

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**ÉVALUATION DE LA TOXICITÉ PULMONAIRE DE L'OZONE, DES
NANOPARTICULES DE DIOXYDE DE TITANE ET DES VAPEURS
D'ÉTHANOL DANS UN MODÈLE ANIMAL D'ASTHME ALLERGIQUE**

Par

Andrea Scarino, M.Sc.

Thèse présentée pour l'obtention du grade
de Philosophiae doctor (Ph.D.) en Biologie

Jury d'évaluation

Président du jury et
Examineur interne

Denis Girard
INRS-IAF

Examineur externe

James G. Martin
McGill

Examineur externe

André Dufresne
Université de Montréal

Directeur de recherche

Michel Charbonneau,
INRS-IAF

Codirecteur de recherche

Robert Tardif
Université de Montréal

RÉSUMÉ

L'éthanol est de plus en plus utilisé dans l'essence dans le but de réduire les émissions de gaz à effet de serre des véhicules. Quoique cette initiative puisse être profitable pour l'environnement, elle est susceptible d'exposer les populations de façon involontaire par voie d'inhalation à des concentrations croissantes de vapeurs d'éthanol. L'état actuel des connaissances sur la toxicité de l'éthanol et ses sous-produits de combustion rend difficile toute évaluation des risques pour la santé humaine que pose l'utilisation croissante de carburants additionnés d'éthanol. On peut également se demander si la présence d'une condition pathologique pulmonaire, telle l'asthme allergique qui touche 270 millions de personnes mondialement, pourrait rendre ces personnes plus vulnérables vis-à-vis la toxicité pulmonaire induite par des vapeurs d'éthanol. Il existe aussi d'autres contaminants atmosphériques, notamment l'ozone et les nanoparticules, qui sont reconnus pour causer de l'inflammation pulmonaire. L'ozone, un irritant pulmonaire important, est présent au niveau du sol étant principalement généré par le trafic routier, et il constitue par conséquent un danger pour la population. Les nanoparticules, et particulièrement les nanoparticules de synthèse, sont des contaminants environnementaux dont l'impact sanitaire est difficile à caractériser et, par conséquent, pratiquement inconnu à ce jour malgré leur utilisation croissante. Pour compliquer les choses, les rares études sur cette question ont produit des résultats parfois contradictoires quant aux effets pulmonaires de l'inhalation de nanoparticules de dioxyde de titane (nano-TiO₂) chez les asthmatiques.

Le présent projet vise à étudier la réponse inflammatoire pulmonaire suite à l'inhalation d'éthanol, de nano-TiO₂, d'ozone ou d'un mélange éthanol-ozone chez un modèle expérimental d'asthme, soit le rat Brown Norway sensibilisé à l'ovalbumine. En variant la concentration de l'allergène ovalbumine (0,1 à 5%) lors des provocations, nous avons sélectionné une concentration (1.5% causant environ 30% de l'effet maximal) permettant de mesurer une modulation à la hausse ou à la baisse de la réponse allergique consécutive à l'exposition aux contaminants. Des lavages bronchoalvéolaires (BAL) réalisés à différents temps suivant la provocation (6-72 h) ont permis de déterminer le moment auquel les leucocytes, notamment les éosinophiles, atteignent un nombre maximal (48 h). Le contenu et le niveau relatif de plusieurs cytokines a été mesuré dans le surnageant des BAL et dans le plasma. À 6, 24, 36, 48 et 72 h suivant la provocation, aucune différence significative dans le

nombre total de leucocytes, ni dans le compte d'éosinophiles, n'a été observée chez les rats exposés à l'éthanol seul (6 h/jour pendant 14 jours à 3000 ppm) comparativement à des rats témoins asthmatiques.

Une exposition unique aux nanoparticules de TiO_2 (9.35 mg/m^3) a causé une réduction du nombre de leucocytes, dont les éosinophiles, dans les BAL prélevés immédiatement à la fin d'une exposition de 6 h (48 h suivant la provocation allergénique). Les niveaux d'IL-4, d'IL-6 et de IFN- γ dans le plasma ou dans les BAL étaient diminués chez les rats traités avec les nano- TiO_2 . Pour ce qui est des expositions à l'ozone, seul ou en présence d'éthanol, aucune différence significative n'a été observée au niveau de l'inflammation pulmonaire lorsque les BAL étaient effectués 24 h suivant la dernière exposition (48 h suivant la provocation allergénique) à 0,4 ppm pendant 3 d (4 h/d). Une baisse significative a cependant été observée pour des expositions à 1 ppm d'ozone selon divers scénarios d'expositions uniques ou répétées (allant de 1 jour avant le déclenchement de la réponse asthmatique jusqu'à deux jours après la provocation à l'allergène). Il est à noter que l'exposition à l'ozone a par contre causé une augmentation de la contractilité maximale de la trachée chez ces rats. La concentration plasmatique de MCP-1 ainsi que les niveaux de TNF- α , MIP-3 α et IL-13 dans les BAL étaient diminués comparativement à ceux chez les rats asthmatiques exposés à l'air. Ces réductions de l'inflammation ont aussi été confirmées par analyse histologique des poumons.

Au plan sanitaire, ces données suggèrent que la contamination de l'air urbain par des vapeurs d'éthanol provenant de l'essence est peu susceptible d'exacerber l'asthme allergique. Chez les rats souffrant d'une réaction asthmatique, la réduction de l'inflammation pulmonaire causée par l'inhalation d'ozone ou de nano- TiO_2 est une observation qui ouvre la voie à l'étude de mécanismes anti-inflammatoires pulmonaires.

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, Dr Michel Charbonneau, d'avoir eu confiance en moi pour porter à terme ce projet. Ton grand positivisme, ton sens de l'humour toujours présent et tes conseils précieux m'ont permis de passer à travers des défis qui semblaient à prime abord insurmontables.

Je tiens également à remercier mon codirecteur de recherche, Dr Robert Tardif, de m'avoir guidé depuis le début de mes travaux de recherche...il y a plus de 8 ans déjà! Votre calme, votre gentillesse, votre respect exemplaire des étudiants et votre passion pour la recherche ont été sans aucun doute la bougie d'allumage dans la poursuite de mes études.

À notre très précieux collaborateur, Dr Paolo Renzi, merci pour son aide et ses conseils. Vos connaissances, votre sagesse et surtout, votre grande disponibilité m'ont permis de progresser avec confiance du début à la fin. Je n'oublierai jamais ce que vous avez fait pour moi, autant au niveau personnel que professionnel. Vous êtes un vrai gentleman!

Merci à Guylaine Lassonde, technicienne du Dr Charbonneau, pour tout son aide...surtout lors des jours de sacrifices! Les longues journées passées ensemble au laboratoire resteront à jamais gravées dans mon cerveau.

Je désire également remercier Ginette Charest-Tardif, femme et technicienne du Dr Tardif, d'avoir toujours été disponible et d'avoir eu la patience de m'apprendre plusieurs techniques indispensables à la réussite des mes projets.

Merci également à Alexandra Noël de m'avoir aidé et guidé lors des expériences sur les nanoparticules. Ses connaissances et sa compétence dans le domaine ont été grandement utiles...surtout lors des complications techniques!

Merci à mes amis, Dario, Gian Carlo et Marco pour leur support et pour les innombrables et beaux moments passés ensemble. Votre réussite scolaire et professionnelle m'ont motivé à vouloir toujours aller plus loin. Patience...le Cohiba Behike s'en vient!

Au Dr Jean-Louis Fortin, mon mentor depuis l'enfance, merci de m'avoir guidé et encouragé à toujours viser plus haut. Tu as cru en mes capacités depuis mes débuts à l'école et tu étais toujours présent lors de la prise de décisions importantes. Cette thèse est la preuve que tes conseils m'ont mené sur la bonne voie!

Je ne sais comment remercier mon oncle et ma tante, Giuseppe et Maria Parretta, pour avoir été comme des deuxièmes parents pour moi. Vous étiez présents non seulement lors des beaux moments dans ma vie, mais surtout lors des temps plus difficiles nécessitant votre support. Vous êtes des personnes d'une grande rareté!

À mon amour, Teresa, merci d'avoir toujours été là pour me supporter dans les bons moments comme dans les pires. I could always count on your love, tenderness, and your words of encouragements to help me get through all the long days spent at the lab and the many stressful moments throughout this incredible journey. Thank you for being there...and for being so patient!

Enfin, un merci du fond du coeur à mes parents, Venerando et Anna, pour avoir fait tous les sacrifices nécessaires dans le but d'assurer la réussite de leurs enfants. Leur amour inconditionnel et les valeurs qu'ils m'ont transmises ont pavé la voie qui m'a mené jusqu'au plus haut grade universitaire. Il n'y a aucun doute que je dois le succès de mes études à ces deux personnes extraordinaires. Merci infiniment...mission presque accomplie!

TABLE DES MATIÈRES

PAGE TITRE	I
RÉSUMÉ	II
REMERCIEMENTS	IV
TABLE DES MATIÈRES	VI
LISTE DES FIGURES	IX
LISTE DES ABRÉVIATIONS	X
CONTEXTE ET PROBLÉMATIQUE	1
PREMIÈRE PARTIE : REVUE DE LA LITTÉRATURE	3
SECTION 1: RÉACTION ASTHMATIQUE.....	4
1.1. ASTHME: LA MALADIE	4
1.1.1 Classification	4
1.1.2. Symptômes	4
1.2. RÉACTION D'HYPERSENSIBILITÉ DE TYPE I	6
1.3. RÉPONSE INITIALE DE LA RÉACTION ASTHMATIQUE	6
1.4. RÉPONSE TARDIVE DE LA RÉACTION ASTHMATIQUE.....	7
1.5. CELLULES ET MÉDIATEURS IMPLIQUÉS DANS LA RÉACTION INFLAMMATOIRE ASTHMATIQUE	8
1.6. LES MODÈLES EXPÉRIMENTAUX D'ASTHME ALLERGIQUE	13
SECTION 2: DONNÉES GÉNÉRALES SUR LES VAPEURS D'ÉTHANOL	15
2.1. CINÉTIQUE DE L'ÉTHANOL DANS L'ORGANISME.....	15
2.2. TOXICITÉ DE L'INHALATION D'ÉTHANOL.....	17
2.3. RÉACTION ASTHMATIQUE INDUITE PAR L'EXPOSITION À DES VAPEURS D'ÉTHANOL	19
SECTION 3: DONNÉES GÉNÉRALES SUR LES NANOPARTICULES.....	20
3.1. SOURCES : NATURELLES ET ANTHROPOGÉNIQUES	20
3.2. CARACTÉRISATION : TYPE, TAILLE, COMPOSITION ET FORME	20
3.3. CINÉTIQUE DES PARTICULES DANS L'ORGANISME.....	22
3.4. TOXICITÉ PULMONAIRE DES PUF/NANOPARTICULES.....	23
3.5. TOXICITÉ DES PUF/NANOPARTICULES CHEZ LES ASTHMATIQUES	26

