les NP de TiO_2 sont parmi les plus étudiées et l'abondance du TiO_2 dans les produits commerciaux est une des raisons qui explique ce phénomène. La production de TiO_2, aux États-Unis seulement, est estimée à environ 1.5 million de tonnes métriques par année. (National Institute for Occupational Safety and

Health 2005) Le TiO_2 est très utilisé, entre autres, dans la fabrication d'implants et prothèses chez l'humain. Toutefois, il a une résistance à l'abrasion très faible, ce qui a pour conséquence que des particules de taille micrométrique et nanométrique peuvent se retrouver dans la circulation et atteindre divers organes et tissus. (Allouni, Cimpan et al. 2009) Il est important de noter que les humains sont également exposés aux NP de TiO_2 à cause des nombreuses autres applications dans lesquelles elles sont utilisées, telles les crèmes solaires ou encore des agents nettoyants de surfaces. Ainsi, les NP de TiO_2 peuvent pénétrer à l'intérieur du corps humain par des voies d'absorption multiples, soit par le tractus respiratoire, le tractus gastro-intestinal, soit encore par le derme ou par injection (Jin, Zhu et al. 2008).

3.4.3 Distribution

Des études démontrent que des dépôts de NP de TiO_2 peuvent atteindre et se déposer dans divers organes et tissus après diverses formes d'exposition. Dans une étude, des dépots de NP de TiO_2 se sont formés dans des organes tels que le foie, la moelle épinière et les poumons après injection intra-péritonéale chez la souris (Chen, Dong et al. 2009). Lors d'une étude récente par exemple, il fut constaté que ces NP sont également capables de pénétrer l'épiderme de la souris et du porc et d'induire par la suite, des lésions dans divers organes, le foie étant un des organes le plus affecté (Wu, Liu et al. 2009). Une étude effectuée par le père de la nanotoxicologie, Dr. Günter Oberdörster, dans le but d'observer les différences entre les effets des particules fines et des particules ultrafines inhalées, illustre que les NP de TiO_2 de 20 nm et moins, diffusent mieux à travers les espaces intercellulaires (les interstices) que les particules de TiO_2 de plus grande taille (i.e., 250 nm). Cela expliquerait en partie leur capacité de translocation ainsi que leur bio-persistance (ou rétention) élevée. En fait, dans le cas des NP de TiO_2, de belles relations dose/réponse semblent être générées lorsque la dose est exprimée en tant qu'aire de surface des NP par masse ou par volume (Oberdorster, Ferin et al. 1994).

3.4.4 Effets sur le processus inflammatoire

La majorité des études portant sur l'effet des NP de TiO_2 sur le processus inflammatoire décrivent leurs effets au niveau de l'inflammation pulmonaire. Il s'agit de la principale voie d'entrée d'une NP à l'intérieur du corps humain puisque les NP sont souvent absorbées sous forme d'aérosol. Le TiO_2 est aussi connu comme étant capable de transmigrer à travers l'épithélium, il peut donc être absorbé par la peau et se retrouver dans la circulation sanguine affectant ainsi d'autres organes.

Tel que mentionné dans la section précédente, plus les NP de TiO_2 sont petites, plus elles ont accès à l'interstice entre les cellules et plus leur temps de rétention est élevé. Dans une autre étude d'Oberdorster effectuée chez le rat, celui-ci y suggère que les NP ultrafines de TiO_2 provoquent une plus grande inflammation (augmentation du nombre de PMN et macrophages) aigue pulmonaire que celle induite par les NP de TiO_2 avec un diamètre plus grand (Ferin, Oberdorster et al. 1992). Lors des travaux effectuées sur des rats par Baggs et al.(1997), il fut constaté que les lésions au niveau des poumons (fibrose) causées par une inflammation provoquée par les NP de TiO_2, ont régréssé suite à l'arrêt de l'inhalation de ces NP (cinq jours par semaine, 6 heures par jour pendant trois mois, d'une concentration de 23 mg/m^3) de TiO_2. Ces travaux suggèrent que la réponse inflammatoire à la suite d'une expostion aux NP de TiO_2 est réversible (Baggs, Ferin et al. 1997). Dans une autre étude d'inhalation réalisée récemment sur des souris, pendant 10 jours à raison de 4 heures par jour, il y a eu aussi augmentation de la concentration de macrophages alvéolaires tel que constaté à la suite de l'examen du fluide du lavage bronchoalvéolaire. Les NP de TiO_2 utilisées avaient un diamètre très petit variant entre 2 et 5nm et étaient concentrés $\approx$ à 9 mg/m^3. Toutefois, les quantités de lactate déshydrogénase (relargé par les cellules endommagés; marqueur d'inflammation) et de cytokines telles que Il-1β, INF-γ et l'Il-6 n'étaient pas significativement augmenté (Grassian, O'Shaughnessy P et al. 2007). Curieusement, peu d'études se sont intéressées à la production de cytokines lors de l'inflammation induite par le TiO_2. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à cette thématique.

3.4.4.1 Effets sur le neutrophile

Les effets directs des NP de TiO_2 sur les PMNs sont peu connus. Néanmoins il commence à y avoir un nombre important d'études effectuées sur les effets des NP de TiO_2 sur divers types cellulaires. Il semble s'en dégager la règle suivante : La toxicité des NP varie d'un type cellulaire à l'autre. Les NP provoquent des réponses cellule-spécifiques résultant en une toxicité variable (Sohaebuddin, Thevenot et al. 2010). Dans le cas des macrophages, fibroblastes et des cellules épithéliales bronchiolites de souris utilisés dans l'étude de Sohaebuddinet al. (2010), les différents types cellulaires ont tous produit différentes quantités de ROS lorsqu'exposées aux mêmes concentrations de TiO_2. Étonnement, les fibroblastes sont parmi les types cellulaires en ayant produit le plus. Ce qui est intriguant également, c'est que dans le cadre de cette étude, ils ont également vérifié l'effet du diamètre de leur nanotubes de carbone (également à l'étude) pour voir leur effet sur les différents types cellulaires utilisés. Seule la production de ROS par les cellules épithéliales et les macrophages a varié en fonction du diamètre des NP. Celle des fibroblastes n'a pas varié significativement. Ce sont des résultats qui confirment le caractère cellule-dépendant de l'effet toxique des NP. En ce qui concerne des effets directs des nanoparticules de TiO_2 sur le type cellulaire qui nous intéresse, les neutrophiles, nous avons été les premiers à révéler des résultats montrant clairement un lien de cause à effet entre l'altération des fonctions du neutrophile et son exposition aux NP de TiO_2.

DEUXIÈME SECTION :
LES ARTICLES SCIENTIFIQUES

Article # 1 : Activation of human neutrophils by titanium dioxide (TiO_2) nanoparticles

1.1 Résumé français de l'article #1

Activation des neutrophiles humains par des nanoparticules de dioxide de titane (TiO_2)

D.M. Gonçalves, S. Chiasson, D. Girard

Cet article décrit les effets *in vitro* des nanoparticules de dioxide de titane (TiO_2) sur les neutrophiles humains. Il n'y a pas de nécrose cellulaire après 24 heures de traitement avec le TiO_2 (0-100 µg/ml). En effet, les NP de TiO_2 provoquent des changements morphologiques chez le neutrophile de façon concentration dépendante, ce qui est un indice de leur potentiel activateur de neutrophiles. Pour déterminer les voies de signalisation participant à l'activation des neutrophiles nous avons évalué l'impact des NP de TiO_2 sur le patron de phosphorylation rapide et important des tyrosines ainsi que celle de deux enzymes clefs, la MAPK p38 (*Mitogen activated protein kinase*) et la ERK 1/2 (*signal-regulated kinases ½*). Nous avons également vérifié les effets des NP de TiO_2 sur deux fonctions du neutrophile nécessitant un plus grand temps d'exposition aux NP : L'apoptose et la production de cytokines. De façon intrigante, pour une concentration ≥20 µg/ml, le TiO_2 inhibe l'apoptose du neutrophile, après 24 heures de traitement de façon concentration dépendante. Les surnageant des neutrophiles stimulés au TiO_2 ont été récupérés après 24 heures et testés pour l'identification et la quantification de 36 médiateurs d'inflammation (cytokines, chimiokines), à l'aide d'un test de criblage d'anticorps ou *antibody array*. Le traitement au TiO_2 a induit l'augmentation de 13 médiateurs (36%), incluant l'IL-8, dont la concentration est celle ayant le plus augmentée (~16 x concentration des contrôles). L'augmentation de la production d'IL-8 a été confirmée par ELISA. Nous concluons que le TiO_2 est un important agoniste du neutrophile in vitro.

1.2 Article # 1

Toxicology in Vitro 24 (2010) 1002–1008

Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology in Vitro

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxinvit

Activation of human neutrophils by titanium dioxide (TiO_2) nanoparticles

D.M. Gonçalves, S. Chiasson, D. Girard *

Laboratoire de recherche en inflammation et physiologie des granulocytes, Université du Québec, INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, QC, Canada H7V 1B7

ARTICLE INFO

Article history:
Received 3 November 2009
Accepted 7 December 2009
Available online 21 December 2009

Keywords:
Human
Neutrophils
Nanoparticles
TiO_2
Cytokines
Signal transduction

ABSTRACT

This paper describes the *in vitro* effects of titanium dioxide (TiO_2) nanoparticles (NPs) upon human neutrophils. Kinetic experiments revealed no cell necrosis after 24 h of treatment with TiO_2 (0–100 μg/ml). In contrast, TiO_2-induced change in cellular morphology in a concentration-dependent manner in neutrophils over time, indicating its potential to activate these cells. To further support this, we demonstrated that TiO_2 markedly and rapidly induced tyrosine phosphorylation events, including phosphorylation of two key enzymes, p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and extracellular signal-regulated kinases-1/2 (Erk-1/2). We also determined the effects of TiO_2 on two neutrophil functions requiring a longer exposure period between NPs and cells: apoptosis and cytokine production. Interestingly, at concentrations $\geq$20 μg/ml, TiO_2 inhibited neutrophil apoptosis in a concentration-dependent manner after 24 h of treatment. Supernatants from TiO_2-induced neutrophils were harvested after 24 h and tested for the presence of 36 different analytes (cytokines, chemokines) using an antibody array assay. TiO_2 treatment increased production of 13 (36%) analytes, including IL-8, which exhibited the greatest increase (~16 × control cell levels). The increased production of IL-8 was confirmed by ELISA. We conclude that TiO_2 exerts important neutrophil agonistic properties *in vitro*.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The use of nanoparticles (NPs) in various fields, including biotechnology, has gained increasing attention in the past few years (Moghimi et al., 2005). For example, NPs have great potential as tools for drug delivery in medicine (Laroui et al., 2009). However, the rapid development of nanotechnology has resulted in a surge of interest in nanotoxicology, since exposure of humans to NPs resulting from industrial activity is unavoidable.

Titanium dioxide (TiO_2) is used extensively as an industrial nanomaterial. TiO_2 NPs are used in a variety of products including anti-fouling paints, coatings, ceramics, sunscreens, and also as additives in pharmaceuticals and food colorants (Jin et al., 2008; Vamanu et al., 2008). Titanium (pure or in alloys) is widely used in several types of implanted medical devices, including cardiovascular stents, joint replacements and dental implants (Brien et al., 1992; Buly et al., 1992; Arys et al., 1998). Several studies evaluating potential health risks of TiO_2 NPs to humans have received increasing attention (Puccetti and Leblanc, 2000; Radnai et al., 2000; Vamanu et al., 2008; Schanen et al., 2009). It appears that, TiO_2 NPs possess pro-inflammatory properties similar to those exhibited by other nanomaterials (Blackford et al., 1997; Park et al., 2009; Schanen et al., 2009). Analysis of the pertinent scientific literature indicates that the reported pro-inflammatory effects of TiO_2 NPs were observed *in vitro* tests conducted with pulmonary cells, or from *in vivo* studies in animals following lung instillation.

Polymorphonuclear neutrophils (PMNs) are primordial players in innate immunity and provide an effective defense against bacterial and fungal infections (Whyte et al., 1997; Akgul et al., 2001). They are terminally mature non-dividing phagocytic cells which develop in the bone marrow from $CD34^+$ stem cells. It has been estimated that ~5×10^{10} cells per day, in a normal adult, are released from the bone marrow, representing one of the fastest rates of cell turnover in the human body. Therefore, PMN cell turnover must be under strict control. Interestingly, PMNs are known to spontaneously undergo apoptosis, without apparent stimulation, explaining, in part, why the number of PMNs remains relatively stable in healthy individuals. In contrast, during inflammation, the number of PMNs markedly increases but, under normal circumstances, resolution of inflammation is largely achieved by elimination of apoptotic PMNs by professional phagocytes, including macrophages.

Curiously, despite the fact that neutrophils play a key role during inflammation, and that increased PMNs have been observed in TiO_2-induced lung inflammation *in vivo*, there is a lack of literature concerning the role of TiO_2 NPs on neutrophil cell physiology, particularly human PMNs. One study conducted more than 20 years ago reported that pure rutile or anatase TiO_2 preparations elicited only a weak chemiluminescent response, indicating that these NPs

* Corresponding author. Address: INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Laval, QC, Canada H7V 1B7. Tel.: +1 450 687 5010x8847; fax: +1 450 686 5309.
E-mail address: denis.girard@iaf.inrs.ca (D. Girard).

0887-2333/$ - see front matter © 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.tiv.2009.12.007

did not significantly increase reactive oxygen species production by these cells (Hedenborg, 1988).

In the present study, we investigated the potential agonistic effect of TiO_2 NPs on several human neutrophil responses/functions, some known to occur rapidly and others necessitating a prolonged exposure to NPs for measurement. We found that TiO_2-induced changes in cellular morphology and caused the rapid and vigorous tyrosine phosphorylation of several proteins, including p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and extracellular signal-regulated kinases-1/2 (Erk-1/2). TiO_2, also induced suppression of PMN apoptosis and increased the production of several cytokines/chemokines, including IL-8, the predominant chemokine produced by these cells.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals, agonists and antibodies

The chemicals agonist and antibodies used in this were Titanium dioxide (TiO_2) nanoparticles (anatase crystals) (Vivenano, Toronto, ONT); PD98059 and SB203580 inhibitors (Sigma–Aldrich, Saint-Louis, Missouri); anti-phosphospecific p38 ($pTpY^{180/182}$) and Erk-1/2 ($pTpY^{185/187}$) (BioSource, Camarillo, CA); antibodies against the non-phosphorylated form of p38 (sc-535) (Santa Cruz, Biotechnology, Santa Cruz, CA); polyclonal Erk-1/2 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY); anti-phosphotyrosine (Cell Signalling Technology, Inc., Danvers, MA); GM-CSF (PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ, USA); and arsenic trioxide (As_2O_3 or ATO) (Sigma–Aldrich, Saint-Louis, Missouri).

2.2. Neutrophil isolation

Neutrophils were isolated from venous blood of healthy volunteers by dextran sedimentation followed by centrifugation over Ficoll–Hypaque (Pharmacia Biotech Inc., Quebec, Canada), as previously described (Pelletier et al., 2004; Binet et al., 2008). Blood donations were obtained from informed and consenting individuals according to institutionally approved procedures. Cell viability was monitored by trypan blue exclusion and the purity (>98%) was verified by cytology from cytocentrifuged preparations colored by Diff-Quick staining (Fisher Scientific, Ottawa, Canada). Cell viability was systematically evaluated before and after each treatment and was always $\geqslant$99%.

2.3. Microscopic observations of neutrophils

These were performed essentially as previously reported (Girard et al., 1997). Cells (10×10^6 cells/ml) were incubated at 37 °C in 5% CO_2 in 96-well plates for up to 24 h in the presence of buffer or an increasing concentration of TiO_2 (0, 2 10, 20, 50 or 100 μg/ml). Morphological changes in cells were observed under light microscopy (200×), and photomicrographs were taken using a Nikon Eclipse TS100 camera.

2.4. Phosphorylation events

Neutrophils (40×10^6 cells/ml in RPMI 1640) were incubated for the indicated periods of time at 37 °C with buffer or the indicated agonist in a final volume of 120 μl. Reactions were stopped by adding 125 μl 2× Laemmli's sample buffer, as described previously (Pelletier et al., 2000). Aliquots corresponding to 1×10^6 cells were loaded onto 10% SDS–PAGE and transferred from gel to a nitrocellulose membrane (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) Non-specific sites were blocked with 1% BSA in TBS-Tween (25 mM Tris–HCl, pH 7.8, 190 mM NaCl, 0.15% Tween-20) for 1 h at room temperature. After washing, the membranes were incubated with monoclonal anti-phosphotyrosine UB 05-321 (1:4000; United Biomedical Inc. (UBI), Hauppauge, NY, USA) for 1 h at room temperature. Membranes were then washed and incubated with a HRP-conjugated goat anti-mouse IgG + IgM (1:10,000; Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA) for 1 h at room temperature in fresh blocking solution. Membranes were washed three times with TBS-Tween, and phosphorylated bands were revealed with the ECL Western blotting detection system (Amersham Pharmacia Biotech Inc.). Protein loading was verified by staining the membranes with Coomassie blue at the end of each experiment.