3.6. MÉCANISMES DE TOXICITÉ DES PUF/NANOPARTICULES.....	28
SECTION 4: DONNÉES GÉNÉRALES SUR L'OZONE	30
4.1. QU'EST-CE QUE L'OZONE ?.....	30
4.2. TOXICITÉ PULMONAIRE DE L'OZONE : ÉTUDES ÉPIDÉMIOLOGIQUES.....	31
4.3. TOXICITÉ PULMONAIRE DE L'OZONE : ÉTUDES EXPÉRIMENTALES CHEZ L'ÊTRE HUMAIN	33
4.4. TOXICITÉ PULMONAIRE DE L'OZONE : ÉTUDES EXPÉRIMENTALES CHEZ LES ANIMAUX ...	35
4.5. MÉCANISMES DE TOXICITÉ PULMONAIRE DE L'OZONE	38
HYPOTHÈSES DE RECHERCHE	39
DEUXIÈME PARTIE : PRÉSENTATION DES ARTICLES.....	40
SECTION 1: IMPACT OF EMERGING POLLUTANTS ON PULMONARY INFLAMMATION IN ASTHMATIC RATS: ETHANOL VAPORS AND AGGLOMERATED TIO ₂ NANOPARTICLES	41
1.1. RÉSUMÉ FRANÇAIS DE L'ARTICLE	41
1.2. CONTRIBUTION DE L'ÉTUDIANT	42
SECTION 2: OZONE, ALONE OR IN COMBINATION WITH ETHANOL, ATTENUATES ALLERGEN-INDUCED PULMONARY INFLAMMATION IN A RAT MODEL OF ALLERGIC ASTHMA	84
2.1. RÉSUMÉ FRANÇAIS DE L'ARTICLE	84
2.2. CONTRIBUTION DE L'ÉTUDIANT	85
TROISIÈME PARTIE : DISCUSSION ET CONCLUSIONS	121
MISE AU POINT DU MODÈLE D'ASTHME ALLERGIQUE.....	122
LES OBSERVATIONS POUR LES VAPEURS D'ÉTHANOL.....	124
LES OBSERVATIONS POUR L'INHALATION D'OZONE.....	125
LES OBSERVATIONS POUR L'INHALATION DES NANO-TiO ₂	127
LES MÉCANISMES POSSIBLES DE LA RÉDUCTION DE L'INFLAMMATION PAR LES POLLUANTS ATMOSPHÉRIQUES CHEZ LE RAT ASTHMATIQUE.....	129
CONCLUSION GÉNÉRALE	133
RETOMBÉES ET RECOMMANDATIONS.....	133
CONTRIBUTION ORIGINALE À L'AVANCEMENT DES CONNAISSANCES.....	134
BIBLIOGRAPHIE	137

ANNEXE 1	155
----------------	-----

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Cinétique inflammatoire pulmonaire de la réaction asthmatique en fonction du temps.....	124
Figure 2: Représentation schématique d'une diminution de l'inflammation pulmonaire asthmatique, à travers une réduction du nombre de macrophages, causée par l'exposition à l'ozone ou aux nano-TiO ₂	133
Annexe: Niveaux d'endothéline plasmatique mesurée par « Matrix-assisted laser desorption / ionisation-time of flight » (MALDI-TOF), une méthode de spectrométrie de masse utilisée couramment pour déterminer les niveaux d'oligonucléotides. Les animaux étaient exposés à 1 ppm d'ozone durant 3 jours (4 h/d)	156

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACGIH:	American Conference of Governmental Industrial Hygienists
ADH:	Alcool déshydrogénase
ALDH2:	Aldéhyde déshydrogénase de type 2
BAL:	Lavage bronchoalvéolaire
BN:	Brown Norway
CMH:	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA:	Cellule présentatrice de l'antigène
CVF:	Capacité vitale forcée
Cys-LT1:	Cystéinyl leucotriène 1
CYP2E1:	Cytochrome P-450 2E1
E10:	Mélange 10% éthanol et 90% essence
ECP:	Protéine cationique des éosinophiles
EEAG:	Esters éthyliques d'acides gras
EPO:	Peroxydase des éosinophiles
ERO:	Espèce réactive de l'oxygène
EtOH:	Éthanol
FcεRI :	Récepteur membranaire de l'IgE
FVC:	Forced vital capacity
G-CSF:	Granulocyte-colony stimulating factor
GES:	Gaz à effet de serre
GM-CSF:	Granulocyte macrophage-Colony stimulating factor
ICAM:	Intercellular adhesion molecule-1
IFN:	Interféron
IgE:	Immunoglobuline E

IL: Interleukine

IRSST: Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail

MAPK: Mitogen-activated protein kinase

MBP: Protéine basique majeure

MCP-1: Monocytes chemoattractant protein 1

MEOS: Microsomal ethanol oxidizing system

MPOC: Maladie pulmonaire obstructive chronique

NAAQS: National Ambient Air Quality Standards

Nano-TiO₂: Nanoparticules de dioxyde de titane

NF- κ B: Nuclear factor-kappa B

NOAEL: No observed adverse effect level

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

OVA: Ovalbumine

PAF : Facteur d'agrégation plaquettaire

PM: Matière particulaire

PMN: Polymorphonucléaire

PUF: Particule ultrafine

SD: Sprague Dawley

TGF: Transforming growth factor

Th: Lymphocytes T auxiliaires

TNF: Tumor necrosis factor

TLV: Threshold limit value

USEPA: Environmental Protection Agency des États-Unis

VEMP : Valeurs d'exposition moyenne pondérée

VEMS: volume expiratoire maximal par seconde

CONTEXTE ET PROBLÉMATIQUE

L'éthanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) est un alcool reconnu surtout pour son utilisation dans les boissons alcoolisées. Pour cette raison, la plupart des études portant sur cette molécule analysent les différents effets reliés à l'ingestion d'éthanol. Or, il ne s'agit pas de sa seule utilisation. En effet, il est depuis longtemps utilisé comme solvant dans plusieurs industries et de plus en plus comme source de carburant propre lorsque mélangé avec l'essence. Plusieurs pays, dont le Canada, affirment que l'utilisation d'éthanol comme biocarburant pourrait être une solution pour diminuer les gaz à effet de serre (GES) provenant du secteur du transport routier. Désormais, tous les véhicules vendus au Canada et aux États-Unis doivent être conçus pour fonctionner avec des teneurs d'éthanol allant jusqu'à 10% dans l'essence. Le mélange E10 (10% éthanol et 90% essence) réduirait les émissions de GES de 3% à 8% (Ressources naturelles Canada, 2010). Quoique cette initiative semble profitable pour l'environnement, elle soulève des doutes quant au potentiel de toxicité pulmonaire pouvant découler d'une telle utilisation, l'être humain se retrouvant ainsi exposé involontairement à des concentrations croissantes de vapeurs d'éthanol par voie d'inhalation. Il existe de nombreuses études sur potentiel de toxicité de plusieurs composantes de l'essence, tels les hydrocarbures, le manganèse, le plomb, le toluène, le benzène, etc. Par contre, l'éthanol représente une nouvelle fraction de l'essence pour laquelle il existe un besoin de connaissances pour l'obtention de données permettant d'évaluer le risque à la santé humaine que pose l'utilisation croissante de carburants additionnés d'éthanol. De plus, l'éthanol est utilisé comme solvant ou ingrédient dans plusieurs secteurs, tels agroalimentaire, détergents, cosmétiques, pharmaceutique, emballages, peintures, vernis, encres, etc. (Afsset, 2010). En France, l'éthanol représentait, en 2004, 11% de tous les solvants et 50% de tous les alcools utilisés en industries (Triolet, 2005). L'utilisation fréquente de solutions hydro alcoolisées, observée surtout en milieu hospitalier, peut représenter une source d'exposition intermittente à des concentrations considérables d'éthanol. En effet, les pics d'exposition aux vapeurs d'éthanol provenant de ces solutions peuvent atteindre 400 ppm (Anses, 2011). Bien qu'aucune limite d'exposition n'ait encore été établie pour la population générale, chez les travailleurs, les valeurs d'exposition moyenne pondérée (VEMP) de Commission de la santé et de la sécurité du travail (CSST) et la threshold limit value (TLV) de l'American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) sont établies à 1000 ppm.

Lors d'une étude antérieure (Scarino et al., 2009), nous avons démontré l'absence de toxicité pulmonaire chez des rats déficients en ALDH2, une enzyme responsable de la détoxification de l'acétaldéhyde qui est un métabolite direct de l'éthanol, suite à l'exposition sous-chronique de vapeurs d'éthanol. Alors que les résultats de cette étude sont rassurants pour les populations à risque porteuses de cette déficience métabolique, le présent projet vise à poursuivre les recherches sur les risques encourus par un autre groupe à risque, à savoir la population des asthmatiques. L'objectif principal poursuivi est donc d'étudier le potentiel de toxicité pulmonaire de l'éthanol inhalé chez un modèle animal d'asthme allergique, l'asthme étant de loin la maladie pulmonaire la plus importante en nombre, touchant environ 300 millions de personnes dans le monde, dont 2,7 millions au Canada (WHO, 2008). La littérature suggère notamment une activité pneumotoxique de l'éthanol chez certains sujets asthmatiques (Myou et al., 1993; Myou et al., 1996; Takao et al., 1998; Matsuse et al., 2007). Par conséquent, il est impératif d'étudier l'effet des vapeurs d'éthanol chez des sujets asthmatiques. Les résultats de notre recherche auront des retombées très importantes sur la prise de décisions des autorités réglementaires quant à la protection des asthmatiques en regard de l'ajout d'éthanol à l'essence.