For MAPK activation, aliquots (corresponding to 1×10^6 cells) were prepared as above and transferred to nitrocellulose (p38) or polyvinylidene difluoride membranes (Erk-1/2). Membranes were blocked for 1 h at room temperature in Tris-buffered saline (TBS)-Tween containing 1% bovine serum albumin (BSA). After washing, an anti-phosphotyrosine antibody, the anti-phosphospecific p38 or Erk-1/2 antibody or the antibody directed against the corresponding unphosphorylated form were added at a final dilution of 1:1000 for phosphospecific antibody or 1:400 for the unphosphorylated form respectively, in TBS-Tween. The membranes were kept overnight at 4 °C and were then washed with TBS-Tween and incubated for 1 h at room temperature with a goat anti-rabbit horseradish peroxidase (HRP) secondary antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) at 1:20,000 in TBS-Tween + 5% BSA or a goat anti-mouse HRP secondary antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories) at 1:20,000 in TBS-Tween + 5% nonfat dry milk followed by several washes. Protein expression was revealed with the ECL system as described above.

2.5. Assessment of neutrophil apoptosis

Freshly isolated human PMNs (10×10^6 cells/ml in RPMI 1640-HEPES-P/S, supplemented with 10% heat-inactivated autologous serum) were treated with or without increasing concentrations of TiO_2 for 24 h. Cytocentrifuged samples of PMNs were prepared using a Cyto-tek® centrifuge (Miles Scientific, Naperville, IL), stained with the Hema 3 Stain staining kit according to the manufacturer's instructions and processed as documented previously (Pelletier et al., 2004; Binet et al., 2006). Cells were examined by light microscopy at 400× final magnification, and apoptotic neutrophils were defined as cells containing one or more characteristic, darkly stained pyknotic nuclei.

2.6. Proteome profiler™ array

The human cytokine array panel A was purchased from R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN) and all the steps for the simultaneous detection of 36 different analytes were performed within 2 weeks of harvesting cells, as per the manufacturer's recommendation. Previous experiments conducted with two membranes probed with the exudates from two different blood donors treated with LPS revealed that the results were reproducible (*data not shown*). Consequently, we pooled the supernatants ($n = 3$ experiments) harvested from HBSS-treated (control) or TiO_2-induced human neutrophils to probe the membranes. The chemiluminescent signal from the bound cytokines/chemokines present in the supernatants was detected on Kodak X OMAT-RA film. The signal intensity of each analyte (in duplicate) was normalized to the membrane's positive controls. Results are expressed as fold-increase (ratio of tested group/control). Ratios $\geqslant$1.2 were considered slightly positive and those $\geqslant$1.5 were considered strongly positive. Protein array membranes were scanned and densitometry analysis

was performed using the Multi-Analyst program (Bio-Rad, Hercules, CA).

2.7. IL-8 production

The measurement of IL-8 production was determined using a commercially available ELISA kit (Medicorp), essentially as previously described (Pelletier et al., 2004) Freshly isolated human neutrophils were incubated in the presence or absence of TiO_2 at 37 °C in 5% CO_2 for 20 h in a 24-well plate containing RPMI 1640 supplemented with 5% heat-inactivated fetal calf serum. Supernatants were harvested after centrifugation and stored at −70 °C before performing ELISA.

2.8. Statistical analysis

Statistical analyses were performed, using Student-*t*-test with SigmaStat for Windows (version 3.0). Statistical significance was established at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. IL-4 induced morphological changes in neutrophils

The induction of morphological changes in PMNs is a rapid and simple assay used as a reflection of neutrophil activation (Girard et al., 1997). PMNs were incubated with increasing concentrations of TiO_2 (0–100 μg/ml) and morphology was observed, overtime, under light microscopy. As shown in Fig. 1, untreated neutrophils remained spherical (panel A), whereas cells incubated with an increasing concentration of TiO_2 exhibited morphological changes. Results illustrated in Fig. 1 were obtained after 1 h of incubation. The differences in cell morphology were observed as early as 30 min, but were less evident (*data not shown*). Morphology of cells treated with concentrations ⩽20 μg/ml TiO_2 was similar to that of untreated cells. However, clear effects were observed at 50 μg/ml (panel C) and 100 μg/ml (panel D).

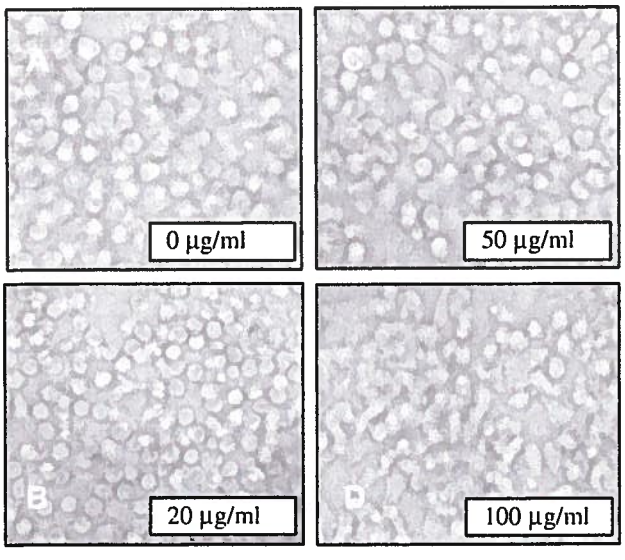


Fig. 1. TiO_2-induced morphological changes in PMNs in vitro. PMNs (10×10^6 cells/ml) were incubated in the presence or absence (A) of 20 (B), 50 (C) or 100 μg/ml TiO_2 at 37 °C in 5% CO_2 for up to 24 h in 96-well plates and morphological changes were observed by cytology, as described in Materials and Methods. Pictures were taken 60 min after treatment and the results are representative of three different experiments. Note the spherical shape of naïve untreated cells (A) that changes to an increasingly irregular shape observed in a concentration-dependent fashion in response to TiO_2.

3.2. TiO_2-induced phosphorylation events in human PMNs

The above results indicated that TiO_2 activated neutrophils. Because of this activation and the fact that phosphorylation events in response to TiO_2-induced human PMNs have never been investigated, we then treated freshly isolated cells with TiO_2 and tested its ability to induce general tyrosine phosphorylation events. As assessed by western blot, TiO_2-induced rapid tyrosine phosphorylation of different proteins as early as 15 s after TiO_2 exposure (Fig. 2). The maximal effect was observed after 60 s, followed by a decline in intensity of the tyrosine phosphorylation signal after a few minutes; however, the signal remained elevated for up to 30 min as compared to control cells (last vs. the first lane). The cytokine GM-CSF was used as a positive control (Pelletier et al., 2000).

3.3. TiO_2 activated p38 and Erk-1/2 MAPK in human PMNs

Next, we determined whether or not TiO_2 could specifically activate Erk-1/2 and/or p38 MAPKs, two key kinases involved in a variety of PMN functions (Krump et al., 1997; Mocsai et al., 2000). As illustrated in Fig. 3, TiO_2 activated both Erk-1/2 (upper panel) and p38 (lower panel) MAPKs, even at the lowest concentration of 0.002 μg/ml. Interestingly, Erk-1/2 phosphorylation was more intense after 5 min of treatment with TiO_2 when compared to p38. In contrast, p38 phosphorylation was more intense than Erk-1/2 after 15 min of treatment, suggesting that TiO_2 activates Erk-1/2 prior to p38 activation.

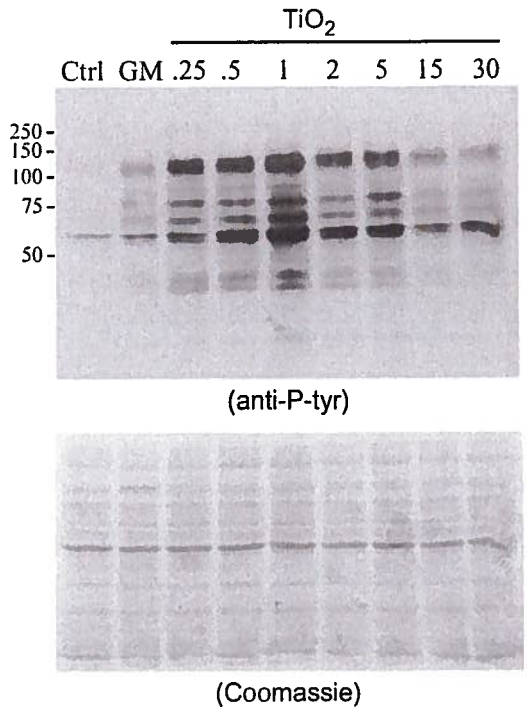


Fig. 2. TiO_2-induced phosphorylation events in human PMNs. Freshly isolated human PMNs (10×10^6 cells/ml) were incubated with buffer (Ctrl), 65 ng/ml GM-CSF (GM) for 1 min or 100 μg/ml TiO_2 0.25–30 min, and the expression of tyrosine-phosphorylated proteins (anti-P-tyr) was assessed by Western blot, as described in Section 2. Protein loading was verified by staining the membranes with Coomassie blue at the end of each experiment. Results are from one representative experiment out of four. Molecular weights are indicated on the left.

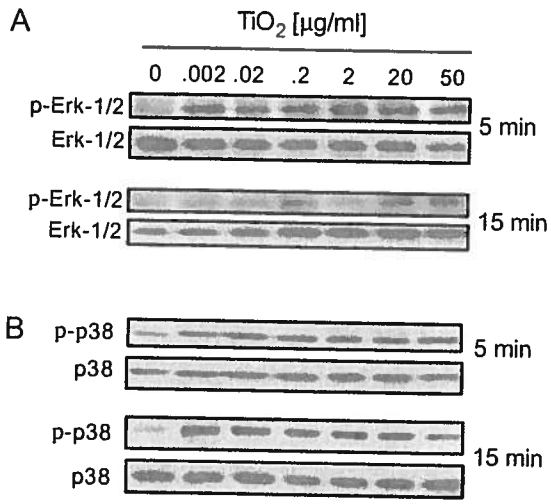


Fig. 3. TiO_2 activated both Erk-1/2 and p38 MAPKs in PMNs. Cells were treated with the indicated concentrations of TiO_2 for 5 or 15 min and phosphorylation of Erk-1/2 (A) or p38 (B) MAPK was assessed by immunoblotting, using specific antibodies as described in Section 2. Results are from one representative experiment out of three.

3.4. TiO_2 nanoparticles inhibited human PMN apoptosis

Fig. 4 illustrates that TiO_2 inhibited PMN apoptosis in a concentration-dependent manner. The neutrophil apoptotic rate was similar when cells were incubated with 0.002 (56.5 ± 10.7%, mean ± SEM, $n = 5$), 0.02 (57.9 ± 10.4%) or 2 µg/ml TiO_2 (55.5 ± 7.1%), as compared to SA (59.9 ± 9.7%). This basal apoptotic rate decreased when neutrophils were incubated with 20 µg/ml (30.5 ± 9.5%), but this decrease was not significant. In contrast, concentrations of 50 or 100 µg/ml TiO_2 significantly inhibited PMN apoptosis (20.4 ± 6.5% and 11.2 ± 5.7%, respectively).

3.5. TiO_2 induced the production of cytokines and chemokines in human PMNs: predominance of IL-8

As illustrated in Fig. 5, TiO_2 increased the production of several analytes in PMNs. Among 36 analytes, 13 (36%) displayed a ratio >1 (right of the dotted line in the figure); 12 (33%) with a ratio ⩾1.2; 7 (19%) with a ratio ⩾1.5; and 2 (5.5%) with a ratio ⩾2. These last two are the known potent chemokines GRO-α (ratio of 4.1) and IL-8, with the highest ratio of ~16.

3.6. Measurement of IL-8 production in TiO_2-induced human PMNs

As illustrated in Fig. 6, TiO_2 increased the production of IL-8 in a concentration-dependent manner. The basal level of IL-8 was 422.0 ± 104 pg/ml (mean ± SEM, $n = 3$) and this increased to 647.3 ± 217, 1129 ± 263, 1233 ± 44, and 1237 ± 133 pg/ml for cells treated with 2, 20, 50 or 100 µg/ml TiO_2, respectively.

4. Discussion

Different cellular responses and functions were investigated in order to clearly establish that TiO_2 is a human PMN agonist. We initially eliminated the possibility that TiO_2-induced cell necrosis in human PMNs. Our results agree with those of a previous study

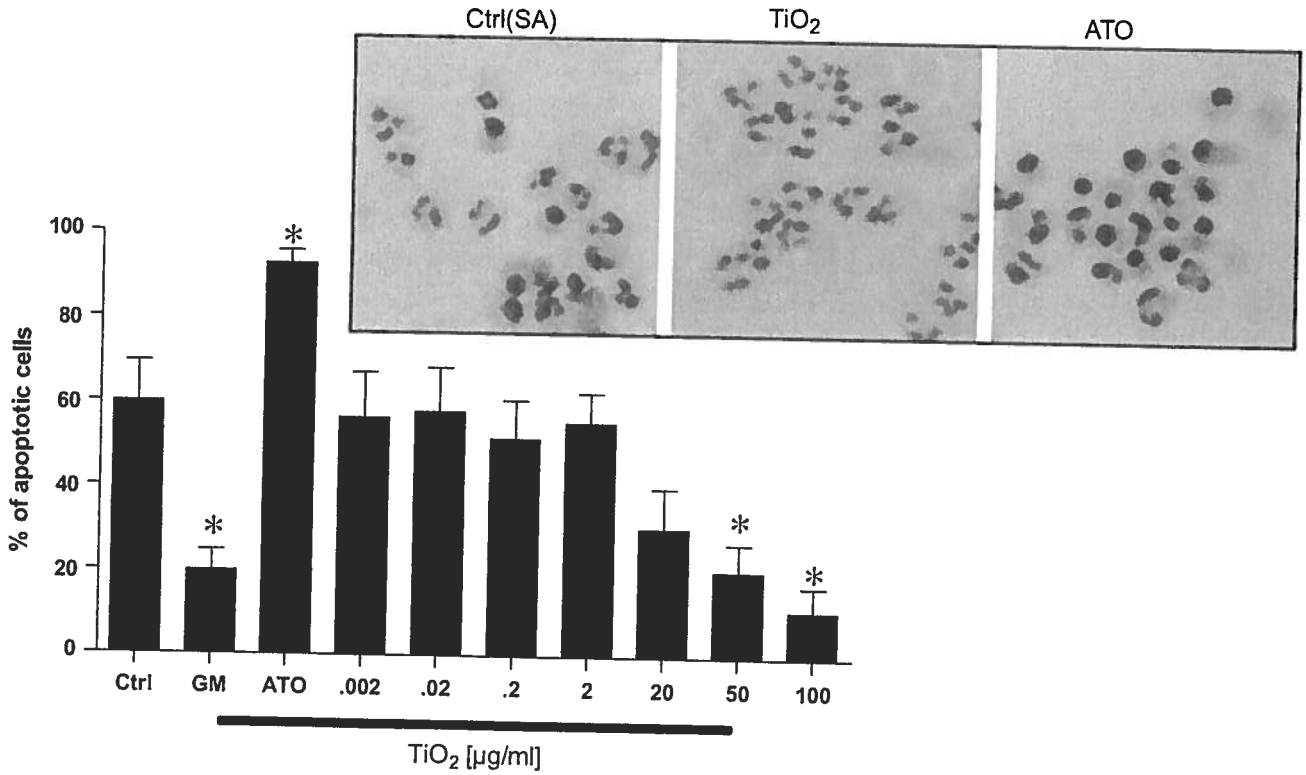


Fig. 4. High concentrations of TiO_2 inhibited human neutrophil apoptosis. PMNs (10×10^6 cells/ml) were incubated with buffer (Ctrl), 65 ng/ml GM-CSF, 5 µM arsenic trioxide (ATO) or the indicated concentrations of TiO_2 and apoptosis was assessed by cytology. Results are means ± SEM ($n \geqslant 3$). $^*P < 0.05$ vs. Ctrl. Inset, note the anti-apoptotic effect of TiO_2 at 100 µg/ml (middle panel) where almost all cells possess the characteristic poly-lobed nucleus, as opposed to the pyknotic nuclei observed after the treatment with the potent pro-apoptotic molecule ATO.