En situation réelle, l'être humain est exposé à l'éthanol en présence d'autres contaminants atmosphériques, dont l'ozone, un polluant reconnu pour exacerber les symptômes chez les asthmatiques (Hernandez et al., 2010). Étant donné qu'aucune étude n'a été publiée sur l'inhalation concomitante d'éthanol et d'ozone, la présente recherche s'attardera aussi aux effets pulmonaires d'un mélange éthanol-ozone chez le rat Brown Norway asthmatique. De même, les dernières années ont vu naître une préoccupation grandissante quant à la toxicité des nanoparticules qui sont des contaminants atmosphériques qui gagnent en importance. Or, selon l'Environmental Protection Agency des États-Unis (USEPA), la recherche sur la santé et sécurité des nanoparticules accuse un important retard sur la recherche et développement en nanotechnologies. Les nanoparticules de dioxyde de titane (nano-TiO₂), utilisées dans plusieurs industries tels les peintures, cosmétiques, crèmes solaires et emballages de nourriture, sont associées à une augmentation de la toxicité pulmonaire lorsqu'inhalées (Ma-Hock et al., 2009; Bermudez et al., 2004). Les rares études sur les effets pulmonaires de l'inhalation de nano-TiO₂ chez les asthmatiques sont équivoques (Hussain et al., 2011; Rossi et al., 2010). Considérant l'importance potentielle pour les agences gouvernementales réglementaires d'être renseignées sur les répercussions de l'inhalation de nano-TiO₂ chez les sujets asthmatiques, cette question est aussi étudiée dans ce projet de recherche.

PREMIÈRE PARTIE

REVUE DE LA LITTÉRATURE

SECTION 1:

RÉACTION ASTHMATIQUE

1.1. Asthme: La maladie

L'asthme est une maladie bronchique affectant environ 300 millions de personnes à travers le monde, dont 2,7 millions au Canada. C'est d'ailleurs la maladie d'ordre chronique la plus répandue chez les enfants. Une prédisposition génétique combinée à la présence d'un allergène, polluant ou irritant chimique est en cause lors du développement de la maladie. Celle-ci est caractérisée par des attaques pouvant être déclenchées plusieurs fois dans une journée, dépendant du facteur en cause. Ces derniers incluent, entre autres, l'exposition à un allergène, l'exercice physique ainsi que le moment de la journée, la susceptibilité augmentant durant la nuit. Ces attaques sont caractérisées par une inflammation au niveau des bronches, causant un resserrement des voies respiratoires et empêchant ainsi une respiration normale. Les symptômes incluent la toux, une respiration sifflante, de la dyspnée, un serrement de poitrine et une sécrétion de mucus (WHO, 2008).

1.1.1 Classification

Avec 270 millions de personnes souffrant d'asthme d'ordre allergique (ou extrinsèque), ce dernier est de loin (90%) le type d'asthme le plus répandu. Il est provoqué par la présence d'un allergène, c'est-à-dire une substance susceptible de provoquer une réaction allergique, par exemple le pollen, la moisissure, la poussière, les poils d'animaux, les tapis, les mites, etc. Jusqu'à tout récemment, les personnes asthmatiques ne souffrant pas d'asthme allergique étaient regroupées dans une seule autre catégorie, tout simplement nommée asthme non allergique (ou intrinsèque). L'accroissement des connaissances sur le sujet nous permet par contre, aujourd'hui, de subdiviser cette dernière catégorie en sous catégories incluant l'asthme induit par l'exercice, l'asthme nocturne, l'asthme occupationnel et l'asthme résistant aux stéroïdes (WHO, 2008).

1.1.2. Symptômes

Toux

La toux est souvent le premier symptôme apparent chez un individu venant de développer l'asthme. Les autres symptômes n'étant pas nécessairement présents dans les premiers

moments de la maladie, la toux permet aux cliniciens de suspecter le développement de la maladie, qui sera ensuite confirmée par un test à la méthacholine dans le but de détecter s'il y a présence d'une hyperréactivité bronchique (Nobata et al., 2006). L'intensité de la toux peut varier selon la saison, le moment dans la journée, la température de l'air inspiré (froid étant pire), le niveau d'activité physique et le lieu de travail de l'individu (Sano et al., 2004).

Respiration sifflante

Ce symptôme est caractérisé le passage d'air à travers l'espace restreint des bronches enflammées, ce qui cause un sifflement lors de la respiration. Chez les individus ayant une histoire familiale d'allergie, la respiration sifflante n'est pas un symptôme suffisant pour diagnostiquer l'asthme, car quoiqu'elle indique une obstruction bronchique, celle-ci peut être causée par un autre type d'allergie. Pour le reste de la population, ce sifflement est fortement corrélé à l'asthme (0.82-0.93) (Pekkanen et al., 2005). La fréquence de ce symptôme, qui peut être détecté par spirométrie, est aussi proportionnelle à la sévérité de l'asthme (Fiz et al., 2006).

Dyspnée et serrement de poitrine

Étant donné que plusieurs asthmatiques souffrent de bronchoconstriction chronique, souvent perçu comme un serrement de poitrine, ils perçoivent difficilement des changements d'obstruction bronchique indicatifs d'une éventuelle crise d'asthme (Ekici et al., 2006). Une étude a démontré que 22% des sujets asthmatiques remarquent difficilement ces changements et 6% ne les perçoivent pas du tout (Stravinskaite et al., 2005). Une autre étude a aussi démontré une relation inversement proportionnelle entre la sensibilité à la méthacholine et la perception de dyspnée (Aronsson et al., 2005). L'âge est aussi un facteur important, les personnes de 65 ans et plus démontrant une capacité de perception de dyspnée réduite de 50% lorsque comparée à celle de jeunes adultes ayant la même obstruction bronchique (Battaglia et al., 2005).

Hypersécrétion de mucus

L'asthme est souvent relié à une sécrétion accrue de mucus qui, à son tour, peut contribuer aux limitations importantes au niveau de la respiration, à l'hyperréactivité bronchique, à la morbidité et, dans les cas sévères, à la mortalité (Morcillo et al., 2006). Environ 9% des asthmatiques produisent des quantités importantes de mucus lors des crises et vont jusqu'à tousser des boules de mucus (Shimura et al., 1988). Dans les cas de mortalité, il y a une

augmentation des cellules caliciformes produisant de grandes quantités de mucus qui semble adhérer aux cellules, l'empêchant ainsi d'être éliminé par les cils (Shimura et al., 1996). Les propriétés rhéologiques de ce mucus sont altérées, ce dernier devenant plus visqueux et plus adhérent (Del Donno et al., 2000). Les médicaments, tels les corticostéroïdes, permettent par contre de garder sous contrôle les sécrétions de mucus (Rogers, 2004) et les cas de production excessive sont souvent dus à un mauvais contrôle de l'asthme (Barnes, 2002).

1.2. Réaction d'hypersensibilité de type I

L'asthme est une maladie qui affecte les individus atopiques, c'est-à-dire prédisposés à développer des réactions d'hypersensibilité suite à l'exposition à un ou des allergènes, normalement banaux, présents dans l'environnement (Eder et al., 2006). Ces individus ont des niveaux anormalement élevés d'IgE et d'éosinophiles, ce qui les rend plus susceptibles de souffrir d'allergies. La réaction d'hypersensibilité chez les asthmatiques est de type I (ou immédiate), c'est-à-dire médiée par les IgE, et implique une série de réactions de la part du système immunitaire menant à une anaphylaxie pulmonaire. Dès la première rencontre entre l'allergène et les lymphocytes B, le système immunitaire réagit par une réponse humorale d'allure normale, outre le fait que les plasmocytes (lymphocytes B activés par l'allergène) sécrètent principalement des IgE. Lors de la sensibilisation à l'allergène, la partie Fc des IgE se lie au récepteur spécifique membranaire (FcεRI) d'un basophile ou mastocyte. La liaison de l'IgE au FcεRI n'a aucun effet sur la cellule par elle-même. Par contre, en présence de l'allergène, une liaison croisée s'établit entre les récepteurs, ce qui entraîne une cascade de réactions intracellulaires menant à la dégranulation des basophiles/mastocytes (Williams & Galli, 2000; Gilfillan & Tkaczyk, 2006). Les médiateurs de l'inflammation ainsi libérés (e.g. histamine, cytokines, prostaglandines, leucotriènes) provoquent les effets reliés à la réponse initiale et à la réponse tardive de la réaction asthmatique en agissant sur les tissus adjacents et en recrutant les globules blancs, respectivement.

1.3. Réponse initiale de la réaction asthmatique

La réponse initiale de la réaction asthmatique survient dans les premières minutes suivant le contact entre l'hôte et l'allergène. Celle-ci est principalement caractérisée par la libération de divers médiateurs, de la part des mastocytes, agissant sur les tissus étant entrés en contact avec l'allergène. Les médiateurs proviennent de trois mécanismes distincts, tous résultants de la cascade de réactions intracellulaires suivant la liaison croisée des récepteurs FcεRI en

présence de l'allergène. Tout d'abord, les granules cytoplasmiques migrent, à travers le cytosquelette, vers la membrane plasmique pour fusionner avec cette dernière et libérer leur contenu vers le milieu extracellulaire. Le résultat de cette dégranulation est la libération de plusieurs composés, telles des amines biogéniques (e.g. histamine, sérotonine), cytokines, facteurs de croissance, protéases et plusieurs autres enzymes (Galli et al., 2005; Caughey, 2007). Ensuite, la phosphatidylcholine, présente dans la membrane plasmique, est clivée par la phospholipase A₂, produisant l'acide arachidonique. Ce dernier est métabolisé en prostaglandine D₂ et en leucotriène A₄, deux puissants médiateurs lipidiques agissant sur la bronchoconstriction, la vasodilatation et l'accumulation de mucus (Boyce, 2007). Le facteur d'agrégation plaquettaire (PAF), un autre médiateur lipidique, peut également être sécrété par les mastocytes (Finkelman, 2007). Enfin, la cascade de réactions intracellulaires impliquant RAS, RAF, MEK et ERK peut stimuler la transcription de certains gènes et ainsi promouvoir la formation de protéines tels les cytokines, chimiokines et facteurs de croissance (Bradding & Holgate, 1996). Les sécrétions de cytokines et chimiokines sont, entre autres, responsables de la migration de leucocytes, tels les éosinophiles et les neutrophiles, impliqués dans la phase tardive de la réaction asthmatique, vers le site affecté. Lorsque libérés localement, tous les médiateurs mentionnés ci-haut contribuent aux effets néfastes associés à la réponse initiale, c'est-à-dire une augmentation de la perméabilité vasculaire, vasodilatation, bronchoconstriction et recrutement leucocytaire. Par contre, la libération rapide de ces mêmes médiateurs au niveau systémique provoque une réaction globale beaucoup plus sévère, appelée anaphylaxie (Sampson et al., 2005).