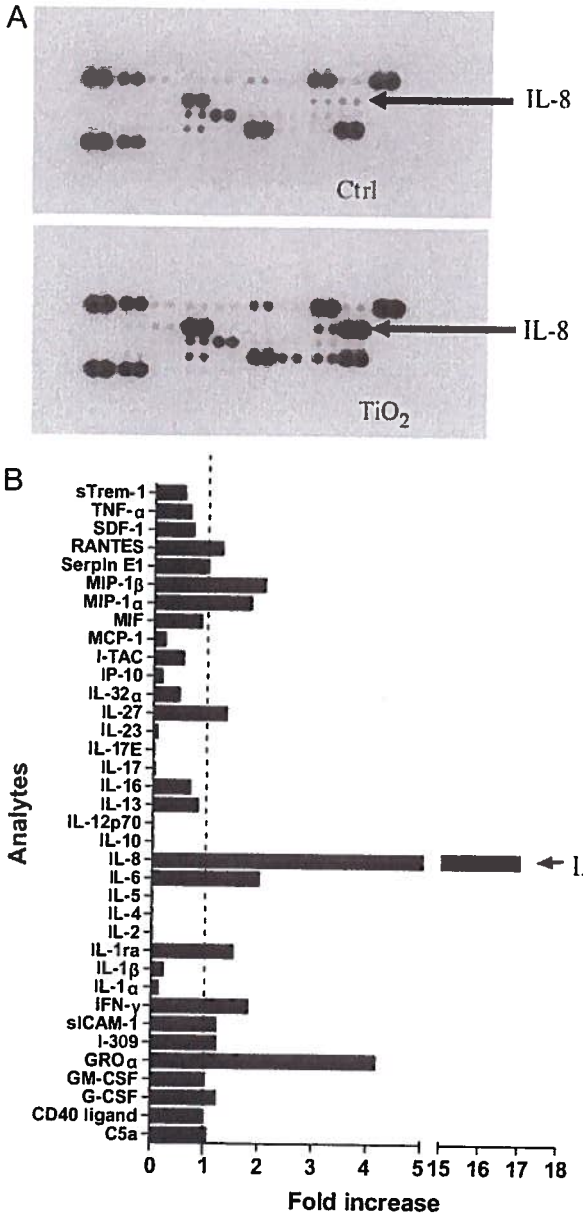


Fig. 5. Analysis of different analytes measured by an antibody array assay revealed that TiO_2 significantly increased the production of IL-8 in human PMNs. Cells (10×10^6 cells/ml) were incubated with buffer (Ctrl) or 100 μg/ml TiO_2 for 24 h and supernatants from three separate experiments were pooled. Production of 36 different analytes was detected by an antibody array assay as described in Section 2. (A) Membranes containing raw data that were analyzed to create the bar graph (B). Arrows indicate the two spots (duplicate) corresponding to IL-8.

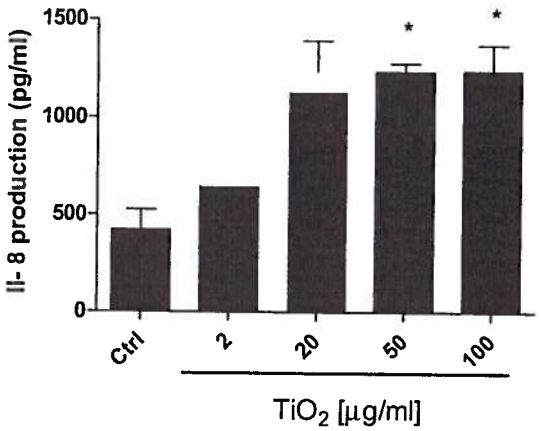


Fig. 6. Measurement of IL-8 production in TiO_2-induced human PMNs. Neutrophils (10×10^6 cells/ml) were incubated with buffer (Ctrl) or 2, 20, 50 or 100 μg/ml TiO_2 for 24 h and supernatants were harvested; the concentration of IL-8 was quantified by ELISA as described in Section 2. Results are means ± SEM ($n = 3$). $^*P < 0.05$ vs. Ctrl.

which reported that a concentration of 200 μg/ml TiO_2 did not affect cell viability of human PMNs, as assessed by lysozyme release and trypan blue exclusion (Hedenborg, 1988). Although the maximum concentration of TiO_2 used in our study is 100 μg/ml, rather than 200 μg/ml (Hedenborg, 1988), we verified PMN cell viability for a longer period of time (up to 24 h), whereas the Hedenborg study determined this for only 15 or 30 min. Therefore, these observations confirm that TiO_2 does not induce cell necrosis in human PMNs. It is important to mention that these cells appear more refractory to necrosis, as compared to other immune cells. For example, PMNs were shown to be more resistant than human peripheral blood mononuclear cells to mercury-induced cytotoxicity (Moisan et al., 2002). In fact, most compounds induced apoptosis instead of necrosis in human PMNs, probably because these cells possess unique apoptotic machinery and spontaneously undergo apoptosis.

In the present study, TiO_2 affected rapid responses in human PMNs based on changes in cell morphology and in phosphorylation events. Cell morphology changes are known to be associated with rearrangement of the cytoskeletal components (Bennett et al., 1993; Girard et al., 1997). Interestingly, the fact that TiO_2-induced rapid phosphorylation in PMNs (few seconds) indicates that TiO_2 NPs have great potential to induce a variety of different cell functions. This is particularly true for apoptosis, since both p38 and Erk-1/2 MAPKs are known to be involved in the regulation of PMN apoptosis under various experimental conditions (Klein et al., 2000; Akgul et al., 2001; Harter et al., 2002; Pelletier et al., 2002; Ward et al., 2005; Binet and Girard, 2008). The ability of TiO_2 to inhibit PMN apoptosis concurs with its non cytotoxic effects in human PMNs (Hedenborg, 1988). Of note, this is the first study to report the ability of TiO_2 to delay or suppress cell apoptosis. Interestingly, in contrast to most studies, we have used mature non-dividing primary cells. In previous studies conducted with cells other than PMNs, TiO_2-induced cell necrosis in mouse L929 fibroblasts (Osano et al., 2003; Jin et al., 2008) and apoptosis in rodent osteoblasts (Pioletti et al., 1999) and brain cells (Long et al., 2007). In humans, TiO_2-induced necrosis or apoptosis in U937 monoblastoid cells (Vamanu et al., 2008), apoptosis in a bronchial epithelial BEAS-2B cell line (Park et al., 2008), and in phytohemagglutinin-stimulated lymphocytes (Kang et al., 2009). The ability to delay apoptosis in PMNs suggests, however, that TiO_2 can also disturb normal homeostasis by prolonging the life-span of PMN, which from an inflammatory perspective, can be deleterious to the immediate environment by releasing toxic compounds. This may also explain the accumulation of PMNs observed in broncho-alveolar lavage fluids in TiO_2-induced pulmonary inflammation (Bermudez et al., 2004; Nemmar et al., 2008) or in lung tissue after intraperitoneal injection (Chen et al., 2009).

PMNs are among the first immune cells to arrive at the site of inflammation, where they initiate a rapid, nonspecific, phagocytic response and the release of soluble mediators (Smith, 1994; Serhan and Savill, 2005; Kennedy and DeLeo, 2009). Some of these mediators attract other PMNs, while others attract various leukocytes. In this study, we found that a prolonged exposure of human PMNs to TiO_2 NPs caused increased expression of important pro-inflammatory mediators, including the chemokines MIP-1α and MIP-1β

(or Macrophage Inflammatory Protein-1 alpha/beta). Although MIP-1α and MIP-1β are not chemotactic for PMNs *in vitro*, they elicit a rapid influx of neutrophils to the site of injection when administered *in vivo* (Alam et al., 1994). They are known to attract and activate macrophages, lymphocytes, NK cells, eosinophils and dendritic cells (Maurer and von Stebut, 2004). In addition, activation of PMNs by TiO_2 induced the production of IL-6, Gro-α and IL-8. Interleukin-6 (IL-6) is a pleiotropic cytokine known to be produced by many different cell types and plays a role in a wide range of responses (hematopoiesis, immune responses, acute-phase reactions, inflammation, etc.), while Gro-α and IL-8 are particularly recognized for their ability to be chemoattractants for PMNs (Pliyev, 2008). Interestingly, IL-8, one of the best PMN activators, was released in the greatest quantity in response to TiO_2 activation, suggesting that TiO_2 NPs possess a potent modulatory activity on human PMNs.

In the past, we have used the different cell responses/functions described in this study to identify cytokines (Girard et al., 1996a,b, 1997) and xenobiotics (Pelletier et al., 2000; Binet and Girard, 2008) as human neutrophil agonists. The results obtained here lead us to conclude that TiO_2 possesses important neutrophil agonistic properties *in vitro*, corresponding to its pro-inflammatory activity recently reported.

Acknowledgments

This study was partly supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and Environmental Health Research Network (RRSE) from Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). DMGG holds a Foundation Armand-Frappier M.Sc. award and DG is a Scholar from FRSQ. We thank Mary Gregory for reading this manuscript.

References

Akgul, C., Moulding, D.A., Edwards, S.W., 2001. Molecular control of neutrophil apoptosis. FEBS Letters 487, 318–322.

Alam, R., Kumar, D., Anderson-Walters, D., Forsythe, P.A., 1994. Macrophage inflammatory protein-1 alpha and monocyte chemoattractant peptide-1 elicit immediate and late cutaneous reactions and activate murine mast cells in vivo. Journal of Immunology 152, 1298–1303.

Arys, A., Philippart, C., Dourov, N., He, Y., Le, Q.T., Pireaux, J.J., 1998. Analysis of titanium dental implants after failure of osseointegration: combined histological, electron microscopy, and X-ray photoelectron spectroscopy approach. Journal of Biomedical Materials Research 43, 300–312.

Bennett, P.A., Dixon, R.J., Kellie, S., 1993. The phosphotyrosine phosphatase inhibitor vanadyl hydroperoxide induces morphological alterations, cytoskeletal rearrangements and increased adhesiveness in rat neutrophil leucocytes. Journal of Cell Science 106, 891–901.

Bermudez, E., Mangum, J.B., Wong, B.A., Asgharian, B., Hext, P.M., Warheit, D.B., Everitt, J.I., 2004. Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles. Toxicological Sciences 77, 347–357.

Binet, F., Cavalli, H., Moisan, E., Girard, D., 2006. Arsenic trioxide (AT) is a novel human neutrophil pro-apoptotic agent: effects of catalase on AT-induced apoptosis, degradation of cytoskeletal proteins and de novo protein synthesis. British Journal of Haematology 132, 349–358.

Binet, F., Chiasson, S., Girard, D., 2008. Arsenic trioxide induces *de* novo protein synthesis of annexin-1 in neutrophils: association with a heat shock-like response and not apoptosis. British Journal of Haematology 140, 454–463.

Binet, F., Girard, D., 2008. Novel human neutrophil agonistic properties of arsenic trioxide: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase and/or c-jun NH2-terminal MAPK but not extracellular signal-regulated kinases-1/2. Journal of Leukocyte Biology 84, 1613–1622.

Blackford Jr., J.A., Jones, W., Dey, R.D., Castranova, V., 1997. Comparison of inducible nitric oxide synthase gene expression and lung inflammation following intratracheal instillation of silica, coal, carbonyl iron, or titanium dioxide in rats. Journal of Toxicology and Environmental Health 51, 203–218.

Brien, W.W., Salvati, E.A., Betts, F., Bullough, P., Wright, T., Rimnac, C., Buly, R., Garvin, K., 1992. Metal levels in cemented total hip arthroplasty. A comparison of well-fixed and loose implants. Clinical Orthopaedics and Related Research, 66–74.

Buly, R.L., Huo, M.H., Salvati, E., Brien, W., Bansal, M., 1992. Titanium wear debris in failed cemented total hip arthroplasty. An analysis of 71 cases. Journal of Arthroplasty 7, 315–323.

Chen, J., Dong, X., Zhao, J., Tang, G., 2009. In vivo acute toxicity of titanium dioxide nanoparticles to mice after intraperitoneal injection. Journal of Applied Toxicology 29, 330–337.

Girard, D., Paquet, M.E., Paquin, R., Beaulieu, A.D., 1996a. Differential effects of interleukin-15 (IL-15) and IL-2 on human neutrophils: modulation of phagocytosis, cytoskeleton rearrangement, gene expression, and apoptosis by IL-15. Blood 88, 3176–3184.

Girard, D., Paquin, R., Naccache, P.H., Beaulieu, A.D., 1996b. Effects of interleukin-13 on human neutrophil functions. Journal of Leukocyte Biology 59, 412–419.

Girard, D., Paquin, R., Beaulieu, A.D., 1997. Responsiveness of human neutrophils to interleukin-4: induction of cytoskeletal rearrangements, de novo protein synthesis and delay of apoptosis. Biochemical Journal 325 (Pt 1), 147–153.

Harter, L., Keel, M., Steckholzer, U., Ungethuem, U., Trentz, O., Ertel, W., 2002. Activation of mitogen-activated protein kinases during granulocyte apoptosis in patients with severe sepsis. Shock 18, 401–406.

Hedenborg, M., 1988. Titanium dioxide induced chemiluminescence of human polymorphonuclear leukocytes. International Archives of Occupational and Environmental Health 61, 1–6.

Jin, C.Y., Zhu, B.S., Wang, X.F., Lu, Q.H., 2008. Cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in mouse fibroblast cells. Chemical Research in Toxicology 21, 1871–1877.

Kang, S.J., Kim, B.M., Lee, Y.J., Hong, S.H., Chung, H.W., 2009. Titanium dioxide nanoparticles induce apoptosis through the JNK/p38-caspase-8-Bid pathway in phytohemagglutinin-stimulated human lymphocytes. Biochemical and Biophysical Research Communications 386, 682–687.

Kennedy, A.D., DeLeo, F.R., 2009. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. Immunologic Research 43, 25–61.

Klein, J.B., Rane, M.J., Scherzer, J.A., Coxon, P.Y., Kettritz, R., Mathiesen, J.M., Buridi, A., McLeish, K.R., 2000. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor delays neutrophil constitutive apoptosis through phosphoinositide 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase pathways. Journal of Immunology 164, 4286–42891.

Krump, E., Sanghera, J.S., Pelech, S.L., Furuya, W., Grinstein, S., 1997. Chemotactic peptide *N*-formyl-met-leu-phe activation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and MAPK-activated protein kinase-2 in human neutrophils. Journal of Biological Chemistry 272, 937–944.

Laroui, H., Dalmasso, G., Nguyen, H.T., Yan, Y., Sitaraman, S.V., Merlin, D., 2009. Drug-loaded nanoparticles targeted to the colon with polysaccharide hydrogel reduce colitis in a mouse model. Gastroenterology, Nov. 9 [Epub ahead of print].

Long, T.C., Tajuba, J., Sama, P., Saleh, N., Swartz, C., Parker, J., Hester, S., Lowry, G.V., Veronesi, B., 2007. Nanosize titanium dioxide stimulates reactive oxygen species in brain microglia and damages neurons *in vitro*. Environmental Health Perspectives 115, 1631–1637.

Maurer, M., von Stebut, E., 2004. Macrophage inflammatory protein-1. International Journal of Biochemistry and Cell Biology 36, 1882–1886.

Mocsai, A., Jakus, Z., Vantus, T., Berton, G., Lowell, C.A., Ligeti, E., 2000. Kinase pathways in chemoattractant-induced degranulation of neutrophils: the role of p38 mitogen-activated protein kinase activated by Src family kinases. Journal of Immunology 164, 4321–4331.

Moghimi, S.M., Hunter, A.C., Murray, J.C., 2005. Nanomedicine: current status and future prospects. FASEB Journal 19, 311–330.

Moisan, E., Arbour, S., Nguyen, N., Hebert, M.J., Girard, D., Bernier, J., Fournier, M., Kouassi, E., 2002. Prolongation of human neutrophil survival by low-level mercury via inhibition of spontaneous apoptosis. Journal of Toxicology and Environmental Health A65, 183–203.

Nemmar, A., Melghit, K., Ali, B.H., 2008. The acute proinflammatory and prothrombotic effects of pulmonary exposure to rutile TiO2 nanorods in rats. Experimental Biology and Medicine 233, 610–619.

Osano, E., Kishi, J., Takahashi, Y., 2003. Phagocytosis of titanium particles and necrosis in TNF-alpha-resistant mouse sarcoma L929 cells. Toxicology in Vitro 17, 41–47.

Park, E.J., Yi, J., Chung, K.H., Ryu, D.Y., Choi, J., Park, K., 2008. Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. Toxicology Letters 180, 222–229.

Park, E.J., Yoon, J., Choi, K., Yi, J., Park, K., 2009. Induction of chronic inflammation in mice treated with titanium dioxide nanoparticles by intratracheal instillation. Toxicology 260, 37–46.

Pelletier, M., Bouchard, A., Girard, D., 2004. In vivo and in vitro roles of IL-21 in inflammation. Journal of Immunology 173, 7521–7530.

Pelletier, M., Ratthe, C., Girard, D., 2002. Mechanisms involved in interleukin-15-induced suppression of human neutrophil apoptosis: role of the anti-apoptotic Mcl-1 protein and several kinases including Janus kinase-2, p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases-1/2. FEBS Letters 532, 164–170.

Pelletier, M., Savoie, A., Girard, D., 2000. Activation of human neutrophils by the air pollutant sodium sulfite (Na_2SO_3): comparison with immature promyelocytic HL-60 and DMSO-differentiated HL-60 cells reveals that Na_2SO_3 is a neutrophil but not a HL-60 cell agonist. Clinical Immunology 96, 131–139.

Pioletti, D.P., Takei, H., Kwon, S.Y., Wood, D., Sung, K.L., 1999. The cytotoxic effect of titanium particles phagocytosed by osteoblasts. Journal of Biomedical Materials Research 46, 399–407.

Pliyev, B.K., 2008. Chemotactically active proteins of neutrophils. Biochemistry 73, 970–984.

Puccetti, G., Leblanc, R.M., 2000. A sunscreen-tanning compromise: 3D visualization of the actions of titanium dioxide particles and dihydroxyacetone on human epiderm. Photochemistry and Photobiology 71, 426–430.

Radnai, M., Csonka, C., Dux, L., Fazekas, A., 2000. Adsorption of human serum proteins to titanium dioxide. Fogorvosi Szemle 93, 329–334.

Schanen, B.C., Karakoti, A.S., Seal, S., Drake 3rd, D.R., Warren, W.L., Self, W.T., 2009. Exposure to titanium dioxide nanomaterials provokes inflammation of an in vitro human immune construct. ACS Nano 3, 2523–2532.

Serhan, C.N., Savill, J., 2005. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. Nature Immunology 6, 1191–1197.

Smith, J.A., 1994. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. Journal of Leukocyte Biology 56, 672–686.

Vamanu, C.I., Cimpan, M.R., Hol, P.J., Sornes, S., Lie, S.A., Gjerdet, N.R., 2008. Induction of cell death by TiO_2 nanoparticles: studies on a human monoblastoid cell line. Toxicology in Vitro 22, 1689–1696.

Ward, C., Murray, J., Clugston, A., Dransfield, I., Haslett, C., Rossi, A.G., 2005. Interleukin-10 inhibits lipopolysaccharide-induced survival and extracellular signal-regulated kinase activation in human neutrophils. European Journal of Immunology 35, 2728–2737.

Whyte, M.K., Savill, J., Meagher, L.C., Lee, A., Haslett, C., 1997. Coupling of neutrophil apoptosis to recognition by macrophages: coordinated acceleration by protein synthesis inhibitors. Journal of Leukocyte Biology 62, 195–202.

2. Article # 2: In vivo proinflammatory activity of titanium dioxide (TiO_2) nanoparticles: induction of neutrophil influx and local production of pro-inflammatory mediators in murine air pouches

2.1 Résumé en français de l'article 2, en préparation finale pour soumission :

Activités pro-inflammatoires du dioxide de titane (TiO_2) in vivo : Induction d'une infiltration de type neutrophilique et d'une production de médiateurs pro-inflammatoires dans le modèle de la poche d'air murine

Gonçalves, D.M. et Girard, D.

Nous avons récemment décrit les effets *in vitro* des nanoparticules (NP) de dioxide de titane (TiO_2) sur les neutrophiles humains. L'objectif de cette étude était de déterminer si les NP de TiO2 induisent une infiltration leucocytaire dans le modèle d'inflammation aigue de la poche d'air murine et d'identifier par la suite les populations cellulaires attirées dans la poche d'air. Les NP de TiO_2 ont induit une infiltration leucocytaire significative par rapport aux témoins, après 3-9 heures de traitement. Les neutrophiles attirés dans la poche d'air sont les leucocytes les plus abondants, représentant pas moins de 80% des cellules. En utilisant un criblage d'anticorps ou *antibody array*, qui permet la détection d'une quarantaine de médiateurs d'inflammation différents, on a observé que le TiO_2 induit une production importante de la majorité des médiateurs analysés dans les exsudats, incluant diverses chimiokines. En procédant par ELISA, nous avons confirmé que la production de MIP-1β était significativement augmentée vs les contrôles, corroborant ainsi les résultats obtenus par criblage.

2.2 Article # 2

In vivo proinflammatory activity of titanium dioxide (TiO_2)c nanoparticles: induction of neutrophil influx and local production of pro-inflammatory mediators in murine air pouches.

Gonçalves, D.M. and Girard, D.[1]

Laboratoire de recherche en inflammation et physiologie des granulocytes, Université du Québec, INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Qc, Canada

[1]Corresponding author:

Denis Girard

INRS-Institut Armand-Frappier

531 boul. des Prairies, Laval, QC, Canada, H7V 1B7

E-mail : denis.girard@iaf.inrs.ca

Phone: (450) 687-5010 (x-8847); fax: (450) 686-5309

ABSTRACT

We have recently described the *in vitro* effects of titanium dioxide (TiO_2) nanoparticles (NPs) in human neutrophils. The objective of the present study was to determine if TiO_2 NPs induced leukocyte infiltration in the *in vivo* murine air pouch model of acute inflammation and, if so, to identify the main cell populations attracted. TiO_2 NPs induced a leukocyte influx after 3-9h of treatment as the number of leukocytes attracted significantly increased when compared to controls. Neutrophils are the most abundant leukocytes attracted by TiO_2 representing more than ~80% of cells, the rest being mononuclear cells. Using an antibody array technique allowing the detection of 40 different analytes, we observed that TiO_2 increased the local production of several analytes in the exudates, including diverse chemokines. Using an ELISA assay, we found that concentration of TiO_2-induced MIP-1β was significantly increased vs controls, corroborating the antibody array results.

Keywords: Inflammation, nanoparticles, TiO_2, cytokines/chemokines, in vivo

INTRODUCTION

The field of nanoscience has been witnessing a rapid growth in the last decade. Applications are numerous and include aerospace, defense, national security, electronics, biology and biomedicine (Bellucci 2009). For example, in biomedicine, "nanoparticle (NP)-oligonucleotide" hybrids can perform many chemical and biological tasks, including molecule and protein targeting or drug and gene delivery vehicles. These new nanodevices have many novel properties that are valuable for the medical biotechnology sector (Paunesku, Rajh et al. 2003). Consequently, most researchers working in nanoscience focus mainly on technological applications rather than the new safety concerns that nanomaterial exposure raise. Nevertheless, considering the various nanotechnological applications, human exposure to NPs from anthropogenic source is unavoidable. In light of this, a recent surge of interest in the expanding field of nanotoxicology has been witnessed (Webster 2009). This field can be described as safety evaluation of engineered nanostructures and nanodevices (Oberdörster, Oberdörster et al. 2005).

Titanium dioxide (TiO_2), an odorless white powder that naturally exists in minerals like anatase, rutile, and brookite, is widely used as white pigment for paints, paper, plastic, ceramics, etc. However, TiO_2 NPs become transparent at the nanoscale and are able to absorb and reflect UV light. This explains their usefulness in sunscreens and solar cells used to make solar panels (Webster 2009). At the macrometer scale, TiO_2 has always been considered nontoxic and biologically inert (Driscoll, Lindenschmidt et al. 1990). However, at the nanoscale, it has different physical properties. TiO_2 has been shown to be

able to penetrate skin (Wu, Liu et al. 2009) and catalyse oxidative damage to DNA *in vitro* and *in vivo* (Dunford, Salinaro et al. 1997). A distribution experiment also revealed that after intraperitioneal injection in mice, TiO_2 NPs were retained in multiple organs and tissues, and induced various degrees of organ lesions. (Chen, Dong et al. 2009). From an inflammatory perspective, it appears that TiO_2 NPs possess pro-inflammatory properties similar to those exhibited by other nanomaterials (Blackford et al., 1997; Park et al., 2009; Schanen et al., 2009). Some pro-inflammatory effects of TiO_2 NPs were observed *in vitro* in pulmonary cells and in animals following lung instillation. In fact, the vast majority of studies investigating the inflammatory properties of nanomaterials target pulmonary cells, airways and lungs (Driscoll, Lindenschmidt et al. 1990; Singh, Shi et al. 2007; Liao, Chiang et al. 2008; Rossi, Pylkkänen et al. 2009). However, NPs can also gain entry into human systems through ingestion and dermal routes (Fabian, Landsiedel et al. 2008; Wu, Liu et al. 2009). Curiously, there are few *in vivo* and *in vitro* studies interested in cytokine production to assess potential inflammatory responses following cell stimulation by TiO_2. In one report, TiO_2 NPs administered intravenously in rats caused no significant chemokine, cytokine or any other parameter of immune modulation variation (Fabian, Landsiedel et al. 2008). In another study, a 24 h treatment of A549 human lung epithelial cells with TiO_2 NPs caused a significant increase in interleukin (IL)-8 (Singh, Shi et al. 2007).

It is a known fact that polymorphonuclear neutrophil (PMN) cell numbers increase in TiO_2-lung inflammation *in vivo* (Chen, Dong et al. 2009; Hamilton, Wu et al. 2009; Rossi, Pylkkänen et al. 2009). However, research on this matter is sparse in other tissues.

Also, there is a lack of literature concerning the role of TiO_2 on neutrophil cell physiology, particularly in PMNs of human origin. We addressed this problem and found that TiO_2 exerts important human neutrophil agonistic properties *in vitro*, including the capacity to induce morphological cell change and phosphorylation events, to delay apoptosis and to increase the production of cytokines and chemokines including the potent IL-8 chemokine (Gonçalves, Chiasson et al. 2010). The objective of the present study was to determine if TiO_2 NPs induced leukocyte infiltration in the murine air pouch model of acute inflammation and, if so, to identify the main cell populations attracted and the cytokines and chemokines produced locally in the pouches.

METHODS

Nanoparticles. Titanium dioxide (TiO_2) (anatase crystals) nanoparticles were purchased from Vivenano (Toronto, ON) as an aqueous suspension of TiO_2 NPs stabilized by polyacrylate sodium and were used as received from the manufacturer without modification. The particles sizes are 1-10 nm (90%) as determined by transmission electron microscopy as described by the manufacturer.

Murine Air Pouch Model. CD1 female mice, 6 to 8 week of age, were obtained from Charles River Laboratories (St-Constant, Canada). On day 0 and 3, mice were anaesthetized with isofurane and 3 ml of sterile air was injected subcutaneously, in the back, with a 26-gauge needle to form an air pouch as published previously (Lavastre, Cavalli et al. 2004; Pelletier, Bouchard et al. 2004; Pelletier and Girard 2007; Ratthe, Ennaciri et al. 2009) . On day 6, 1 ml of buffer (Ctrl), 100 μg/ml TiO_2 or 1% carrageenan (CRGN) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri) was injected into the air pouch. The concentration of TiO_2 used was determined previously when testing the effect of TiO_2 NPs in vitro (Garces Goncalves, Chiasson et al. 2009; Goncalves, Chiasson et al. 2010). Mice were killed by CO_2 asphyxiation 3, 6, 9, 12 or 24h after the treatment and the pouches were washed once with 1 ml and then twice with 2 ml of HBSS containing 10 mM EDTA. Exudates were centrifuged at 100 X g for 10 min at room temperature and supernatants were collected and stored at -80°C for further analysis. Cells were resuspended at 0.5 x 10^6 cells/ml, centrifuged, spread onto microscope slides and stained with Hema-Stain (Fisher Scientific, Ottawa, Canada) for quantification of leukocyte

subpopulations. To further characterize the leukocyte subpopulations, the cells were suspended in PBS containing 5μg/ml human IgG for 30 min at 4°C to block FcRs and then stained for 30 min at 4°C with FITC-rat antimouse F4/80 Ag (rat IgG2b), the FITC-rat anti-mouse neutrophils clone 7/4 (rat IgG2a), or appropriate FITC-rat IgG negative control were from Serotec (Raleigh, NC). Experiments were performed under protocols approved by Animal Use and Care Committees at INRS-Institut Armand-Frappier.

Cytokine/chemokine protein array. Mouse antibody array I kit was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN), and all the steps for the simultaneous detection of 40 analytes were performed as per the manufacturer's recommendation and as previously published (Ratthe, Ennaciri et al. 2009). These included TREM-1, TNF-α, TIMP-1, TARC (CCL17), SDF1 (CXCL12), RANTES (CCL5), MIP-2, MIP-1β, MIP1-α, MIG (CXCL-9), MCP-5 (CCL-12), JE/MCP-1 (CCL2), M-CSF, KC, I-TAC, IP-10 (CXCL-10), interleukin(IL)-27, IL-23, IL-17, IL-12(p70), IL-16, IL-13, IL-10, IL-7, IL-6, IL-5, IL-4, IL-3, IL-2, IL-1Ra, IL-1β, IL-1α, IFN-γ, sICAM-1, eotaxin, I-309 (CCL-1), GM-CSF, G-CSF, C5a, and BLC (CXCL-13). Previous experiments conducted with two membranes probed with the exudates from two different mice treated with lipopolysaccharides reveal that the results were reproducible (*data not shown*). Because of that, we next decided to pool exudates ($n \geq 4$ mice) harvested from HBSS-treated (Ctrl) or TiO_2-induced murine air pouches to probe the membranes no more than two weeks after the *in vivo* experiments. The chemiluminescent signal from the bound cytokines/chemokines present in the exudates was detected on Kodak film X OMAT-RA.

The signal intensity (each analytes in duplicate) was normalized to the membrane's positive control. Results are expressed as ratios (fold increased: tested group/control). Ratios ≥1.2 were considered slightly positive (Ratthe, Ennaciri et al. 2009). Protein array membranes were scanned and densitometry analysis was performed using the Multi-Analyst program (Bio-Rad, Hercules, CA).

MIP-1β production. The measurement of MIP-1β production in the exudates was determined using a commercially available ELISA kit (Medicorp Inc, Montreal, Canada), as per the manufacturer's recommendation.

Statistical analysis. Statistical analyses were performed, using Student t-test or ANOVA (Dunnett multicomparison test) with SigmaStat for Windows (version 3.0). Statistical significance was established at $p<0.05$.

RESULTS

TiO_2 induces leukocyte infiltration in vivo: predominance of neutrophils. We frequently used the murine air pouch model to detect a leukocyte infiltration after 6-9 h of treatment with a variety of compounds, including cytokines (Pelletier, Bouchard et al. 2004; Ratthe, Ennaciri et al. 2009). Because of this, we first initiated a series of experiments in order to determine whether or not TiO_2 NPs attract leukocytes into air pouches. As illustrated in **Fig. 1**. TiO_2 NPs attract and increased number of leukocytes into air pouch after 9h ($1.25 \times 10^6 \pm 0.38$ cells vs $0.26 \times 10^6 \pm 0.1$ cells compared to controls). Cytology examinations revealed that the vast majority of cells were PMNs (inset, **Fig. 1**).

Kinetic of TiO_2-induced leukocyte infiltration in vivo. Because of the above results, we next performed other experiments in order to determine the kinetic of leukocyte infiltration and to identify the cell types. As illustrated in **Fig. 2A**, administration of TiO_2 NPs into air pouches caused a rapid accumulation of leukocytes after 3h of treatment when compared to controls ($4.0 \times 10^6 \pm 1.6$ cells, mean ± SEM, $n \geq 4$ vs $1.7 \times 10^6 \pm 0.6$). The maximum level of leukocytes attracted into the pouch by TiO_2 was observed after 6h of treatment ($5.6 \times 10^6 \pm 1.3$ cells). After 9h, the number of attracted leukocytes started to decline, but the total number of cells was still significantly increased compared to controls ($2.4 \times 10^6 \pm 0.8$ cells vs $0.2 \times 10^6 \pm 0.8$ cells), and then reached levels similar to controls. In contrast to TiO_2, CRGN, known to induce a leukocyte influx for a longer period of time (Moisan, Chiasson et al. 2007; Vigil, de Liz et al. 2008), significantly increased the number of cells after 9h ($2.8 \times 10^6 \pm 0.4$ cells vs $0.2 \times 10^6 \pm 0.8$ cells) and even more after 12h ($3.3 \times 10^6 \pm 0.8$ cells) and 24h ($3.4 \times 10^6 \pm 1.1$ cells). **Fig. 2B** (upper

panel) illustrates that PMNs are the main cell type attracted by TiO_2 as identified by cytology. After 3h, we noted that 80 ± 2% of leukocytes are neutrophils. This proportion was 91 ± 6%, 90 ± 6% and 64 ± 10% after 6, 9, and 12h, respectively. The rest of the leukocytes were mononuclear cells and the maximum proportion of mononuclear cells detected never exceeded 36%, a value observed only after 12h of treatment. In all conditions, the proportion of lymphocytes and other leukocytes were always <1% (*data not shown*). Unlike TiO_2, CRGN attracted almost the same proportion of PMNs (46 ± 7%) and mononuclear cells (54 ± 7%) after 3h (**Fig. 2B**, bottom panel). Similar results were also observed after 6h (PMNs, 55 ± 10% and mononuclear cells, 45 ± 10%). As expected, after 9h and 12h, the proportion of PMNs increased (to 65 ± 2% and 68 ± 10% after 9h and 12h, respectively). As indicated in **Fig. 2B** (see inset), the cell identification was confirmed by flow cytometry using specific anti-neutrophil and anti-mononuclear cell antibodies. For clarity, only the results obtained after 9h of treatment are illustrated. However, the cell identification by flow cytometry was confirmed for all periods of time and the results correlated with those obtained by cytology (*data not shown*).

TiO_2 increases the local production of several analytes in the murine air pouch exudates. Knowing that TiO_2 induces a leukocyte influx *in vivo* (this report), and since we recently demonstrated that TiO_2 increased the production of several analytes in human PMNs (Garces Goncalves, Chiasson et al. 2009), we next investigated the possibility that the local production of several analytes can be increased into TiO_2-induced air pouches using an antibody array method. Typical results obtained on membranes after 3h of treatment with buffer (upper picture) or TiO_2 NPs (bottom picture) are illustrated in **Fig. 3A**, where

the density of several analytes (spots) was increased by TiO_2 when compared to controls. For clarity, the raw data obtained after 6h, 9h, and 12h of treatment are not illustrated in this part of the figure. However, the densities for all analytes and for each periods of time have been calculated and are illustrated in **Fig. 3B** and **Fig. 4**.