1.4. Réponse tardive de la réaction asthmatique

La réponse tardive n'apparaît que quelques heures suivant le contact entre l'allergène et l'hôte et est caractérisée par l'influx pulmonaire de globules blancs, notamment les neutrophiles et les éosinophiles (Munitz & Levi-Schaffer, 2004). L'accumulation de ces derniers est facilitée par la sécrétion de cytokines (e.g. IL-1 et TNF- α), de la part des mastocytes, qui augmentent l'expression des molécules d'adhésion cellulaire des cellules endothéliales (Galli et al., 2008). Les granulocytes peuvent d'ailleurs demeurer dans les poumons pendant de nombreuses heures, voir même des journées, et contribuent au maintien de l'inflammation. Contrairement à la réponse initiale, où les mastocytes libèrent rapidement des médiateurs préformés vers le milieu extracellulaire, la liaison croisée des récepteurs stimule également la synthèse de nouvelles cytokines, chimiokines et facteurs de croissance qui seront libérés plus lentement

durant la réponse tardive (Rivera & Gilfillan, 2006). Quoique la plupart de ces médiateurs soient responsables de l'activation et du maintien de l'inflammation (e.g. $\text{TNF-}\alpha$, IL-5), les mastocytes activés sécrètent aussi des substances ayant des fonctions anti-inflammatoires et immunosuppressives (e.g. $\text{TGF-}\beta$ et IL-10) (Sayed et al., 2008). Plusieurs effets ayant débuté lors de la réponse initiale, telles la bronchoconstriction, la vasodilatation et la production de mucus, demeurent présents lors de la phase tardive. De plus, de nouvelles protéines (e.g. protéine basique majeure (MBP)) introduites dans les voies aériennes par l'arrivée des granulocytes peuvent causer des lésions aux cellules épithéliales et, en retour, ces dernières peuvent sécréter d'autres médiateurs contribuant au maintien de l'inflammation (Schleimer et al., 2007).

1.5. Cellules et médiateurs impliqués dans la réaction inflammatoire asthmatique

Plusieurs types de globules blancs jouent un rôle clé dans l'apparition et le maintien de la réaction asthmatique inflammatoire, bien que ce soit les lymphocytes lors de la sensibilisation, les mastocytes lors de la réponse asthmatique initiale ou les granulocytes lors de la réponse tardive. Lorsqu'un individu atopique inhale un antigène exogène (allergène), ce dernier entre en contact avec des cellules présentatrices de l'antigène (CPA), c'est-à-dire les cellules dendritiques, les macrophages, les éosinophiles et les lymphocytes B. Les CPA internalisent l'allergène par phagocytose et le dégradent en antigènes qui seront liés à une molécule membranaire, appelée molécule de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Le duo antigène/molécule de classe II du CMH est ensuite exporté vers la membrane plasmique, où il y aura fusion avec cette dernière et l'antigène sera ainsi présenté à l'extérieur de la surface cellulaire. Les lymphocytes T auxiliaires (Th), par l'expression de deux molécules membranaires importantes, la CD4 et les récepteurs des cellules T, vont reconnaître l'antigène combiné à une molécule de classe II du CMH et entrer en contact avec les CPA. Ce contact active les cellules Th , qui en retour sécrètent des cytokines qui jouent un rôle important dans la division et la différenciation (activation) des lymphocytes B. L'activation des lymphocytes Th est donc une étape cruciale dans le succès d'une réponse humorale. Chaque lymphocyte B mature exprime un anticorps ayant une spécificité antigénique propre. Lorsque l'allergène entre en contact avec un anticorps membranaire spécifique (IgE lors d'une réaction d'hypersensibilité de type I), c'est-à-dire lorsqu'il y a affinité entre l'anticorps (normalement les fragments Fab) et l'épitope

antigénique, il y a expansion clonale du lymphocyte B. Ce dernier peut se diviser en cellules B à mémoire ou se différencier en cellules B effectrices qui sécrètent des anticorps, les plasmocytes. Les anticorps sécrétés ont la même spécificité antigénique que les anticorps membranaires ayant amorcé la différenciation par le contact avec l'allergène. Ils vont circuler librement jusqu'à ce qu'ils rencontrent à nouveau l'allergène ou un récepteur FcεRI situé à la surface d'un mastocyte ou d'un basophile. Une fois l'IgE installé sur ce récepteur membranaire, le système immunitaire est sensibilisé et prêt pour une éventuelle rencontre subséquente avec l'allergène. La sécrétion d'anticorps étant une étape cruciale du début de la réaction inflammatoire asthmatique, les lymphocytes semblent être les cellules les plus importantes lors du premier contact entre l'hôte et l'allergène.

Lors de la réapparition de l'allergène, les lymphocytes, ayant déjà sécrété les IgE, diminuent en importance tandis que les mastocytes (et les basophiles), qui reçoivent ces anticorps, jouent un rôle clé lors de l'apparition des divers symptômes décrits auparavant. Les mastocytes sont des cellules granuleuses capables de synthétiser et sécréter diverses substances responsables la réaction inflammatoire asthmatique. Ces médiateurs peuvent être soit préformés, c'est-à-dire présents dans les granules des mastocytes indépendamment de la réaction asthmatique (e.g. tryptase, chymase, histamine et protéoglycans) ou formés lors de la réaction intracellulaire induite par la liaison croisée des récepteurs FcεRI lors de la provocation de la réaction asthmatique (e.g. prostaglandines et leukotriènes). Plusieurs médiateurs de l'inflammation, tels les cytokines, chimiokines et facteurs de croissances sont aussi formés plus tard lors de la phase tardive de la réaction inflammatoire asthmatique (Bloemen et al., 2007). Plusieurs études portant sur l'homéostasie des mastocytes ont révélé que, lors de cultures cellulaires, l'équilibre de ces derniers est assuré par plusieurs molécules (Ryan et al., 2007; Shelburne & Ryan, 2001). Tout d'abord, comme mentionné plus haut, les IgE induisent l'activation de la cascade de réactions intracellulaires responsables de la production et sécrétion des médiateurs effecteurs de l'inflammation. Ensuite, plusieurs cytokines présentes lors de la réponse humorale de type 2, tel les IL-4 et IL-10, vont désactiver les mastocytes en provoquant une régulation négative de diverses protéines effectrices intracellulaires et les FcεRI, établissant ainsi un équilibre inflammatoire. Les médiateurs effecteurs de l'inflammation ayant été sécrétés lors de l'activation vont assurer le maintien de l'inflammation en recrutant les lymphocytes T auxiliaires et les éosinophiles vers le site de l'inflammation (Gelfand, 2004).

Les éosinophiles sont des globules blancs granulocytes largement reconnus pour leur association avec les maladies allergiques, dont l'asthme allergique. Ces cellules ont un diamètre de 12-17 μm , un noyau bilobé et possèdent trois types de granules (spécifiques, petites et primaires) caractérisées par leur grande affinité envers l'éosine, un colorant acide qui leur donne un aspect orange et qui les rend facilement identifiables en microscopie optique (Kita et al., 1998). Plusieurs cytokines et facteurs chimiotactiques sécrétés lors de la phase initiale de la réaction inflammatoire asthmatique, tels l'éotaxine (CCL11), IL-3, IL-5 et GM-CSF, vont assurer la différenciation et la migration des éosinophiles vers les poumons (Prussin & Metcalfe, 2006; Rothenberg, 2006). De plus, il a été démontré que les chimiokines de la famille CC, tels RANTES, MIP-1 α et MCP-1 jouent un rôle dans la migration des éosinophiles lors des réactions allergiques des voies aériennes (Lukacs et al., 1996). L'IL-4 et l'IL-13 sont aussi reconnues pour jouer un rôle important dans la migration des éosinophiles de façon indirecte, c'est-à-dire en augmentant l'expression de l'éotaxine chez les cellules épithéliales bronchiques (Matsukura et al., 2001). D'autres molécules importantes dans la chimiotaxie des éosinophiles incluent le facteur d'activation plaquettaire (PAF) et les leucotriènes (LTB4) (Coëffier et al., 1991; Hasan et al., 2010). L'augmentation du nombre d'éosinophiles chez les asthmatiques est donc dépendante de l'augmentation de l'éosinophilopoïèse et de la sortie de ces derniers de la moelle osseuse, site de production des éosinophiles à partir de cellules progénitrices pluripotentes (CD34⁺) (Sitkauskienė et al., 2004). Une fois rendus dans les poumons, la survie des éosinophiles est assurée par la présence de médiateurs de l'inflammation, tel le GM-CSF, une cytokine sécrétée par plusieurs cellules importantes de la réaction inflammatoire asthmatique, tels les lymphocytes, les mastocytes et les macrophages (Adamko et al., 2003).

Représentant normalement moins de 5 % des leucocytes totaux chez les sujets sains, la proportion d'éosinophiles peut atteindre 30 à 50 % lors de la réponse inflammatoire maximale de la phase tardive chez les sujets asthmatiques, suggérant un rôle important de ces derniers dans la morbidité de la réaction asthmatique. En effet, il existe une corrélation importante entre l'activation des éosinophiles et la sévérité de la réponse asthmatique (Humbert, 1996). À la suite de leur migration transendothéliale, les éosinophiles adhèrent à l'épithélium bronchique et exercent leur toxicité envers les cellules épithéliales en libérant le contenu de leurs granules (dégranulation), riches en protéines cytotoxiques, médiateurs lipidiques, radicaux libres et cytokines (Ricci et al., 1997). Plusieurs substances spécifiques aux éosinophiles, telles les protéines basiques majeures (MBP), les protéines cationiques des

éosinophiles (ECP), les peroxydases des éosinophiles (EPO) et les superoxydes contribuent à l'inflammation pulmonaire à travers la desquamation de l'épithélium respiratoire et l'induction de la dégranulation des mastocytes et basophiles (Takizawa et al., 1997). En plus de leurs effets sur la réaction inflammatoire chez les asthmatiques, ces substances ont des effets sur d'autres événements qui caractérisent la réaction asthmatique. Par exemple, la MBP a aussi été associée à l'hyperréactivité bronchique en agissant comme antagoniste allostérique sélectif des autorécepteurs muscariniques M2, qui jouent un rôle important dans le contrôle de la contractilité bronchique (Fryer et al., 2000; Evans et al., 1997). La toxicité des substances sécrétées par les vésicules des éosinophiles et le nombre élevé de ces derniers lors de la réaction asthmatique rendent cette cellule l'une des plus importantes lors de la réaction inflammatoire chez les asthmatiques. Autre que leur rôle dans l'aspect inflammatoire de la maladie, les éosinophiles sont impliqués dans d'autres aspects de la pathogenèse asthmatique. En effet, des études ont montré qu'en l'absence d'éosinophiles, les souris asthmatiques ne développent pas des symptômes importants associés à la maladie, tels que l'accumulation de mucus, l'hyperréactivité bronchique et le remodelage des voies respiratoires (Lee et al., 2004; Humbles et al., 2004).