In **Fig. 3B,** the number of analytes with a ratio $\geq$ 1.2, a value considered positive vs controls (Garces Goncalves, Chiasson et al. 2009; Ratthe, Ennaciri et al. 2009; Goncalves, Chiasson et al. 2010), as well as with ratios ≥ 2; ≥ 5; ≥ 10; and ≥ 15, have been plotted for each periods of time. It is clear that the vast majority of analytes with highest ratios have been detected after 3h and 6h of treatment. Then the numbers of analytes with high ratios markedly decreased after 9h of treatment with TiO_2 NPs. No analyte were positive (ratio $\geq$ 1.2) after 12h. More precisely, after 3h of treatment with TiO_2, the ratios of 37/40 (92.5%) were $\geq$ 1.2; 32/40 (80%) $\geq$ 2; 16/40 (40%) $\geq$ 5; 5/40 (12.5%) $\geq$ 10; and 3/40 (7.5%) $\geq$ 15. After 6h, the ratios of 36/40 (90%) were $\geq$ 1.2; 25/40 (62.5%) $\geq$ 2; 6/40 (15%) $\geq$ 5; 4/40 (10%) $\geq$ 10; and 1/40 (2.5%) $\geq$ 15. Finally, after 9h of treatment with TiO_2, 12/40 (30%) were $\geq$ 1.2; 7/40 (17.5%) $\geq$ 2; 1/40 (2.5%) $\geq$ 5; 0/40 (0%) $\geq$ 10; and 0/40 (0%) $\geq$ 15.

The 40 different analytes tested in this study are listed in **Fig. 4**. This figure also illustrates the ratios (TiO_2 values/control=fold increase) for each analytes obtained after 3, 6, 9, and 12h of treatment with TiO_2. The ratios considered positive (values $\geq$ 1.2) are illustrated as filled bar whereas those that are negative (values <1.2) are illustrated as open bar. It is clear that the vast majority of the tested analytes were positive after 3h and

6h of treatment with TiO_2 NPs (panels A and B). Interestingly, several of these analytes are chemokines known to attract leukocytes. The analytes with the greatest ratios in response to TiO_2 are the cytokine IL-6 (ratio of 22.8) and the chemokine IP-10 (CXCL-10) (ratio of 22.4) and were observed after 3h of treatment (panel A). Other analytes with a markedly increased ratio are sICAM-1 (17.3), MIP2 (14.3), and MIG (13.1). Interestingly, among these analytes, only the ratio of IP-10 was maintained with a high value (ratio of 20.4) after 6h of treatment (panel B). In contrast, only the value of MIG increased from 13.1 to 20.1. It is important to specify that analytes with a ratio ranging between 2 and 10 also have to be considered as highly expressed. The values of 9.2 and 7.3 for the two potent chemokines MIP-1α and MIP-1β (Macrophage Inflammatory Protein-1 alpha/beta), respectively, have to be mentioned because of their ability to elicit a rapid influx of PMNs to the site of injection when administered in vivo (Wolpe, Davatelis et al. 1988; Alam, Kumar et al. 1994).

Measurement of the TiO_2-induced MIP-1β concentrations in the exudates. Because of the importance of MIP-1β in leukocyte infiltration, and in order to confirm the data obtained by the antibody array method, we determined the concentrations of MIP-1β by ELISA using the same exudates (not pooled) used for the detection of analytes with the antibody array method. As illustrated in **Fig. 5**, more than 600 pg/ml of MIP-1β was measured in the exudates after 3h of treatment with TiO_2. Then, the concentrations decreased over time. For comparison, the ratio of MIP-1β detected in the exudates using the antibody array assay is illustrated in the inset of **Fig. 5**.

DISCUSSION

The results of this study clearly establish that TiO_2 NPs possess *in vivo* pro-inflammatory activity since they attract PMNs and mononuclear cells, but to a lesser extend, in the murine air pouch model of acute inflammation. This observation is of interest as it further demonstrates the pro-inflammatory activity of TiO_2 NPs previously reported almost exclusively in relation to lung inflammation. The murine air pouch model is a good model for investigating inflammation occurring in a synovial-like structure (Sin, Sedgwick et al. 1986). Synovitis is known to occur in association with rheumatic diseases, especially during rheumatoid arthritis, where a leukocyte infiltration, including a high proportion of PMNs, is observed. To the best of our knowledge, the first time this model was employed for an immunotoxicological study was in 2001 where the organochlorine insecticide dieldrin was found to attract neutrophils (Pelletier, Roberge et al. 2001). This model is attractive because, in response to a given pro-inflammatory agent, it allows the recruitment of large number of leukocytes that can be easily collected, counted, subtyped and used in *ex vivo* experiments. Furthermore, this model is simple an economical and allows to study all three phases of acute inflammation (initiation, amplification, resolu

tion). Interestingly, TiO_2 NPs were found to rapidly induce a neutrophil infiltration as soon as 3 hours after treatment where almost 80% of cell attracted were PMNs. Therefore, TiO_2 is among very few compounds known to induce such a rapid *in vivo* neutrophil influx since most agents are known to induce a leukocyte influx after 6-9h of treatment in this model with a proportion of PMNs varying between about 50-90%, depending of the agent tested. For example, in our hands, we normally observed a

neutrophil influx after 6-9h of treatment with cytokines like IL-4, IL-15 or IL-21 with a proportion of PMNs ranging from 60-80%, the rest being almost exclusively mononuclear cells (Ratthe, Ennaciri et al. 2009; Pelletier and Girard 2005; Pelletier, Bouchard et al. 2004; Pelletier and Girard 2005). However, like other compounds, the leukocyte influx start to decline after 9-12h of treatment with TiO_2 NPs and reach a basal level similar to control animals. This is in agreement with this *in vivo* model where most compounds tested induced an accumulation of PMNs followed by an influx of mononuclear cells with complete resolution of cell infiltration after 24h. However, some compounds, like CRGN used in the present study, are known to induce a leukocyte influx observable after few hours that further increased and remained elevated for 24-48h (Garcia-Ramallo, Marques et al. 2002) (Sin and Wong 1992). Preliminary experiments performed in our laboratory suggest that TiO_2 NPs do not increase leukocyte influx after 30 min but a clear, although not significant, increase number of leukocytes (almost exclusively PMNs) was observed after 2h (*data not shown*). Therefore, TiO_2 NPs act in the first few hours *in vivo* for locally attracting PMNs preferentially. The fact that PMNs are targets to TiO_2 NPs correlates well with our previous observation that TiO_2 NPs can activate human neutrophils *in vitro* (Goncalves, Chiasson et al. 2010).

Administration of TiO_2 NPs into air pouch caused also an increased expression of important pro-inflammatory mediators, including several chemokines. Interestingly, the majority of the analytes were detected after 3-6h of treatment with TiO_2 NPs with ratios that were high ($\geq$10) to very high ($\geq$15). This is in contrast with IL -4 that was found to increase the expression of only few analytes as assessed by an antibody array method

where the maximal ratio of ~7 was observed for the MCP-1 (CCL2) chemokine (Ratthe, Ennaciri et al. 2009). Although it is inconceivable to investigate all known chemokines and cytokines, the assay used in this study gives an excellent idea on the proinflammatory activity of TiO_2 NPs and clearly indicates that the mode of action of such NPs *in vivo* is very complex. This includes the local production of several pro-inflammatory mediators like chemokines. Among them, the chemokines MIP-1α and MIP-1β, generally not chemotactic for PMNs *in vitro*, are known to elicit a rapid influx of PMNs to the site of injection when administered *in vivo* (Alam et al., 1994). We are aware that all analytes detected in this study are not necessarily produced by PMNs, but several are known to attract them *in vivo*. As reported previously by Garcia-Ramallo et al., the production of chemokines, including MCP-1, MIP-1α, RANTES, KC and MIP-2 in the CRGN-induced murine air pouch exudates was found to precede leukocyte infiltration (Garcia-Ramallo, Marques et al. 2002). Based on the variety of analytes detected in the exudates after 3h, our results also suggest that TiO_2 NPs will first activate the resident lining cells composed of a variety of tissue infiltrated inflammatory cells, including fibroblasts, mast cells, mononuclear cells, PMNs, etc. (Sin, Sedgwick et al. 1986). Interestingly, preliminary results support this concept since after 30 min of treatment with TiO_2 NPs, more than 400 pg/ml of MIP-1β was measured by ELISA in the exudates when compared to 30 pg/ml in controls (*data not shown*). Future experiments are needed in order to clearly determine the profiles and kinetic of analytes present in the exudates of TiO_2 NPs-induced air pouch after a short treatment (30-120 min).

According to the results of this study, it is clear that the murine air pouch model is very useful for determining that TiO_2 NPs possess pro-inflammatory activity *in vivo*. It allows the determination of the kinetic of leukocytes infiltration as well as the identification of the subtype of cells migrating into the pouch. In combination with an antibody array technique, it also allows the detection of several analytes over time that helps to better understand the mode of action of the NPs. In future, it will be interesting to determine the potential pro-inflammatory activity of other NPs in order to classify them according to their degree of pro-inflammatory activity. Because human exposure to NPs is inevitable, it will be advantageous to develop biotechnologies using NPs that posses the less potential pro-inflammatory activity *in vitro* and/or *in vivo*.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was partly supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and Environmental Health Research Network (RRSE) from Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). DMG holds a Fondation Armand-Frappier M.Sc award. We thank Mary Gregory for reading this manuscript.

FIGURES

Figure 1. *TiO_2 NPs induce preferentially the recruitment of neutrophils in vivo*. Murine air pouches were raised before injection of buffer (Ctrl) or 100 μg/ml TiO_2 nanoparticles (TiO_2) for 9h. The total number of leukocytes was calculated and the cell populations were identified by cytology. Numbers in parentheses are the number of animals used. Results are means ± SEM. Insert, the vast majority of leukocytes attracted in the pouches are neutrophils (arrows). Few mononuclear cells are also present (arrowhead). B and C, murine air pouches were raised before injection of buffer (Ctrl), 100 μg/ml TiO_2 NPs or a solution of 1% carrageenan (CRGN). Exudates were harvested at the indicated periods of time and the number of leukocytes was calculated (B) and cell populations were identified by cytology (C) and flow cytometry (insert). Results are means ± SEM ($n \geq 4$). *$P < 0.05$ versus Ctrl, by ANOVA.

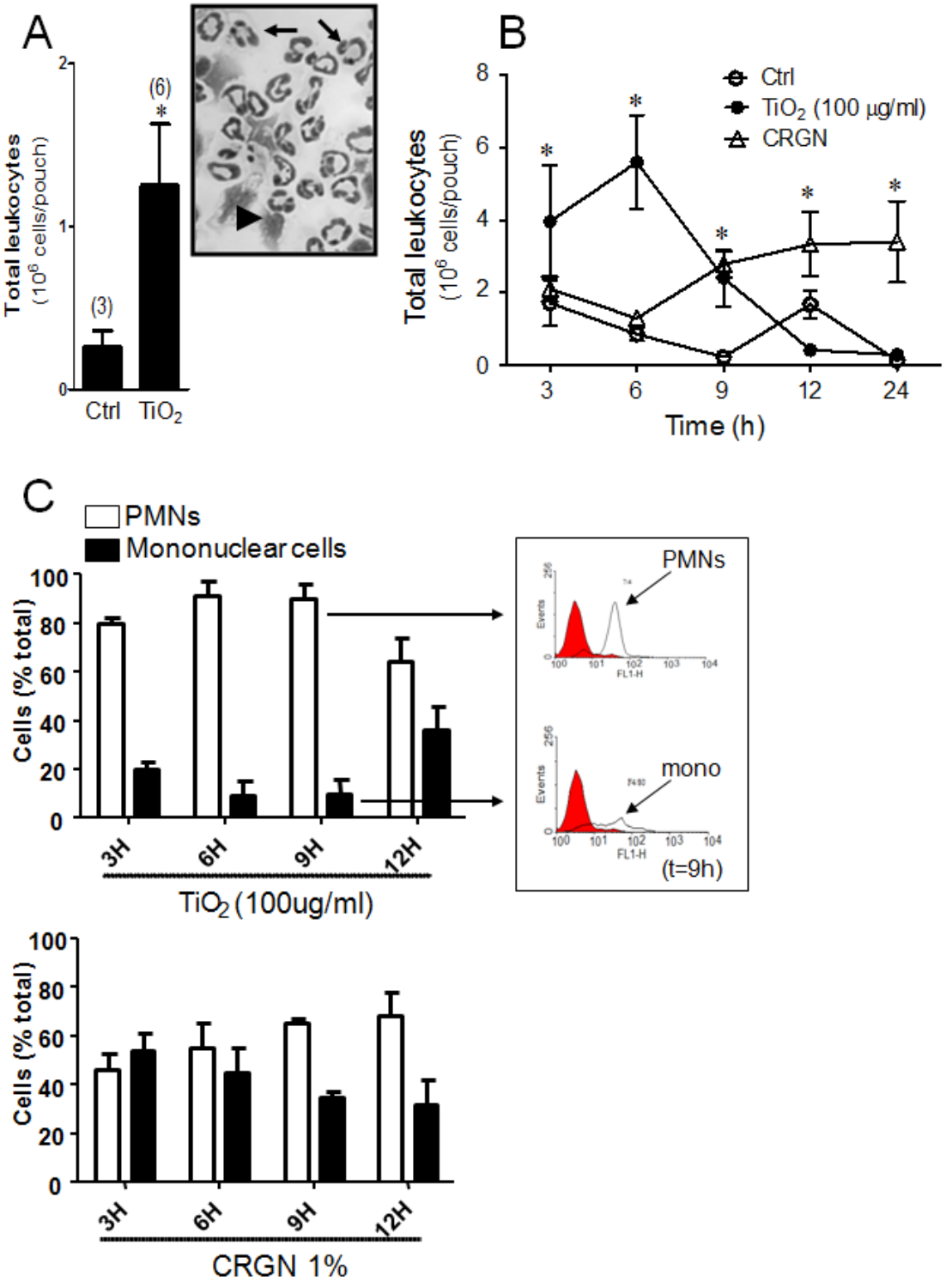
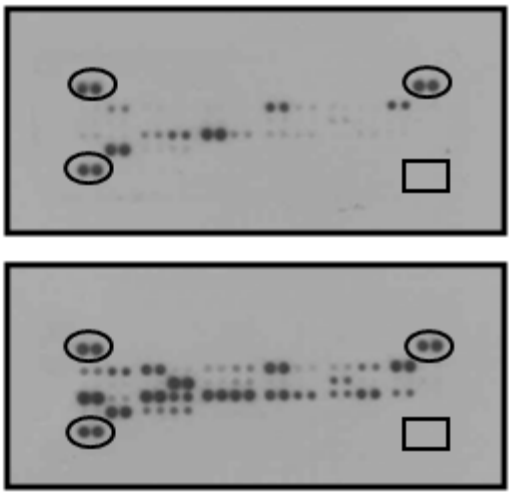

A
Total leukocytes
(10^6 cells/pouch)
(3)
(6)
*
Ctrl
TiO2
B
Total leukocytes
(10^6 cells/pouch)
Ctrl
TiO2 (100 µg/ml)
CRGN
Time (h)
C
PMNs
Mononuclear cells
Cells (% total)
3H
6H
9H
12H
TiO2 (100ug/ml)
PMNs
mono
(t=9h)
CRGN 1%

Figure 2. *TiO_2 NPs increase the local production of several analytes in the murine air pouch exudates as detected by an antibody array method.* Aliquots of the exudates used in **Fig. 1**, were pooled and a fraction of the mixture was used for the detection of several analytes using an antibody array. The ratio for each analyte was calculated as described in Methods. A, raw data obtained on the membranes where almost all spots are increased after a treatment with TiO_2 compared to Controls. Circles and boxes are respectively the positive and negative controls of the assay. B, the number of analytes was plotted according to the intensity of the ratios subdivided into five categories.

A


Ctrl
TiO_2

(t=3h)

B

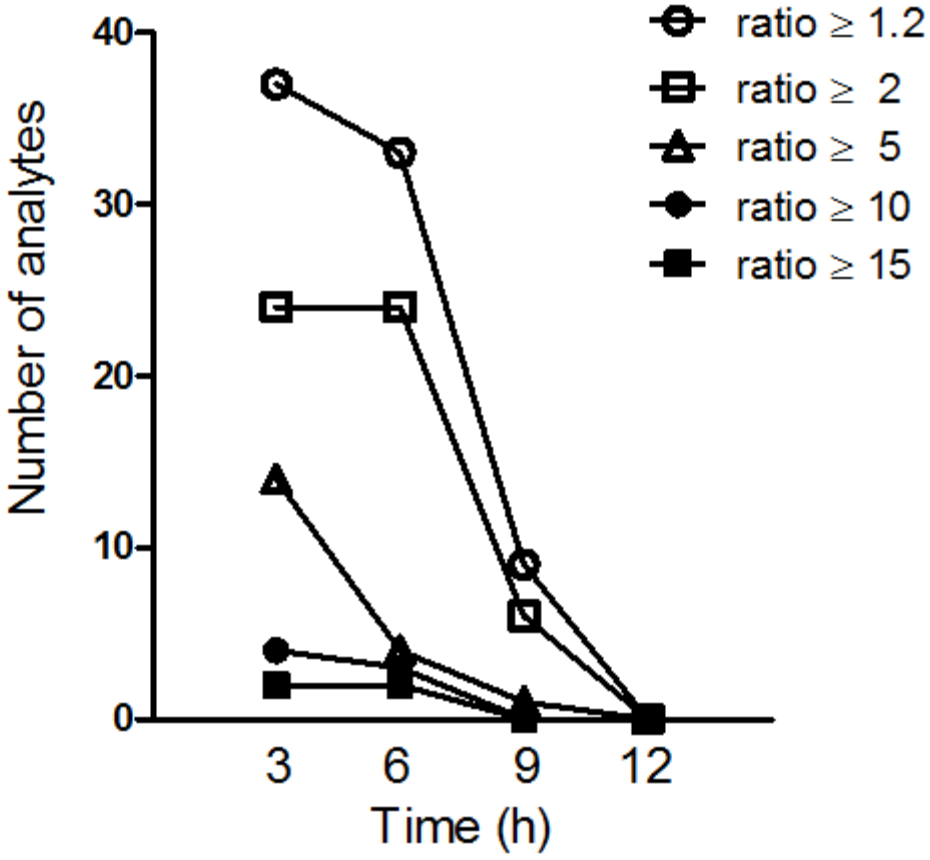

ratio ≥ 1.2
ratio ≥ 2
ratio ≥ 5
ratio ≥ 10
ratio ≥ 15
Number of analytes
40
30
20
10
0
3
6
9
12
Time (h)

Figure 3. *List of the different analytes with their corresponding ratio obtained after the treatment with the TiO_2 NPs.* The ratio obtained for each analyte is indicated for each period of time after TiO_2 NP treatment vs corresponding controls. Filled bars represent results with ratios$\geq$ 1.2 that were considered positive; white open bars represent results considered negative.

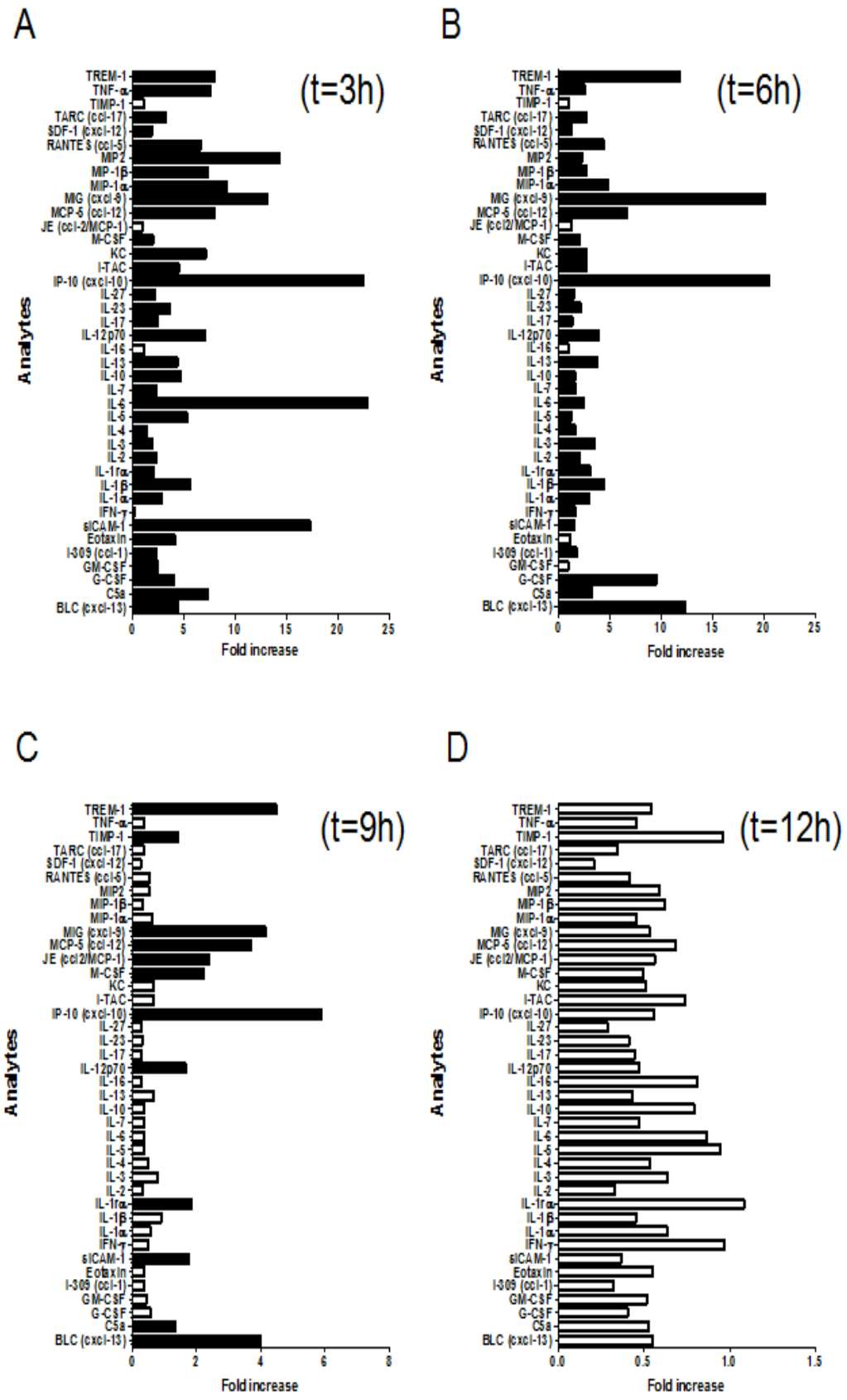
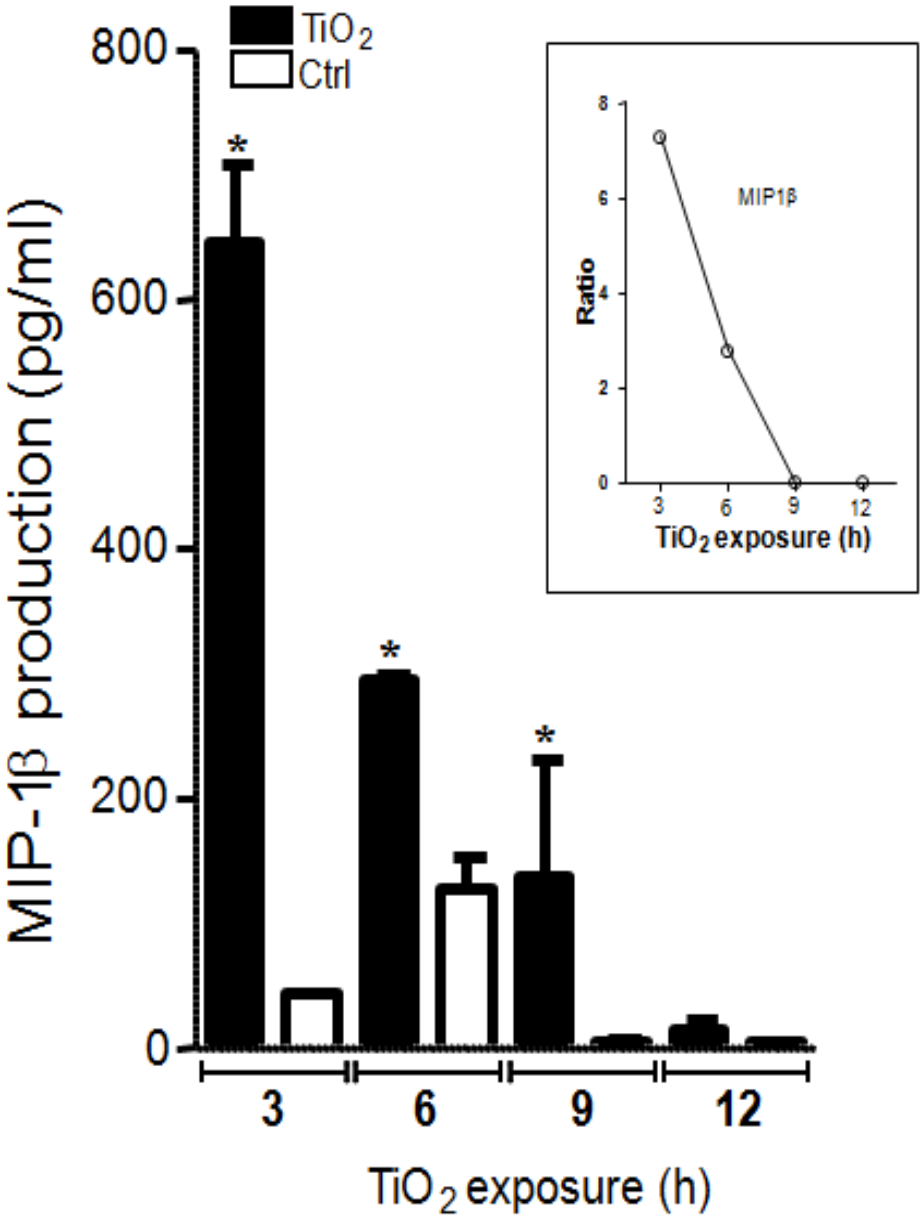

A
(t=3h)
B
(t=6h)
C
(t=9h)
D
(t=12h)
Analytes
Fold increase
TREM-1
TNF-α
TIMP-1
TARC (ccl-17)
SDF-1 (cxcl-12)
RANTES (ccl-5)
MIP2
MIP-1β
MIP-1α
MIG (cxcl-9)
MCP-5 (ccl-12)
JE (ccl2/MCP-1)
M-CSF
KC
I-TAC
IP-10 (cxcl-10)
IL-27
IL-23
IL-17
IL-12p70
IL-16
IL-13
IL-10
IL-7
IL-6
IL-5
IL-4
IL-3
IL-2
IL-1rα
IL-1β
IL-1α
IFN-γ
sICAM-1
Eotaxin
I-309 (ccl-1)
GM-CSF
G-CSF
C5a
BLC (cxcl-13)

Figure 4. *Measurement of the TiO_2 NPs-induced MIP-1β concentrations*. Aliquots of the different exudates were used to measure the concentration of MIP-1β by ELISA. Results are means ± SEM (n≥4), by ANOVA. *P < 0.05 compared to controls. Insert, results of MIP-1β ratios obtained by the antibody array method are illustrated.


TiO2
Ctrl
800
600
400
200
0
MIP-1β production (pg/ml)
*
*
*
3
6
9
12
TiO2 exposure (h)
MIP1β
Ratio
8
6
4
2
0
3
6
9
12
TiO2 exposure (h)

REFERENCES

Alam R, Kumar D, Anderson-Walters D, Forsythe PA. 1994. Macrophage inflammatory protein-1 alpha and monocyte chemoattractant peptide-1 elicit immediate and late cutaneous reactions and activate murine mast cells in vivo. J Immunol 152: 1298-1303.

Panessa-warren BJ, Warren JB, Maye MM, Schiffer W. 2009. Nanoparticle interactions with living systems: in vivo and in vitro biocompatibility in *nanoparticles and nanodevices in biological applications*, Stefano Bellucci S. (Ed), Springer, Berlin Heidelberg, p. 1-47.

Chen J, Dong X, Zhao J, Tang G. 2009. In vivo acute toxicity of titanium dioxide nanoparticles to mice after intraperitioneal injection. Journal of Applied Toxicology 29: 330-337.

Driscoll KE, Lindenschmidt RC, Maurer JK, Higgins JM, Ridder G. 1990. Pulmonary response to silica or titanium dioxide: inflammatory cells, alveolar macrophage-derived cytokines, and histopathology. American journal of respiratory cell and molecular biology 2: 381-390.

Dunford R, Salinaro A, Cai L, Serpone N, Horikoshi S, Hidaka H, Knowland J. 1997. Chemical oxidation and DNA damage catalysed by inorganic sunscreen ingredients. FEBS Letters 418: 87-90.

Fabian E, Landsiedel R, Ma-Hock L, Wiench K, Wohlleben W, Van Ravenzwaay B. 2008. Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in rats. Archives of Toxicology 82: 151-157.

Garcia-Ramallo E, Marques T, Prats N, Beleta J, Kunkel SL, Godessart N. 2002. Resident cell chemokine expression serves as the major mechanism for leukocyte recruitment during local inflammation. Journal of Immunology 169: 6467-6473.

Goncalves DM, Chiasson S, Girard D. 2010. Activation of human neutrophils by titanium dioxide (TiO2) nanoparticles. Toxicol In Vitro 24: 1002-1008.

Hamilton R, Wu N, Porter D, Buford M, Wolfarth M, Holian A. 2009. Particle length-dependent titanium dioxide nanomaterials toxicity and bioactivity. Particle and Fibre Toxicology 6: 35.

Lavastre V, Cavalli H, Ratthe C, Girard D. 2004. Anti-inflammatory effect of Viscum album agglutinin-I (VAA-I): Induction of apoptosis in activated neutrophils and inhibition of lipopolysaccharide-induced neutrophilic inflammation in vivo. Clinical and Experimental Immunology 137: 272-278.

Liao CM, Chiang YH, Chio CP. 2008. Model-based assessment for human inhalation exposure risk to airborne nano/fine titanium dioxide particles. Science of the Total Environment 407: 165-177.

Moisan E, Chiasson S, Girard D. 2007. The intriguing normal acute inflammatory response in mice lacking vimentin. Clin Exp Immunol 150: 158-168.

Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. 2005. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. Environmental Health Perspectives 113: 823-839.

Paunesku T, et al. 2003. Biology of TiO2-oligonucleotide nanocomposites. Nature Materials 2: 343-346.

Pelletier M, Girard D. 2005. Interleukin-15 increases neutrophil adhesion onto human respiratory epithelial A549 cells and attracts neutrophils in vivo. Clinical and Experimental Immunology 141: 315-325.

Pelletier M, Girard D. 2007. Biological functions of interleukin-21 and its role in inflammation. ScientificWorldJournal 7: 1715-1735.

Pelletier M, Bouchard A, Girard D. 2004. In vivo and in vitro roles of IL-21 in inflammation. J Immunol 173: 7521-7530.

Pelletier M, Roberge CJ, Gauthier M, Vandal K, Tessier PA, Girard D. 2001. Activation of human neutrophils in vitro and dieldrin-induced neutrophilic inflammation in vivo. Journal of Leukocyte Biology 70: 367-373.

Ratthe C, Ennaciri J, Garces Goncalves DM, Chiasson S, Girard D. 2009. Interleukin (IL)-4 induces leukocyte infiltration in vivo by an indirect mechanism. Mediators Inflamm 2009: 193970.

Rossi EM, et al. 2009. Airway exposure to silica-coated TiO2 nanoparticles induces pulmonary neutrophilia in mice. Toxicological Sciences 113: 422-433.

Sin YM, Wong MK. 1992. Effect of sodium aurothiomalate on carrageenan induced inflammation of the air pouch in mice. Ann Rheum Dis 51: 112-116.

Sin YM, Sedgwick AD, Chea EP, Willoughby DA. 1986. Mast cells in newly formed lining tissue during acute inflammation: A six day air pouch model in the mouse. Annals of the Rheumatic Diseases 45: 873-877.

Singh S, et al. 2007. Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO2: Role of the specific surface area and of surface methylation of the particles. Toxicology and Applied Pharmacology 222: 141-151.

Vigil SVG, de Liz R, Medeiros YS, Fröde TS. 2008. Efficacy of tacrolimus in inhibiting inflammation caused by carrageenan in a murine model of air pouch. Transplant Immunology 19: 25-29.

Prasad GL. 2009. Biomedical applications of nanoparticles, in *Safety of Nanoparticles frommanufacturing to medical applications* Webster TJ (Ed). Springer Science+Business, Media, LLC 2009, p. 89-109.

Wolpe SD, Davatelis G, Sherry B, Beutler B, Hesse DG, Nguyen HT, Moldawer LL, Nathan CF, Lowry SF, Cerami A. 1988. Macrophages secrete a novel heparin-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties. J Exp Med 167: 570-581.

Wu J, Liu W, Xue C, Zhou S, Lan F, Bi L, Xu H, Yang X, Zeng FD. 2009. Toxicity and penetration of TiO₂ nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure. Toxicology Letters 191: 1-8.

TROISIÈME SECTION: DISCUSSION ET CONCLUSION

Les études portant sur l'effet direct des NP sur les PMN sont malheureusement peu nombreuses, ce qui est surprenant étant donné le rôle de cellule clé de l'inflammation. Ces derniers sont les globules blancs les plus importants en terme de nombre, ils sont les premiers à se rendre au site inflammatoire et rejettent dans ce site une quantité importante de cytokine. Enfin, ces cellules se dirigent spontanément en apoptose, une de leur fonction les plus importantes, qui permet la résolution de l'inflammation lorsqu'il y a élimination subséquente par les macrophages.