D'autres cellules importantes du système immunitaire, comme les neutrophiles et les macrophages, peuvent aussi être présentes en grand nombre lors de la réaction inflammatoire asthmatique. Les neutrophiles, des granulocytes connus aussi sous le nom de polymorphonucléaires (PMN), sont les leucocytes les plus nombreux chez les mammifères, constituant de 50 à 70% des globules blancs circulant. Tout comme les éosinophiles, ils sont facilement identifiables en microscopie optique grâce à leur noyau multilobé. Ils sont normalement les premiers à arriver au niveau du site d'inflammation. Ceci est aussi vrai chez les asthmatiques allergiques, les neutrophiles étant les premiers globules blancs qui s'infiltrent dans les voies respiratoires suivant la provocation allergénique (Teran et al., 1995; Smith et al., 1992). Une hypothèse expliquant l'arrivée rapide des neutrophiles dans les poumons des asthmatiques est la présence, tout comme chez les mastocytes, de récepteurs FcεRI sur la membrane plasmique, ce qui n'est pas le cas pour les neutrophiles chez les sujets sains (Gounni et al., 2001). La liaison des IgE aux récepteurs FcεRI stimule la production et la libération d'IL-8, un puissant facteur chimiotactique des neutrophiles, augmentant ainsi le recrutement des neutrophiles au niveau du site d'inflammation, c'est-à-dire les voies respiratoires (Lin et al., 2004). Cet effet autocrine de l'IL-8 pourrait donc être responsable de l'activité des neutrophiles lors de la réaction asthmatique. Une augmentation de l'IL-8 a

d'ailleurs été associée à une augmentation de la sévérité de l'asthme, ce qui suggère un rôle probable des neutrophiles dans les cas sévères (Jatakanon et al., 1999). Un autre facteur chimiotactique qui contribue à l'influx de neutrophiles dans les poumons des sujets asthmatiques est le TNF- α . Cette cytokine est sécrétée notamment par les mastocytes, les macrophages et les éosinophiles, ce qui pourrait contribuer à la présence élevée de neutrophiles lors des réactions allergiques (Casale et al., 1996). L'un des rôles principaux des neutrophiles dans la pathogenèse de la réponse asthmatique est le remodelage des voies aériennes, à travers la libération, entre autres, du facteur de croissance transformant bêta (TGF- β) et des métalloprotéinases, responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire (Batra et al., 2004; Ennis, 2003). En effet, l'augmentation de la métalloprotéinase MMP-9 est corrélée avec une augmentation de l'infiltration de leucocytes et la sévérité de la réaction asthmatique (Cataldo et al., 2000). Quoique sécrétée par plusieurs types de leucocytes, une étude a montré que sa présence chez les asthmatiques est presque entièrement due à la sécrétion de la part des neutrophiles (Cundall et al., 2003).

Les macrophages sont des globules blancs ayant un rôle indispensable dans la défense de l'hôte en contribuant à plusieurs aspects de la réponse immunitaire, tels la phagocytose, la présentation de l'antigène, la sécrétion de cytokines, l'induction d'une réponse innée ou adaptative, etc. (Kaiko et al., 2008; Gordon, 2003). Au niveau des poumons, les macrophages peuvent provenir de la circulation, c'est-à-dire de l'activation de monocytes, ou être installés entre les espaces alvéolaires de façon permanente dans le but de défendre les poumons contre les microbes et autres substances présentes dans l'air. En effet, les macrophages alvéolaires sont les leucocytes qui prédominent dans les voies respiratoires (Lohmann-Matthes et al., 1994). Quoique souvent ignorés au profit d'autres cellules (mentionnées plus haut) dans les travaux sur la réaction asthmatique inflammatoire (Eissa & Huston, 2003), les macrophages pourraient jouer un rôle important dans la modulation de la réponse asthmatique. En effet, les macrophages sécrètent plusieurs cytokines impliquées dans la réaction asthmatique inflammatoire, telles IL-4, IL-8, IL-10, IL13, famille CC (MCP-1, MIP-1 α , MIP-3 α) (Cavaillon, 1994; Hancock et al, 1998; Pouliot et al., 2005). Des études ont montré que les macrophages ont la capacité de moduler l'hyperréactivité bronchique en sécrétant le thromboxane A2, un modulateur de la neurotransmission cholinergique, et en induisant la sécrétion d'histamine au niveau des mastocytes et des basophiles (Schulman et al., 1985; Tamoaki et al., 1987). Par contre, d'autres travaux ont plutôt montré que les macrophages ont le potentiel de réduire l'intensité de la réaction asthmatique. Par exemple, Tang et al. (2001)

ont regardé les effets d'une réduction des macrophages alvéolaires sur la réaction asthmatique chez le rongeur. Leurs résultats ont révélé qu'une diminution des macrophages menait à une augmentation de l'hyperréactivité bronchique et de l'inflammation pulmonaire. Quoique plusieurs hypothèses ont été émises pour tenter de comprendre le rôle des macrophages dans la réaction asthmatique, telles des différences interspèces ou des différences entre les macrophages impliqués dans la réponse Th1 comparativement à la réponse Th2 (Careau & Bissonnette, 2004; Mills et al., 2000), d'autres études sont nécessaires afin de déterminer si le macrophage alvéolaire a un effet positif ou négatif sur la réaction asthmatique globale.

1.6. Les modèles expérimentaux d'asthme allergique

Le but des études expérimentales sur l'asthme étant de pouvoir extrapoler à l'humain un effet observé chez l'animal, il est important de choisir un modèle animal dont la réponse physiologique se rapproche le plus possible de celle observée chez l'humain sous des conditions équivalentes. Il doit aussi tenir compte de plusieurs considérations non physiologiques, tels le coût des animaux, l'infrastructure et l'expertise du personnel impliqué dans le projet de recherche. Les études animales portant sur l'asthme allergique utilisent principalement des souris et des rats en raison des similarités de la réponse asthmatique pulmonaire qui existent entre ces animaux et l'être humain (Zosky & Sly, 2007; Bates et al., 2009; Shin et al., 2009). La souris est le modèle le plus populaire en raison de son coût, de la période de gestation courte, de la facilité à utiliser des modèles transgéniques dans le but d'étudier des paramètres spécifiques et surtout de la capacité d'induire une réponse immunologique asthmatique Th2 médiée par les IgE. L'utilisation de souris transgénique permet par ailleurs de manipuler la réponse asthmatique afin d'étudier des aspects spécifiques de la maladie, telles la réponse immunologique (autant au niveau moléculaire que cellulaire) et l'hyperréactivité bronchique. Tout comme les souris, les rats ont l'avantage d'être peu dispendieux, ce qui permet de faire des études à grande échelle. Historiquement, les rats étaient plus utilisés que les souris pour étudier l'asthme, mais les avancements des technologies en génétique associées avec les souris rendent désormais ces dernières plus attrayantes. Par contre, les rats ont l'avantage d'être plus gros que les souris, ce qui facilite la collecte d'échantillons, tels que le sang et le liquide des lavages bronchoalvéolaires (BAL), tout en permettant d'en recueillir un plus grand volume par animal. Leur taille et leur meilleure stabilité à l'anesthésie facilitent aussi les mesures physiologiques pulmonaires. Parmi les nombreuses souches de rats disponibles, le rat Brown Norway est de loin le plus

utilisé lors des études portant sur l'asthme en raison de sa prédisposition génétique à développer une réponse Th2 (Hylkema et al., 2002). En ce qui a trait à l'étude de l'inhalation de polluants atmosphériques chez les asthmatiques, les rats Brown Norway (BN) sont un modèle intéressant étant donné que le type de réponse immunitaire engendrée par une telle exposition, c'est-à-dire une réponse à prédominance humorale, est le même type de réponse rencontrée lors de la réaction asthmatique humaine (Siegel et al., 2004). Cette particularité est importante, car elle permet de vérifier si l'exposition à des contaminants atmosphériques peut moduler la réponse inflammatoire lors d'une réaction asthmatique.

SECTION 2:

DONNÉES GÉNÉRALES SUR LES VAPEURS D'ÉTHANOL

L'éthanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) est une molécule transparente incolore largement utilisée dans différents types d'industries, par exemple dans la production de boissons alcoolisées, solvants industriels, détergents, désinfectants et récemment comme carburant automobile. Bien qu'aucune limite d'exposition n'a encore été établie pour la population générale, chez les travailleurs, la valeur d'exposition moyenne pondérée (VEMP) de la CSST et la « threshold limit value » (TLV) de l'ACGIH sont établies à 1000 ppm.

2.1. Cinétique de l'éthanol dans l'organisme

L'éthanol est une molécule à la fois hydrophile et lipophile, ce qui lui permet de passer à travers la plupart des membranes biologiques, dont le placenta et la barrière hématoencéphalique (IARC, 1988). Les données disponibles sur son absorption par voie d'inhalation sont rares. Une étude a montré une absorption aussi basse que 14% lors de faibles concentrations (103-140 ppm) pour une inhalation de courte durée (4 h) (Kruhoffer, 1983). Les opinions varient aussi énormément en ce qui concerne le facteur limitant d'absorption, Kruhoffer (1983) croyant que c'est la perfusion sanguine pulmonaire, tandis qu'une autre équipe (Campbell & Wilson, 1986) croit qu'il s'agit plutôt de la ventilation alvéolaire. Ces derniers ont d'ailleurs rapporté un coefficient de partage sang:air expiré de 2000 :1.

L'éthanol, qui a une demi-vie de distribution de 7-8 minutes une fois rendu dans le sang, se distribue surtout dans les organes très bien perfusés comme le foie, le cerveau et les poumons (Jones et al., 1990). Son caractère hydrophile fait en sorte qu'il se distribue difficilement dans les os et les graisses. En outre, son cheminement dans l'organisme n'implique pas de liaison aux protéines plasmatiques. Son volume de distribution dans l'organisme se rapproche donc du volume d'eau corporelle total, soit 41 litres chez un homme de 70 kg. Les différences observées entre hommes et femmes quant au volume de distribution de l'éthanol sont en grande partie dues à la différence dans les proportions de masse grasse et de masse maigre entre les deux sexes. Chez les hommes, le volume de distribution se rapproche de 0,6 L/kg, tandis qu'il se rapproche de 0,5 L/kg chez les femmes (Goist et al., 1985 ; Jones et al., 1992).

Une fois dans l'organisme, l'éthanol circule librement dans le sang. Il peut donc atteindre rapidement les organes impliqués dans son métabolisme, le plus important étant le foie; d'autres organes comme le cerveau, les reins, l'estomac, l'intestin, le pancréas, les poumons métabolisent également l'éthanol. Les hépatocytes ont trois façons de métaboliser l'éthanol : la voie de l'alcool déshydrogénase (ADH) dans le cytosol, le « microsomal ethanol oxidizing system » (MEOS) utilisant le cytochrome P-450 2E1 (CYP2E1) dans le réticulum endoplasmique lisse et, la voie de la catalase dans les peroxysomes. Ces trois voies métaboliques sont en fait des réactions d'oxydation et elles convertissent l'éthanol en acétaldéhyde. Cette biotransformation a pour résultat de rendre l'éthanol plus hydrophile pour en faciliter son élimination. L'acétaldéhyde produit par ces réactions d'oxydation va ensuite entrer dans les mitochondries cellulaires pour y être biotransformé en acétate (ou acide acétique) par l'ALDH2 (Parkinson, 2001). L'acétate produit par oxydation de l'acétaldéhyde sera libéré par les hépatocytes pour entrer dans des tissus extra hépatique, dans lesquels il sera converti en acétyl-CoA (Romero et al., 2004). L'acétyl-CoA va ensuite entrer dans le cycle du citrate (ou cycle de Krebs) pour être converti en CO_2 et en H_2O ce qui a pour effet de libérer de l'énergie sous forme de GTP et de $\text{NADH} + \text{H}^+$ (Yamashita et al., 2001).

Il existe également une voie métabolique pour l'éthanol qui n'est pas oxydative. Quoique les mécanismes d'action de cette voie ne soient pas aussi bien connus que ceux des trois voies oxydatives, on sait que les produits finaux de cette réaction non oxydative sont des esters éthyliques d'acides gras (EEAG) (Best & Laposata, 2003). La voie non oxydative prédomine au niveau du pancréas, où se manifestent également les voies oxydatives. Une inhibition des voies métaboliques oxydatives de l'éthanol donne des concentrations plus élevées de EEAG, ce qui indique que les deux voies (oxydatives et non oxydatives) sont interreliées métaboliquement de façon alternative (Chrostek et al., 2003).

L'éthanol peut être éliminé sans subir de biotransformation, c'est-à-dire sous forme inchangée, par l'air expiré, l'urine et la sueur (Lands, 1998). Chez un homme de 70 kg, la clairance pulmonaire, rénale et cutanée sont estimées à 0,16 L/h, 0,06 L/h et 0,02 L/h, respectivement (INSERM, 2001).

2.2. Toxicité de l'inhalation d'éthanol

Étant donné que les effets néfastes de l'éthanol sont principalement associés à son utilisation dans les boissons alcoolisées, le potentiel de toxicité de l'inhalation de cette molécule a suscité très peu d'intérêt. Lors d'une étude antérieure, nous avons vérifié l'impact du polymorphisme génétique de l'ALDH2 sur la toxicité pulmonaire chez le rat Sprague-Dawley suite à des expositions sous chroniques à des vapeurs d'éthanol (1000 ou 3000 ppm, 6 h/jour, 5 jours par semaine pour 13 semaines). Les résultats obtenus ont montré que l'inhalation d'éthanol ne causait pas de changement à la morphologie pulmonaire et n'induisait pas d'inflammation bronchique, et ce, autant chez les rats présentant le génotype de l'ALDH2 normal que celui de la forme déficiente. Selon ces résultats, nous avons conclu qu'une exposition sous-chronique à 3000 ppm représente un NOAEL pour la toxicité pulmonaire chez le rat (Scarino et al., 2009).

Rikans & Gonzales (1990) ont étudié les effets de l'inhalation d'éthanol sur les mécanismes de défense pulmonaire contre le stress oxydatif chez le rat exposé à des concentrations élevées d'éthanol (concentration sanguine de 2 à 3 g/L), 24 h/d, pendant 35 jours consécutifs. Leurs résultats n'ont montré aucune différence des niveaux de glutathion et vitamine E pulmonaire, mais la concentration de superoxyde dismutase, une métalloprotéine reconnue pour son rôle antioxydant important, a augmenté de 25%, ce qui suggère que l'éthanol n'affecte pas l'efficacité des mécanismes antioxydants pulmonaires. Par contre, les auteurs ont conclu que l'inhalation éthanol n'induit pas une augmentation significative de stress oxydatif. Aucune conclusion ne peut être tirée quant à son effet sur les défenses antioxydantes pulmonaires. L'effet aigu de l'inhalation d'éthanol sur la capacité respiratoire a été étudié chez six volontaires sains et les résultats ont été comparés à ceux obtenus après l'inhalation d'une solution saline (Zuskin et al, 1981). Les résultats ont montré une baisse significative des courbes débits/volumes expiratoires partiels 90 min suivant l'inhalation d'éthanol (2,000 ppm pour 30 min). Le volume expiratoire maximal seconde (VEMS) n'a pas changé significativement et ce, autant chez les individus exposés à l'éthanol que chez ceux exposés à l'aérosol de saline.

Il existe très peu de données sur les effets de l'inhalation d'éthanol au niveau du système immunitaire et les quelques groupes ayant étudié la question ont utilisé des concentrations très élevées. Malik et Wickramasinghe (1986) ont exposé des souris femelles à des concentrations

d'éthanol variant entre 13 300 et 20 216 ppm (concentration sanguine de 1.5 à 5.6 g/L) pour une durée de 24 h, ce qui a eu pour effet de diminuer le nombre de leucocytes circulants. Par contre, dans la même étude, des souris femelles ayant été exposées de 20 à 43 jours à des concentrations croissantes d'éthanol jusqu'au jour 10 et maintenues entre 7950 et 13 300 ppm (concentration sanguine de 0.4 à 2.5 g/L) pour les jours suivants ont simplement développé une thrombopénie. Dans une autre étude, des rats Sprague Dawley mâles ont été exposés à une concentration de 13 300 ppm d'éthanol pour une durée de 14 jours. Les résultats ont montré une diminution significative du nombre de cellules nucléées présentes dans la moelle osseuse, le thymus et la rate de 35%, 12% et 58%, respectivement. De plus, les rats exposés à l'éthanol avaient un nombre plus élevé de neutrophiles et plus bas de lymphocytes circulants lorsque comparés aux rats témoins (Marietta et al., 1988).

De façon générale, l'éthanol est un irritant pour les yeux et le tractus respiratoire à très hautes concentrations (ex. 5,000-10,000 ppm) qui sont connues pour causer de la narcose, de l'ataxie et de l'incoordination (Mullin et Krivanek, 1982). Lester et Greenberg (1951) ont étudié la tolérance de l'exposition à des concentrations croissantes de vapeurs d'éthanol chez l'être humain. Les sujets exposés à des concentrations variant entre 5320 et 10 640 ppm ont présenté des symptômes légers, telles la toux et une sensation de brûlure dans les yeux. À 15 960 ppm, les sujets avaient beaucoup de difficulté à tolérer l'atmosphère et ont présenté un larmolement et une toux continue. Lorsque la concentration a atteint 21280 ppm, les sujets suffoquaient et n'enduraient plus l'atmosphère. Chez le rat, une étude a montré que l'inhalation de 14 720 ppm d'éthanol pendant 24 h causait une diminution de la température corporelle de 2 °C (Ferko et Bobyock, 1979).

Quoique, comme mentionné plus haut, le potentiel de toxicité intrinsèque de l'inhalation d'éthanol ait suscité un certain intérêt, les propriétés physico-chimiques de l'éthanol lui confèrent un rôle potentiel dans le domaine thérapeutique. En effet, l'inhalation d'éthanol facilite l'absorption d'autres substances, tels les protéines et certains médicaments administrés par voie d'inhalation, comme l'insuline (Choi et al, 2001; Heinemann et al, 2000). Ce phénomène est possible, car l'éthanol rend plus perméable l'épithélium pulmonaire en influençant les jonctions serrées, la segmentation de la membrane plasmique, ou d'autres propriétés de barrières de la cellule, améliorant l'efficacité de l'entrée du médicament dans la circulation sanguine, tout en soulevant des questions concernant la sécurité à long terme (Edwards et al, 2003).

2.3. Réaction asthmatique induite par l'exposition à des vapeurs d'éthanol

L'étude des effets de l'éthanol sur la réactivité bronchique chez des patients démontrant de l'asthme induit par l'alcool a montré que des doses croissantes d'éthanol inhalé ne causaient aucun changement significatif du VEMS. En effet, la concentration de méthacholine causant une baisse de 20 % du VEMS mesurée avec un test de provocation à l'éthanol, lequel consiste à inhaler une solution d'éthanol à différentes concentrations à l'aide d'un nébuliseur (Myou et al., 1993), étaient significativement plus élevées que celles après la saline. Ce résultat indique que les vapeurs d'éthanol ont un effet de réduction de la réponse bronchique chez les patients démontrant de l'asthme induit à l'alcool (Myou et al., 1996). Ce type d'asthme, un phénomène caractéristique chez les Asiatiques, serait dû à des différences dans le métabolisme de l'alcool (Takao et al., 1998). Effectivement, une étude sur le polymorphisme du gène de l'ALDH2 dans la réponse à un test de provocation à l'alcool chez un groupe de sujets asthmatiques japonais a montré un test positif chez 47 % des 32 sujets asthmatiques (Takao et al. 1998). La concentration sanguine d'éthanol était similaire chez les répondants et ceux qui ne l'étaient pas. La baisse du VEMS était associée à une hausse des concentrations sanguines d'acétaldéhyde et d'histamine. La réponse à une provocation orale était positive chez 19 % des 16 patients avec un génotype ALDH2 normal homozygote, 71 % des 14 patients avec un type mutant hétérozygote, et 100 % des deux patients avec un génotype mutant homozygote ALDH2. Ainsi, ces auteurs suggèrent que l'asthme induit par l'alcool est probablement le résultat d'une hausse de la concentration d'acétaldéhyde résultant des différences de l'activité de l'ALDH2 suite à des différences de génotype.

Matsuse et al. (2007) ont effectué des tests de provocation à l'éthanol chez des Japonais asthmatiques et montré que la moitié d'entre eux développait une bronchoconstriction concomitante à une augmentation à la concentration sanguine d'acétaldéhyde et d'histamine consécutive à une déficience en ALDH2. Ils ont aussi montré que l'administration intranasale d'acétaldéhyde augmente l'inflammation résultant d'une sensibilisation à un allergène (mite) dans un modèle murin d'asthme. Les auteurs ont conclu que l'acétaldéhyde a le potentiel de causer des effets dans les voies respiratoires chez l'Homme à titre de métabolite de l'éthanol et causer une exacerbation de l'asthme chez les populations sensibles.