La recherche sur les nanoparticules devrait mener au développement de nombreuses applications innovatrices qui risquent de métamorphoser le monde de demain. Selon nanoquébec (un organisme à but non lucratif dont le principal partenaire financier est le Ministère du Développement économique, de l'Innovation et de l'Exportation, et qui joue un rôle majeur de planification et de structuration des nanotechnologies au Québec) les nanotechnologies devraient apporter autant d'inovations, sinon plus, en moins de 25 ans que toutes celles qui découlent de l'électricité depuis plus de 100 ans. Ces particules, aux propriétés chimiques et physiques uniques sont d'un grand intérêt pour l'industrie médicale. Elles ont, entre autres, le potentiel d'augmenter l'efficacité des médicaments anti-cancer à cause de leurs propriétés électriques uniques (Zheng and Sanche 2009) de cibler l'effet de certains médicaments cellulaires en traversant les membranes cellulaires (Dubus, Bosdure et al. 2010) tel que faire par exemple dans le cas de l'insuline en facilitant son absorption par la muqueuse intestinale et en la protégeant des enzymes du tractus gastro-intestinal (Damge, Reis et al. 2008). Cependant dans des cas comme ceux-ci, il doit y avoir évaluation du potentiel pro-inflammatoire de la NP utilisée. Sachant que les neutrophiles sont grandement impliqués dans la réponse inflammatoire, nous avons décidé d'évaluer les interactions et les effets des NP sur les NTs. Pour y arriver, nous avons décidé de procéder avec un volet *in vitro* et un volet *in vivo* en parallèle pour chaque NP étudiée, ce qui se fait rarement lors des études en nano-toxicologie.

Une multitude de xénobiotiques et d'agents étrangers sont capables d'activer les PMN humains *in vitro*, tel que démontré lors de travaux précédents dans diverses études et dans

notre laboratoire également incluant des pesticides comme le toxaphène et la dieldrine par exemple (Gauthier, Roberge et al. 2001; Pelletier, Roberge et al. 2001), ou encore des agents thérapeutiques comme le trioxide d'arsenique (Binet, Chiasson et al.). Afin d'évaluer la capacité des NP de TiO_2 à activer les NTs, nous avons entrepris de vérifier s'il y avait changements morphologiques et des événements de phosphorylation qui étaient induits chez les NTs humains *in vitro*, à la suite de différents temps d'exposition aux NP de TiO_2. Avant de procéder, nous avons d'abord exécuté un test classique de viabilité cellulaire pendant 24 heures, dont les résultats concordent avec ceux d'une étude datant des années 80 effectuée sur des neutrophiles humains avec du des NP de TiO_2 qui était toutefois non nano-particulaire (Hedenborg 1988). Les NP de TiO_2 n'affectent pas la viabilité cellulaire, au contraire, ils semblent activer les PMN. En effet, les changements morphologiques observés suggèrent que le TiO_2 a le potentiel d'activer les PMN. Un changement morphologique implique qu'il doit y avoir réarrangement du cytosquelette. Or toutes les fonctions du neutrophile nécessitent un réarrangement du cytosquelette. En ce qui concerne les événements de phosphorylation, on constate une phosphorylation rapide des tyrosines et l'effet se maintient dans le temps. Ce test classiquement effectué indique l'acide aminé tyrosine est phosphorylé par un nombre important de kinases et est impliqué dans de nombreuses voies de signalisation. Après avoir effectué ces premières expériences, nous étions en mesure de dire que les NP de TiO_2 sont capables d'activer le neutrophile *in vitro*. Éventuellement, il sera intéressant d'évaluer l'effet du TiO_2 sur la polymérisation des filaments d'actine par exemple pour confirmer le réarrangement du cytosquelette.

Nous avons également investigué d'autres événements de phosphorylation, tels que la phosphorylation des MAPK p38 et ERK 1/2. Les MAPK sont des enzymes qui sont activées par plusieurs autres kinases et qui activent plusieurs facteurs de transcription en vue de déclencher des réponses au stress (Johnson, Moore et al. 1999). Elles jouent un rôle dans plusieurs fonctions du neutrophile, dont l'apoptose qu'ils régulent soit à la hausse, soit à la baisse. La MAPK p38 est un signal de survie qui est inactivé de façon transitoire durant l'apoptose spontanée (intrinsèque) et l'apoptose induite par la voie extrinsèque (Alvarado-Kristensson, Porn-Ares et al. 2001). La MAPK ERK½ est surtout

impliquée dans la croissance et la différentiation cellulaire (Binet and Girard 2008). La capacité du TiO_2 à fortement phosphoryler les MAPK est un indice probant que les NP de TiO_2 ont le potentiel de moduler les fonctions du neutrophile. Nous nous sommes donc intéressés à une de ses fonctions principales par la suite, soit l'apoptose.

Une inhibition de l'apoptose des PMN en fonction de la concentration de NP de TiO_2 était visible de façon évidente par cytologie. Ce résultat important qui montre que le TiO_2 retarde de façon significative l'apoptose du neutrophile, suggère que le TiO_2 peut perturber l'homéostasie. En effet, s'il y a inhibition de l'apoptose, il y a risque d'auto-inflammation causé par les réactifs oxygénés et les médiateurs d'inflammation que les neutrophiles peuvent libérer dans le milieu. Dans cette optique, nous avons décidé d'analyser l'expression d'une quarantaine de médiateurs d'inflammation à la suite d'une incubation des NTs avec le TiO_2 pendant 24 heures. La production d'IL-8, un puissant chimioattractant du neutrophile, fut fortement augmentée chez les NTs exposés au TiO_2. L'IL-8 induit la libération de calcium intracellulaire, qui est impliqué dans la production de ROS puisque les ions Ca^{2+} activent la NADPH oxidase. L'IL-8 active également diverses kinases impliquées dans plusieurs voies de signalisation. Il effectue son action attractante en se liant sur les récepteurs CXCR1 et CXCR2, fortement exprimés chez le neutrophile (Chakrabarti and Patel 2005). En perspective, il serait judicieux à l'avenir d'évaluer la production d'ions superoxides, en plus d'évaluer la production des filaments d'actine, pour jauger le potentiel activateur d'une NP quelconque. L'ensemble des effets pro-inflammatoires des NP de TiO_2 sur les NTs obtenus *in vitro*, démontrent que ces NP sont des agonistes puissants du neutrophile.

Pour vérifier le potentiel inflammatoire de cette NP *in vivo*, nous avons utilisé le modèle de la poche d'air murine. Avec ce modèle, on crée une poche d'air au niveau du dos de la souris, qui mimique un site inflammatoire. Il est facile ensuite d'y injecter le produit à tester et de retirer par la suite (à différents temps) les exsudats inflammatoires pour analyse subséquente. Nous avions trois objectifs pour ce volet du projet. Évaluer l'intensité de l'infiltration leukocytaire induite par le TiO_2, indentifier les types cellulaires

présents dans exsudats de la poche d'air et en troisième lieu, identifier et quantifier les médiateurs d'inflammation. (Davies, Stevens et al. 1992)
En ce qui concerne les leucocytes totaux, on constate que leur nombre est beaucoup plus important chez les souris dans lesquelles on a injecté du TiO_2 que chez les souris où on a injecté de la carragénine (CRGN) ou du tampon salin. Il est intéressant de noter que les deux agents utilisés (CRGN et TiO_2), qui sont tous deux pro-inflammatoires, provoquent une infiltration leucocytaire certes, mais dans le cas de la CRGN, elle se fait plus tardivement. En d'autres mots, les phases d'initiation, d'amplification et de résolution de l'inflammation n'ont pas lieu en même temps pour ces deux agents. Cela suggère que ces deux agents, ont des modes d'action différents. C'est en procédant à des études comparatives de ce genre, que nous pourrons, dans le cadre de la suite de ce projet, débuter des études mécanistiques.

Connaissant le rôle important du neutrophile dans l'inflammation, on a ensuite étudié les populations cellulaires qui étaient dans la poche d'air par cytométrie en flux et cytologie. Le TiO_2 attire préférentiellement les neutrophiles dans la poche d'air, contrairement à la CRGN, où il y a un plus grand équilibre entre cellules mononuclées et cellules granulocytaires (éosinophiles, neutrophiles). Une fois de plus, cela suggère un mode d'action différent pour ces deux agents pro-inflammatoires. De plus, ces résultats concordent avec nos résultats *in vitro*, qui ont démontré que les neutrophiles sont des cibles du TiO_2.

L'identification des facteurs solubles d'inflammation présents dans les fluides des poches d'air fut effectuée avec la même méthode de criblage que celle utilisée *in vitro*. À prime abord, on remarque que les NP de TiO_2 on un effet pléiotropique. Cela se manifeste par la production d'une panoplie de cytokines et chimiokines. Plus de 90% des facteurs détectés dans les poches d'air des souris TiO_2 à t = 3 heures, étaient présents dans un ratio$\geq$ 2. La différence entre les résultats de criblage *in vitro* et *in vivo* est peut-être relié au fait *qu'in vivo*, il n'y a pas que les neutrophiles qui sont incubés avec le TiO_2, ce qui expliquerait le plus grand nombre de facteurs d'inflammation aux concentrations élevés in vivo. Il y a également les cellules endothéliales qui tapissent l'intérieur de la poche d'air, les

macrophages, lymphocytes, etc. De plus, la grande quantité de cytokines et chimiokines dont la sécrétion à été induite par les NP de TiO_2 signifie que ces NP ont une activité pro-inflammatoire très complexe. Enfin, dans un but d'essayer de répondre d'ores et déjà aux questions reliées au mode d'action, on peut affirmer que les NP de TiO_2 agissent indirectement sur les neutrophiles. En effet, les molécules pro-inflammatoires apparaissent avant l'arrivée massive des leucocytes. Ainsi, il est possible que les facteurs d'attraction permettant l'infiltration leucocytaire, soient produits par les cellules qui tapissent la poche d'air, c'est-à-dire, les cellules résidentes.

L'objectif de la présente étude était d'étudier l'effet des NP sur le processus inflammatoire *in vitro* et *in vivo* et pour ce faire nous avons choisi de débuter notre étude avec une des NP les plus abondamment utilisées et étudiées, le TiO_2. *In vitro*, le TiO_2 a eu un effet notable sur la morphologie cellulaire des PMN ce qui suggérait dès le départ son potentiel activateur. Le TiO_2 a également induit des événements de phosphorylation, ce qui indiquait que ces NP avaient le potentiel de moduler une variété de fonctions cellulaires. Cela s'est avéré être le cas car les NP de TiO_2 ont permis l'inhibition de l'apoptose des PMN de façon concentration-dépendante et ont provoqué une augmentation de l'expression de médiateurs solubles pro-inflammatoires. *In vivo*, ces NP attirent des PMN en grande quantité au site inflammatoire (poche d'air) et elles attirent également, mais dans une moindre mesure, des cellules mononucléaires. De plus, cette infiltration leucocytaire se fait très rapidement après le traitement. La plupart des agents pro-inflammatoires ne provoquent pas une infiltration leucocytaire aussi rapide que celle provoquée par les NP de TiO_2. Enfin, l'administration des NP de TiO_2 dans la poche d'air a causé l'augmentation de l'expression d'une quantité importante de médiateurs pro-inflammatoires, incluant plusieurs chimiokines. Avec l'ensemble des résultats obtenus, nous révélons le caractère pro-inflammatoire que possèdent les NP de TiO_2 *in vitro* et *in vivo*.

En perspective, il serait envisageable de continuer à travailler sur ce projet avec le TiO_2 mais aussi avec d'autres NP. Également, il serait intéressant d'évaluer l'effet des NP sur d'autres fonctions du neutrophile telles que la phagocytose, la flambée oxydative, la

dégranulation, l'adhésion, etc. De plus, nous avons entamé des recherches dans le but de vérifier si le TiO_2 induit une synthèse protéique *de novo* importante, comme le font des agonistes naturels du PMN, le GM-CSF, l'IL-4, L'IL-15 ou encore comme le font certains agents chimiques comme le trioxide d'arsenic et le butyrate de sodium (Binet, Cavalli et al. 2006). Il est connu, que le neutrophile synthétise *de novo* des protéines telles que l'annexine I ou encore l'IL-1Rα par exemple. Pour y arriver, on pourrait utiliser des acides aminés (méthionine et cystéine) radioactifs (soufre 35) qui sont incorporés dans les protéines nouvellement synthétisées par les PMN. Il serait possible ensuite de séquencer les protéines dont la synthèse serait induite par la NP et ainsi approfondir nos connaissances sur son mode d'action. Nous pourrions également approfondir nos études *in vivo/in vitro* avec le TiO_2, en étudiant son effet sur les cellules résidentes (cellules présentes dans le site de la poche d'air, qui tapissent l'endothelium de la poche d'air, etc) de la poche d'air, parce qu'il n'y a pas que des cytokines et chimiokines typiques du neutrophile et des monocytes qui sont présents dans les exsudats provenant des poches d'air (exemple : IP-10, MIG, etc) (**voir article 2, fig. 4**). Pour y parvenir, nous pourrions procéder en injectant de la trypsine-EDTA dans les poches d'air. Il est possible ensuite de faire des tests *ex vivo* dans lesquels nous étudierons la réponse au TiO_2, de ces cellules (Ratthe, Ennaciri et al. 2009). Enfin, il serait également intéressant de débuter l'étude de l'interaction entre les NP et les PMN par microscopie électronique à transmission. Nous sommes conscients également, que des altérations physico-chimiques peuvent modifier l'état d'agglomération des NP lors des différentes expérimentations. Les NP ont l'habilité d'interagir avec la matière. Des agglomérats peuvent se former suite à des interactions avec l'agent solubilisant, les protéines, les composantes de la matrice extracellulaire, etc. Ces altérations physico-chimiques ont pour effet de générer une NP aux propriétés et caractéristiques totalement nouvelles qui peuvent engendrer des réponses complètement différentes chez les organismes (Bellucci, 2009). Pour ces raisons, il est également pertinent d'examiner l'état d'agglomération des NP en s'assurant de caractériser ces dernières avant d'effectuer les divers tests portant sur leur effet sur le processus inflammatoire. Ce travail sera poursuivit dans le cadre des mes travaux de doctorat.

En fonction des résultats obtenus dans le cadre de ce projet, nous sommes en mesure de considérer les NP de TiO_2 comme étant pro-inflammatoires. Nous avons élaboré une procédure pour étudier les effets des NP sur l'inflammation et nous allons l'utiliser pour évaluer l'effet d'autres NP. L'objectif global du projet est d'éventuellement établir un classement des NP selon leur potentiel inflammatoire, ce qui serait un outil pertinent pour le développement de nanoparticules pour utilisation in vivo. De plus, ce projet fournira dans son ensemble des éléments de réponse aux questions liées au comportement des NP d'une même classe ainsi qu'à l'influence de leur diamètre sur leur effet.

Bibliographie

Abbas A. K., L. A. H., Pillai S. (2007). Cellular and molecular immunology. Philadelphie.

Alam, R., D. Kumar, D. Anderson-Walters and P. A. Forsythe (1994). "Macrophage inflammatory protein-1 alpha and monocyte chemoattractant peptide-1 elicit immediate and late cutaneous reactions and activate murine mast cells in vivo." J Immunol **152**(3): 1298-1303.

Allouni, Z. E., M. R. Cimpan, P. J. Høl, T. Skodvin and N. R. Gjerdet (2009). "Agglomeration and sedimentation of TiO2 nanoparticles in cell culture medium." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **68**(1): 83-87.

Alvarado-Kristensson, M., M. I. Porn-Ares, S. Grethe, D. Smith, L. M. Zheng and T. Andersson (2001). "p38 mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase activities have opposite effects on human neutrophil apoptosis." Faseb Journal **15**(13): 129-+.

Baggs, R. B., J. Ferin and G. Oberdorster (1997). "Regression of pulmonary lesions produced by inhaled titanium dioxide in rats." Vet Pathol **34**(6): 592-597.

Bellucci (2009). Nanoparticles and Nanodevices in Biological Applications. Frascati (RM), Italy.

Binet, F., H. Cavalli, E. Moisan and D. Girard (2006). "Arsenic trioxide (AT) is a novel human neutrophil pro-apoptotic agent: effects of catalase on AT-induced apoptosis, degradation of cytoskeletal proteins and de novo protein synthesis." British Journal of Haematology **132**(3): 349-358.

Binet, F., S. Chiasson and D. Girard (2010) "Interaction between arsenic trioxide (ATO) and human neutrophils." Human & Experimental Toxicology.

Binet, F., S. Chiasson and D. Girard (2010). "Evidence that endoplasmic reticulum (ER) stress and caspase-4 activation occur in human neutrophils." Biochemical and Biophysical Research Communications **391**(1): 18-23.

Binet, F. and D. Girard (2008). "Novel human neutrophil agonistic properties of arsenic trioxide: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase and/or c-jun NH2-terminal MAPK but not extracellular signal-regulated kinases-1/2." J Leukoc Biol **84**(6): 1613-1622.

Binet F., G. D. (2009). "The Anticancer Drug Arsenic Trioxide is an Important Neutrophil Agonist." Recent Advances and Research Updates **9**(2): 103-110.

Borregaard, N. and J. B. Cowland (1997). "Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte." Blood **89**(10): 3503-3521.

Cassatella, M. A. (1995). "The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils." Immunology Today **16**(1): 21-26.

Chakrabarti, S. and K. D. Patel (2005). "Regulation of matrix metalloproteinase-9 release from IL-8-stimulated human neutrophils." J Leukoc Biol **78**(1): 279-288.

Chen, J., X. Dong, J. Zhao and G. Tang (2009). "In vivo acute toxicity of titanium dioxide nanoparticles to mice after intraperitioneal injection." Journal of Applied Toxicology **29**(4): 330-337.

Chen, J., X. Dong, J. Zhao and G. Tang (2009). "In vivo acute toxicity of titanium dioxide nanoparticles to mice after intraperitioneal injection." J Appl Toxicol **29**(4): 330-337.

Cook, D. N. (1996). "The role of MIP-1α in inflammation and hematopoiesis." Journal of Leukocyte Biology **59**(1): 61-66.

Damge, C., C. P. Reis and P. Maincent (2008). "Nanoparticle strategies for the oral delivery of insulin." Expert Opinion on Drug Delivery **5**(1): 45-68.

Davies, D. E., A. J. Stevens and J. B. Houston (1992). "Use of the Rat Air Pouch Model of Inflammation to Evaluate Regional Drug Delivery." Agents and Actions: C109-C111.

DeFranco L., L. R. M., Robertson M. (2007). Immunity: The Immune Response in Infectious and Inflammatory Disease. London UK, New Science Press Ltd. .

Driscoll, K. E., R. C. Lindenschmidt, J. K. Maurer, J. M. Higgins and G. Ridder (1990). "Pulmonary response to silica or titanium dioxide: inflammatory cells, alveolar macrophage-derived cytokines, and histopathology." American journal of respiratory cell and molecular biology **2**(4): 381-390.

Dubus, J. C., E. Bosdure, M. David and N. Stremler-Lebel (2010). "Nanoparticules et santé." Archives de Pédiatrie **17**(6): 600-601.

Dunford, R., A. Salinaro, L. Cai, N. Serpone, S. Horikoshi, H. Hidaka and J. Knowland (1997). "Chemical oxidation and DNA damage catalysed by inorganic sunscreen ingredients." FEBS Letters **418**(1-2): 87-90.

EPA-Nanotechnology-White-Paper (2007). Nanotechnology White Paper. U. S. E. P. A. (EPA). Washington**:** 120p.

Fabian, E., R. Landsiedel, L. Ma-Hock, K. Wiench, W. Wohlleben and B. Van Ravenzwaay (2008). "Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in rats." Archives of Toxicology **82**(3): 151-157.

Fabian, I., Y. Kletter, S. Mor, C. Geller-Bernstein, M. Ben-Yaakov, B. Volovitz and D. W. Golde (1992). "Activation of human eosinophil and neutrophil functions by haemotopoietic growth factors: Comparison of IL-1, IL-3, IL-5 and GM-CSF." British Journal of Haematology **80**(2): 137-143.

Feldmann, M. and S. R. N. Maini (2008). "Role of cytokines in rheumatoid arthritis: An education in pathophysiology and therapeutics." Immunological Reviews **223**(1): 7-19.

Ferin, J., G. Oberdorster and D. P. Penney (1992). "Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats." Am J Respir Cell Mol Biol **6**(5): 535-542.

Fischer, H. C. and W. C. Chan (2007). "Nanotoxicity: the growing need for in vivo study." Current Opinion in Biotechnology **18**(6): 565-571.

Garcia-Ramallo, E., T. Marques, N. Prats, J. Beleta, S. L. Kunkel and N. Godessart (2002). "Resident cell chemokine expression serves as the major mechanism for leukocyte recruitment during local inflammation." Journal of Immunology **169**(11): 6467-6473.

Gauthier, M., C. J. Roberge, M. Pelletier, P. A. Tessier and D. Girard (2001). "Activation of human neutrophils by technical toxaphene." Clinical Immunology **98**(1): 46-53.

Girard, D. (2007). Phenotypic and Functional changes of neutrophils activated by recently identified modulators. Kerala, India, Research Signpost.

Goncalves, D. M., S. Chiasson and D. Girard (2010). "Activation of human neutrophils by titanium dioxide (TiO2) nanoparticles." Toxicol In Vitro **24**(3): 1002-1008.

Grassian, V. H., T. O'Shaughnessy P, A. Adamcakova-Dodd, J. M. Pettibone and P. S. Thorne (2007). "Inhalation exposure study of titanium dioxide nanoparticles with a primary particle size of 2 to 5 nm." Environ Health Perspect **115**(3): 397-402.

Hamilton, R., N. Wu, D. Porter, M. Buford, M. Wolfarth and A. Holian (2009). "Particle length-dependent titanium dioxide nanomaterials toxicity and bioactivity." Particle and Fibre Toxicology **6**(1): 35.

Hart, S. P., J. A. Ross, K. Ross, C. Haslett and I. Dransfield (2000). "Molecular characterization of the surface of apoptotic neutrophils: implications for functional downregulation and recognition by phagocytes." Cell Death Differ **7**(5): 493-503.

Hedenborg, M. (1988). "Titanium dioxide induced chemiluminescence of human polymorphonuclear leukocytes." Int Arch Occup Environ Health **61**(1-2): 1-6.

Homburg, C. H., M. de Haas, A. E. von dem Borne, A. J. Verhoeven, C. P. Reutelingsperger and D. Roos (1995). "Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro." Blood **85**(2): 532-540.

House R., D. J. (2007). Cytokines in human health. Totowa, (NJ), humana press.

Huynh, M. L. N., V. A. Fadok and P. M. Henson (2002). "Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-β1 secretion and the resolution of inflammation." Journal of Clinical Investigation **109**(1): 41-50.

Jin, C. Y., B. S. Zhu, X. F. Wang and Q. H. Lu (2008). "Cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in mouse fibroblast cells." Chemical Research in Toxicology **21**(9): 1871-1877.

Johnson, J. L., E. E. Moore, D. A. Partrick, D. Y. Tamura, G. Zallen, D. J. Elzi and C. C. Silliman (1999). "Extracellular signal-related kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase pathways serve opposite roles in neutrophil cytotoxicity." Arch Surg **134**(10): 1074-1078.

Kandlikar, M., G. Ramachandran, A. Maynard, B. Murdock and W. A. Toscano (2007). "Health risk assessment for nanoparticles: A case for using expert judgment." Journal of Nanoparticle Research **9**(1): 137-156.

Kaplanski, G., V. Marin, F. Montero-Julian, A. Mantovani and C. Farnarier (2003). "IL-6: A regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation." Trends in Immunology **24**(1): 25-29.

Kuby J, G. R. A., Osborne B A, Kindt T J (2000). Immunologie. New York (NY), W.H. Freeman and Company.

Lagraoui, M. and L. Gagnon (1997). "Enhancement of human neutrophil survival and activation by TGF-beta 1." Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France) **43**(3): 313-318.

Lavastre, V., H. Cavalli, C. Ratthe and D. Girard (2004). "Anti-inflammatory effect of Viscum album agglutinin-I (VAA-I): Induction of apoptosis in activated neutrophils and inhibition of lipopolysaccharide-induced neutrophilic inflammation in vivo." Clinical and Experimental Immunology **137**(2): 272-278.

Li, P., D. Nijhawan, I. Budihardjo, S. M. Srinivasula, M. Ahmad, E. S. Alnemri and X. Wang (1997). "Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-

1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade." Cell **91**(4): 479-489.

Liao, C. M., Y. H. Chiang and C. P. Chio (2008). "Model-based assessment for human inhalation exposure risk to airborne nano/fine titanium dioxide particles." Science of the Total Environment **407**(1): 165-177.

Luo, H. R. and F. Loison (2008). "Constitutive neutrophil apoptosis: Mechanisms and regulation." American Journal of Hematology **83**(4): 288-295.

Moisan, E., S. Chiasson and D. Girard (2007). "The intriguing normal acute inflammatory response in mice lacking vimentin." Clin Exp Immunol **150**(1): 158-168.

Mollinedo, F., N. Borregaard and L. A. Boxer (1999). "Novel trends in neutrophil structure, function and development." Immunology Today **20**(12): 535-537.

Nader D, S. J. (october 2008). "Neutrophilia." Retrieved august 20th, 2010, from http://emedicine.medscape.com/article/208576-overview.

National Cancer Institute (2004). "Cancer Nanotechnology. Going small for big advancements."

National Institute for Occupational Safety and Health (2005). Evaluation of Health Hazards and Recommendations for Occupational Exposure to Titanium Dioxide**:** 120p.

Nel, A., T. Xia, L. Mädler and N. Li (2006). "Toxic potential of materials at the nanolevel." Science **311**(5761): 622-627.

O'Gorman M. R., D. D. (2008). Handbook of human immunology. Boca Raton (FL).

Oberdorster, G., J. Ferin, R. Gelein, S. C. Soderholm and J. Finkelstein (1992). "Role of the alveolar macrophage in lung injury: studies with ultrafine particles." Environ Health Perspect **97**: 193-199.

Oberdorster, G., J. Ferin and B. E. Lehnert (1994). "Correlation between Particle-Size, in-Vivo Particle Persistence, and Lung Injury." Environmental Health Perspectives **102**: 173-179.

Oberdorster, G., E. Oberdorster and J. Oberdorster (2005). "Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles." Environ Health Perspect **113**(7): 823-839.

Oberdörster, G., E. Oberdörster and J. Oberdörster (2005). "Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles." Environmental Health Perspectives **113**(7): 823-839.

Ostiguy, C. (2004). "Les nanoparticules: connaissances actuelles sur les risques et les mesures de prévention en santé et en sécurité du travail." irsst: 79.

Ostiguy, C. (2006). IRSST-Les effets à la santé reliés aux nanoparticules Montréal, institut de Recherche Robert-Sauvé en santé et sécurité au travail 55.

Paunesku, T., T. Rajh, G. Wiederrecht, J. Maser, S. Vogt, N. Stojićević, M. Protić, B. Lai, J. Oryhon, M. Thurnauer and G. Woloschak (2003). "Biology of TiO2-oligonucleotide nanocomposites." Nature Materials **2**(5): 343-346.

Pelletier, M., A. Bouchard and D. Girard (2004). "In vivo and in vitro roles of IL-21 in inflammation." J Immunol **173**(12): 7521-7530.

Pelletier, M. and D. Girard (2005). "Interleukin-15 increases neutrophil adhesion onto human respiratory epithelial A549 cells and attracts neutrophils in vivo." Clinical and Experimental Immunology **141**(2): 315-325.

Pelletier, M. and D. Girard (2007). "Biological functions of interleukin-21 and its role in inflammation." ScientificWorldJournal **7**: 1715-1735.

Pelletier, M., C. J. Roberge, M. Gauthier, K. Vandal, P. A. Tessier and D. Girard (2001). "Activation of human neutrophils in vitro and dieldrin-induced neutrophilic inflammation in vivo." Journal of Leukocyte Biology **70**(3): 367-373.

Quinn, M. T. and K. A. Gauss (2004). "Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: Comparison with nonphagocyte oxidases." Journal of Leukocyte Biology **76**(4): 760-781.

Ratthe, C., J. Ennaciri, D. M. Garces Goncalves, S. Chiasson and D. Girard (2009). "Interleukin (IL)-4 induces leukocyte infiltration in vivo by an indirect mechanism." Mediators Inflamm : 193970.

Ratthe, C., J. Ennaciri, D. M. G. Goncalves, S. Chiasson and D. Girard (2009). "Interleukin (IL)-4 Induces Leukocyte Infiltration In Vivo by an Indirect Mechanism." Mediators of Inflammation

Rossi, E. M., L. Pylkkänen, A. J. Koivisto, M. Vippola, K. A. Jensen, M. Miettinen, K. Sirola, H. Nykäsenoja, P. Karisola, T. Stjernvall, E. Vanhala, M. Kiilunen, P. Pasanen, M. Mäkinen, K. Hämeri, J. Joutsensaari, T. Tuomi, J. Jokiniemi, H. Wolff, K. Savolainen, S. Matikainen and H. Alenius (2009). "Airway exposure to silica-coated TiO2 nanoparticles induces pulmonary neutrophilia in mice." Toxicological Sciences **113**(2): 422-433.

Rottman, J. B. (1999). "Key role of chemokines and chemokine receptors in inflammation, immunity, neoplasia, and infectious disease." Vet Pathol **36**(5): 357-367.

Santos-Beneit, A. M. and F. Mollinedo (2000). "Expression of genes involved in initiation, regulation, and execution of apoptosis in human neutrophils and during neutrophil differentiation of HL-60 cells." J Leukoc Biol **67**(5): 712-724.

Serhan C, W. P., Gilroy D (2010). Fundamentals of inflammation. New York, NY (USA), Cambridge University Press.

Shirai, Y., A. J. Osgood, Y. Zhao, K. F. Kelly and J. M. Tour (2005). "Directional Control in Thermally Driven Single-Molecule Nanocars." Nano Letters **5**(11): 2330-2334.

Simon, H. U. (2003). "Neutrophil apoptosis pathways and their modifications in inflammation." Immunological Reviews **193**: 101-110.

Sin, Y. M., A. D. Sedgwick, E. P. Chea and D. A. Willoughby (1986). "Mast cells in newly formed lining tissue during acute inflammation: A six day air pouch model in the mouse." Annals of the Rheumatic Diseases **45**(10): 873-877.

Sin, Y. M. and M. K. Wong (1992). "Effect of sodium aurothiomalate on carrageenan induced inflammation of the air pouch in mice." Ann Rheum Dis **51**(1): 112-116.

Singh, S., T. Shi, R. Duffin, C. Albrecht, D. van Berlo, D. Höhr, B. Fubini, G. Martra, I. Fenoglio, P. J. A. Borm and R. P. F. Schins (2007). "Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO2: Role of the specific surface area and of surface methylation of the particles." Toxicology and Applied Pharmacology **222**(2): 141-151.

Sohaebuddin, S., P. Thevenot, D. Baker, J. Eaton and L. Tang (2010). "Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent." Particle and Fibre Toxicology **7**(1): 22.

Stephano, B. (2009). Nanoparticles and Nanodevices in Biological Applications. Frascati (RM), Italy.

The Royal Society and The Royal Academy of engineering (2004). Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties**:** 127p.

Tryphonas H., F. M., Blakley B., Smits J., Brousseau P. (2005). Investigative immunotoxicology. Boca Raton (FL).

Vigil, S. V. G., R. de Liz, Y. S. Medeiros and T. S. Fröde (2008). "Efficacy of tacrolimus in inhibiting inflammation caused by carrageenan in a murine model of air pouch." Transplant Immunology **19**(1): 25-29.

Webster, T. J. (2009). Safety of Nanoparticles. Providence, RI, springer.

Webster, T. J. (2009). Safety of Nanoparticles: From Manufacturing to medical applications. Providence (RI), USA.

Wolpe, S. D., G. Davatelis, B. Sherry, B. Beutler, D. G. Hesse, H. T. Nguyen, L. L. Moldawer, C. F. Nathan, S. F. Lowry and A. Cerami (1988). "Macrophages secrete a novel heparin-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties." J Exp Med **167**(2): 570-581.

Wu, J., W. Liu, C. Xue, S. Zhou, F. Lan, L. Bi, H. Xu, X. Yang and F. D. Zeng (2009). "Toxicity and penetration of TiO2 nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure." Toxicol Lett **191**(1): 1-8.

Wu, J., W. Liu, C. Xue, S. Zhou, F. Lan, L. Bi, H. Xu, X. Yang and F. D. Zeng (2009). "Toxicity and penetration of TiO₂ nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure." Toxicology Letters **191**(1): 1-8.

Zheng, Y. and L. Sanche (2009). "Gold nanoparticles enhance DNA damage induced by anti-cancer drugs and radiation." Radiat Res **172**(1): 114-119.

Annexe

Cette section contient le résumé en anglais d'un article sur l'interleukine-4. J'ai participé aux expériences *in vivo* de cette étude1. Plus précisément, j'ai utilisé le modèle de poche d'air murine pour évaluer l'inflammation chez des souris CCL2 (chémokine MCP-1) knockout suite à l'injection d'agonistes (Il-4, LPS, solution saline).

Hindawi Publishing Corporation
Mediators of Inflammation
Volume 2009, Article ID 193970, 10 pages
doi:10.1155/2009/193970

Interleukin (IL)-4 Induces Leukocyte Infiltration In Vivo by an Indirect Mechanism

Claude Ratthée, Jamila Ennaciri, David M. Garcês Gonçalves, Sonia Chiasson, and Denis Girard
INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, Québec, Canada H7V 1B7
Received 19 February 2009; Accepted 23 June 2009

Interleukin (IL)-4 is a cytokine known mainly for its anti-inflammatory activity. Using the in vivo murine air pouch model, we found that IL-4 significantly increased the number of leukocytes after 9 hours of treatment, consisting mainly of neutrophil (60%) and monocytic (40%) cell populations. Using an antibody array, we found that the expression of several analytes (predominantly CCL2) was increased by IL-4 before the arrival of leukocytes. The IL-4-induced expression of CCL-2 was confirmed by ELISA. Air pouch resident lining cells were harvested and were found to express IL-4Rα. CCL2 mRNA expression was monitored in lining cells, cells isolated from the air pouch skin, in RAW264.7 macrophage and in epithelial Mode-K cells and its expression was increased in response to IL-4 in all conditions. We conclude that IL-4 can attract leukocytes in vivo by an indirect mechanism involving the production of several analytes by, at least, resident cells.

Copyright © 2009 Claude Ratthée et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Acknowledgments
This study was partly supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; MOP-89534) and Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). CR holds a PhD Canada Graduate Scholarships Doctoral Award, JE holds a Fondation Armand-Frappier Post-doctoral award and DG is a Scholar from FRSQ. They thank Mary Gregory for reading this manuscript.