SECTION 3:

DONNÉES GÉNÉRALES SUR LES NANOPARTICULES

Les matières particulaires (PM), sont de petites particules qui se retrouvent le plus souvent en suspension dans l'air sous forme solide, liquide ou gazeuse. Les préoccupations quant à leurs effets toxicologiques sont grandissantes, surtout chez les personnes souffrant de troubles respiratoires, étant donné leur importance en tant que polluant atmosphérique. En effet, en 1998 l'US EPA a décidé d'accélérer ses recherches sur les effets potentiellement néfastes des particules sur la santé humaine (US EPA, 2012). Toutefois, quoique plusieurs caractéristiques définissent les différents types de particules, la réglementation sur la qualité de l'air ne tient compte, encore aujourd'hui, que de la masse totale des PM en suspension dans l'air. D'autres facteurs, par exemple la composition des particules, pourraient jouer un rôle important quant au type d'effet toxicologique associé à une exposition (Grahame & Schlesinger, 2005). Cette section vise à résumer les connaissances sur la définition des PM, leur cinétique dans l'organisme et leurs principaux effets à différents niveaux, en apportant une attention particulière aux nanoparticules, notamment celles de dioxyde de titane.

3.1. Sources : naturelles et anthropogéniques

Les émissions de matières particulaires provenant de la nature peuvent être séparées en deux catégories : biogénique et géogénique. Les sources biogéniques incluent tout ce qui est de la matière biologique (organique), comme le pollen, les résidus de plantes et d'animaux. Les sources géogéniques représentent le reste des émissions naturelles, par exemple la poussière provenant de l'érosion du sol, les sels de la mer, les émissions volcaniques, etc. L'être humain, par ses nombreuses activités, contribue au rejet de particules dans l'atmosphère. Plusieurs secteurs sont responsables de ces émissions anthropogéniques: Production d'énergie, construction, transport, production de minéraux, de métaux et de produits chimiques, agriculture, incinération, etc. Par contre, ces secteurs polluants ont vu leurs émissions de PM (PM_{10} et $PM_{2.5}$) diminuer d'environ 50% de 1990 à 2000 (WHO, 2005).

3.2. Caractérisation : type, taille, composition et forme

Les particules se trouvant en suspension dans l'air sont dites soit « primaires » ou « secondaires ». Le type « primaire » regroupe les PM émises telles quelles, que ce soit de

sources naturelles ou anthropogéniques. Le type « secondaire » regroupe les particules, sous forme d'aérosols, ayant été formées dans l'air à partir de la transformation de précurseurs gazeux se retrouvant dans l'atmosphère. Les réactions chimiques vont, par exemple, former des sulfates à partir du dioxyde de soufre et des nitrates à partir du dioxyde d'azote (Putaud et al., 2004).

Tel que mentionné plus haut, les normes gouvernementales sur les émissions de particules sont basées sur leur taille. Cette caractéristique doit donc être considérée comme le facteur prédominant dans leur classification. Cette dernière se fait selon le diamètre aérodynamique des particules, en micromètres (Environnement Canada, 2012). Par exemple, les PM_{10} représentent des particules dont le diamètre est inférieur à 10 μm . Cette classification comprend plusieurs catégories : PT (particules totales), PM_{10} , $PM_{10-2,5}$, $PM_{2,5}$, $PM_{1,}$ et $PM_{0,1}$. Les $PM_{0,1}$ (inférieures à 100 nm) représentent en fait les nanoparticules et les particules ultrafines (PUF), discutées plus loin dans ce chapitre. À noter que pour les « particules totales (PT) », Environnement Canada ajoute que le diamètre maximal est d'environ 100 μm .

La composition chimique des particules varie en fonction de la source d'émission. Les $PM_{2,5}$ sont composées principalement de sulfates, nitrates, ammonium, ions hydrogène, carbone élémentaire et organique, métaux (Pb, Cd, V, Ni, Cu, Zn, Mn, Fe, etc.). Les $PM_{10-2,5}$ sont, quant à elles, composées principalement de poussières (sols), du résidu provenant de la combustion de plusieurs produits, tels le charbon, le pétrole et le bois, des poussières de métaux, tels l'aluminium, le titane et le fer, des sels tels le carbonate de calcium ($CaCO_3$) et le chlorure de sodium (NaCl) et enfin tout ce qui est constitué de matière organique, tels les bactéries, endotoxines, bêta-glucanes, spores fongiques, pollen et autres allergènes (Bauer et al., 2002; Dales et al., 2004; WHO, 2005).

La classification classique des particules (selon la taille) est d'une certaine façon trompeuse, car elle porte à croire que toutes les particules sont parfaitement sphériques. Évidemment, cette assumption est loin d'être une règle générale, les particules se présentant sous plusieurs formes, surtout celles de plus grande taille. Dans le but de pouvoir classer les particules de différentes formes (donc ayant des propriétés aérodynamiques différentes) en fonction de leur diamètre, il faut ajouter un facteur de correction, appelé facteur dynamique de forme. Cette correction est en fait le rapport entre la force de résistance de la particule (peu importe sa forme) sur la force de résistance d'une particule parfaitement sphérique ayant la même vitesse

de sédimentation et volume que la première. L'application de ce facteur sur le diamètre nous permet en quelque sorte de « rendre » toutes les particules sphériques et donc de pouvoir les comparer entre elles. Par exemple, le sable peut paraître sphérique à l'oeil, mais son facteur dynamique de forme est de 1,57 (Laj & Sellegri, 2003). Par conséquent, il est important de tenir compte de ce facteur de conversion lors de la classification des particules et lors des études comparant les effets des particules selon la taille.

3.3. Cinétique des particules dans l'organisme

L'évaluation de la toxicité des particules ne peut être basée simplement sur la concentration d'exposition. En fait, le type d'effet toxicologique dépendra surtout de la taille, qui est un facteur très important dans la détermination du site de déposition dans les poumons, et de la composition de particules. En raison des processus gravitationnels et d'impaction, les plus grosses particules ($>PM_{10}$) ont tendance à se déposer dans la partie supérieure du tractus respiratoire, c'est-à-dire du nez au larynx (US EPA, 2003). Dans cette même région, les PM_{10} ont aussi tendance à s'y déposer, mais cette fois par des processus de « bombardement » au hasard par l'air et de collision avec les parois des voies respiratoires. Pour ces particules, plus elles sont petites, plus elles se déposent (Jaques & Kim, 2000). Les grosses particules (5-10 μm) se déposent dans la partie trachéobronchiale du tractus (trachée, bronches et bronchioles), tandis que celles se situant entre 2.5 et 5 μm entrent profondément dans les poumons, c'est-à-dire au niveau alvéolaire (US EPA, 2003). Les particules de grosseur moyenne, entre 2.5 et 5 μm , sont en fait très dangereuses étant donné qu'elles peuvent s'accumuler pendant des mois et même des années dans les alvéoles avant d'être éliminées (Schlesinger & al., 1997).

Un inconvénient majeur des substances inhalées est que la circulation sanguine passant par les poumons se rend directement vers le cœur, sans subir d'effet de premier passage par le foie, ce dernier ayant, entre autres, un rôle de détoxification. Les composantes solubles des particules, comme les substances organiques et les métaux, sont donc une menace directe non seulement pour les poumons, mais également pour la deuxième cible pouvant être atteinte, c'est-à-dire le cœur (Donaldson et al., 2001).

Il existe deux principaux mécanismes de défense du poumon contre les particules. La première est l'emprisonnement des particules dans le mucus présent dans les parois des voies respiratoires. Le mucus est ensuite transporté vers la gorge par les cils et éliminé par

déglutition ou crachat. Pour les particules ayant réussi à se faufiler au plus profond du poumon, c'est-à-dire les alvéoles, un deuxième mécanisme sera nécessaire pour assurer l'élimination des PM. Ce sont cette fois les macrophages alvéolaires qui prendront la relève en phagocytant les particules (Donaldson & Tran, 2002). Ces mécanismes de défense deviennent particulièrement plus importants dans les cas des particules ultrafines, ces dernières étant retenues de façon plus importante que les particules de plus grande taille (Oberdörster et al., 1994). Cette étude sur les particules de TiO_2 a, entre autres, montré que i) lorsque comparées aux particules fines, une plus grande proportion de PUF se retrouvaient dans l'interstice pulmonaire; ii) ces mêmes particules avaient une clairance pulmonaire plus longue; et iii) elles se retrouvaient en plus grand nombre dans les ganglions lymphatiques, indiquant un passage vers le milieu interstitiel. Enfin, une étude de Kreyling et al. (2002) a montré que, suite à l'inhalation de particules d'iridium radiomarquées chez le rat, ces dernières sont passées des poumons vers le tractus gastro-intestinal et qu'elles se sont principalement retrouvées dans les fèces. L'absorption intestinale n'était pas significative.

3.4. Toxicité pulmonaire des PUF/nanoparticules

Le niveau de toxicité des particules dépend de plusieurs facteurs, telles la composition, la concentration et la taille. Cette dernière est une caractéristique importante des PUF et nanoparticules car elle leur confère une surface par unité de masse plus élevée lorsque comparée à des particules de plus grande taille. Une surface plus élevée se traduit par une surface de contact plus élevée entre les particules et les cellules des voies respiratoires, qui se retrouvent donc exposées à un plus grand nombre de molécules de la particule en question pour une même unité de masse. Par conséquent, à une concentration et composition identique, une exposition à des PUF devrait se traduire par une toxicité plus élevée lorsque comparée à des particules de plus grande taille. Plusieurs groupes ont étudié cette hypothèse et ont conclu qu'il existait effectivement une corrélation entre le niveau de toxicité des particules et la surface (Monteiller et al., 2007; Oberdörster et al., 2005; Beck-Speier et al., 2005; Brown et al., 2001).

Les effets néfastes des particules au niveau du système respiratoire viennent surtout du fait que l'organisme tente de se défendre en déclenchant le processus inflammatoire. L'inflammation est initiée principalement par un déséquilibre entre les particules et les poumons, par exemple lorsque les macrophages sont endommagés ou qu'ils sécrètent des

médiateurs de l'inflammation. Cette défense inflammatoire est caractérisée par une cascade de réactions impliquant plusieurs cellules (épithéliales, macrophages, éosinophiles, neutrophiles, lymphocytes T) et molécules (cytokines, chimiokines, leucotriènes, prostaglandines, molécules d'adhésion) (Salvi & Holgate, 1999). À court terme, ce système complexe est très efficace pour défendre les poumons. Les leucocytes libèrent plusieurs molécules, dont des cytokines, des espèces réactives de l'oxygène (ERO), des médiateurs lipidiques et des protéases toxiques dans le but d'assurer la défense de l'organisme. Par contre, ces médiateurs de l'inflammation contribuent aussi à endommager les cellules épithéliales, qui à leur tour vont accentuer leur libération de médiateurs et ainsi prolonger l'inflammation, qui pourrait devenir chronique (Schwarze et al., 2006). C'est d'ailleurs ce qui définit les maladies pulmonaires obstructives chroniques (MPOC) (Sutherland & Martin, 2003).

La toxicité pulmonaire reliée à l'inhalation de nano-TiO₂ est dépendante de la taille, de la concentration et de la durée de l'exposition. Étant donné que l'état d'agglomération des nanoparticules détermine la taille réelle de la particule à laquelle un sujet est exposé et que les nanoparticules d'oxyde métallique, dont les nano-TiO₂, ont tendance à s'agglomérer dans les aérosols, le texte qui suit portera non seulement sur la toxicité des nano-TiO₂, mais aussi sur celle des particules fines ou pigmentaires de TiO₂ dans le but de mieux représenter la réalité d'une exposition dite aux nano-TiO₂. Les effets d'une exposition aiguë à plusieurs concentrations de nano-TiO₂ ont été étudiés par Ma-Hock et al. (2009), qui ont exposé des rats Wistar à une concentration faible, moyenne ou élevée de 2, 10 ou 50 mg/m³, respectivement, 6 h/d pendant 5 d. Les décomptes cellulaires dans les BAL ont révélé une inflammation importante, menée principalement par les neutrophiles, aux temps 0, 3 et 16 jours suivant la dernière exposition pour le groupe exposé à 50 mg/m³. Par contre, la concentration moyenne n'a causé qu'une faible augmentation des neutrophiles qui s'est avérée significative aux temps 0 et 3 jours, mais qui est retournée à la normale au jour 16. Aucune inflammation n'était présente pour l'exposition faible à tous les temps analysés. Les niveaux de plusieurs médiateurs de l'inflammation ont suivi la même tendance, c'est-à-dire une augmentation dose-dépendante. Des coupes histologiques des poumons ont montré une infiltration légère de macrophages alvéolaires pour le groupe exposé à 10 mg/m³ et une infiltration légère à moyenne pour le groupe exposé à 50 mg/m³. Une autre étude visant à vérifier la différence entre une exposition aiguë élevée (6 h/d, 5 d/sem) à des nano-TiO₂ (100 mg/m³) et à des particules pigmentaires de TiO₂ (250 mg/m³) a aussi rapporté une augmentation importante de neutrophiles pour ces deux groupes à 3 et 14 jours suivant la

dernière exposition, en plus d'observer une augmentation marquée de lymphocytes présents dans les BAL (van Ravenzwaay et al., 2009). Il est intéressant de noter que, même à une concentration plus faible, les animaux exposés aux nano-TiO₂ avaient un niveau d'inflammation significativement plus élevé que ceux exposés aux particules pigmentaires.

Les études sous-chroniques ont révélé des données importantes quant à l'accumulation et la rétention pulmonaire de particules et au rôle des macrophages dans la clairance de ces dernières. Tout d'abord, une étude menée par Oberdörster et al. (1994) chez le rat visait à vérifier la différence entre l'inhalation de nano-TiO₂ (20 nm) et les particules fines de TiO₂ (250 nm) sur les effets à long terme d'une exposition sous-chronique de 12 semaines (6 h/d, 5 d/sem) à une concentration moyenne de 23.5 mg/m³ et 22.3 mg/m³, respectivement. Des lavages bronchoalvéolaires (BAL) effectués aux semaines 4, 8, 12, 41 et 64 ont révélé une augmentation constante des leucocytes totaux, dont la majorité était des macrophages, durant les 12 semaines d'expositions chez les animaux exposés aux nano-TiO₂, mais pas chez ceux exposés aux particules fines de TiO₂. Quoique l'inflammation pulmonaire soit presque retournée au niveau basal à la 61^e semaine, leurs résultats ont montré une rétention des particules dans les poumons, particulièrement au niveau alvéolaire. Le phénomène de rétention pulmonaire des nano-TiO₂ peut être dû à plusieurs facteurs. Une étude de Morrow (1988) a montré qu'une « surcharge particulaire » se traduisant par une augmentation du volume des macrophages de 6% ou plus, causée par la phagocytose des particules, est corrélée avec une diminution de l'activité phagocytaire des macrophages et donc, une accumulation de particules dans les poumons. De plus, Geiser et al. (2008) ont montré que la taille des particules est un facteur important qui influence la capacité phagocytaire des macrophages, les particules micrométriques étant plus facilement phagocytées que les particules nanométriques.

Dans une autre étude sur les effets à long terme d'une exposition sous-chronique de 13 semaines (6 h/d, 5 d/sem) à des concentrations de 10, 50 et 250 mg/m³ de nano-TiO₂, la rétention pulmonaire de particules chez les rats exposés à 50 et 250 mg/m³ était toujours très significative 52 semaines suivant la dernière exposition, avec 30 et 100 mg de particules par g de poumon, respectivement, indiquant une surcharge pulmonaire importante affectant la capacité de clairance normale de la part des macrophages. Chez le groupe exposé à 10 mg/m³, la rétention était beaucoup moins importante, avec 2 mg particules/g poumon. L'inflammation pulmonaire, mesurée par décompte cellulaire des neutrophiles et macrophages présents dans les BAL, était significative à tous les temps mesurés suivant la dernière exposition, i.e. 0, 4,

13, 26 et 52 semaines, chez les groupes exposés à 50 et 250 mg/m³. Par contre, le groupe exposé à 10 mg/m³ n'a montré aucun signe d'inflammation à l'exception d'une seule différence significative présente immédiatement suivant la dernière exposition (semaine 0), suggérant que les macrophages n'ont eu aucun problème à effectuer la clairance des particules et, par conséquent, le poumon ne s'est retrouvé en aucun temps avec une surcharge particulaire (Bermudez et al., 2002). Il est intéressant de noter que la même étude a été effectuée chez le hamster et que ce dernier avait une capacité de clairance nettement supérieure à celle observée chez le rat, avec une rétention retournant presque au niveau basal même chez le groupe exposé à 250 mg/m³, en plus d'être la seule des trois espèces qui est parvenue à réduire l'inflammation pulmonaire au niveau retrouvé chez le groupe contrôle et ce, dès la 26^e semaine suivant la dernière exposition.

3.5. Toxicité des PUF/nanoparticules chez les asthmatiques

De nombreuses études animales ont porté sur la capacité des PUF à aggraver l'état de santé des sujets atteints de maladies pulmonaires, notamment chez les asthmatiques (Hussain et al., 2011; Alessandrini et al., 2006; de Haar et al., 2005; de Haar et al., 2006). Ces études ont toutes montré que plusieurs types de PUF, tel le noir de carbone, le carbone élémentaire et le TiO₂, augmentent l'inflammation pulmonaire causée par la réaction asthmatique. De plus, les nano-TiO₂ et les nanotubes de carbones ont aussi la capacité d'agir en tant qu'adjuvant lorsque les sujets y sont exposés durant la phase de sensibilisation à l'allergène et ainsi augmenter la réponse inflammatoire engendrée par une exposition subséquente à l'allergène seulement (Larsen et al., 2010; Nygaard et al., 2009). Chez l'humain, Penttinen et al. (2001) ont signalé une corrélation négative entre la concentration de particules dans l'air ambiant, notamment les PUF, et la capacité pulmonaire des individus atteints d'asthme. Dans le même ordre d'idées, d'autres études ont montré que les sujets asthmatiques renaient une plus grande proportion de PUF que les sujets sains au repos, mais que les globules blancs sanguins, tels les monocytes et les lymphocytes, et l'expression de la molécule « intercellular adhesion molecule-1 » (ICAM-1), une molécule d'adhésion endothéliale importante impliquée dans la migration transépithéliale des neutrophiles, étaient diminués suivant l'inhalation de PUF autant chez les sujets sains que chez les asthmatiques (Frampton et al., 2006; Pietropaoli et al., 2004; Frampton et al., 2004).

Très peu d'études sur la toxicité pulmonaire de l'inhalation de nano-TiO₂ chez les asthmatiques ont été réalisées et leurs résultats sont contradictoires. D'un côté, Hussain et al. (2011) ont récemment rapporté qu'une exposition oropharyngée aux nano-TiO₂ aggravait l'inflammation et l'hyperréactivité bronchique dans un modèle d'asthme induit par le diisocyanate chez la souris. Par ailleurs, de Haar et al. (2006) ont aussi présenté des résultats montrant une augmentation de l'inflammation pulmonaire reliée à une exposition par instillation intratrachéale aux nano-TiO₂ dans un modèle d'asthme induit par l'OVA chez la souris. D'un autre côté, Rossi et al. (2010) ont observé sans surprise que chez les souris saines une exposition par inhalation à 10 mg/m³, 2h/d pendant 3 d, à la forme rutile de nano-TiO₂ se traduit par une augmentation du nombre de neutrophiles et de l'expression de CXCL5, une chimiokine impliquée dans le recrutement des neutrophiles, dans les poumons. Par contre, chez les souris asthmatiques sensibilisées et provoquées à l'OVA, leurs résultats ont dévoilé que la même exposition aux nano-TiO₂ s'est traduite par une atténuation de l'inflammation causée par la provocation allergénique, en diminuant le nombre de macrophages, d'éosinophiles, de lymphocytes, et des cytokines Th2, et en réduisant l'hyperréactivité bronchique et la production de mucus. Cet effet « protecteur » des nano-TiO₂ a aussi été soulevé par Park et al. (2009), qui ont observé que l'augmentation de l'inflammation pulmonaire, de l'hyperréactivité bronchique, des cytokines (IL-4, IL-5 et IL-13) et du facteur de transcription GATA-3, impliqué dans le développement des lymphocytes T et la sécrétion de IL-4, IL-5 et IL-13 par les lymphocytes T auxiliaires (Wilson, 2008), induite par la provocation à l'OVA, sont atténuées suite à une exposition aux nano-TiO₂. Cet effet des nano-TiO₂ au niveau de l'inflammation pulmonaire chez les asthmatiques a aussi été observé par Last et al. (2004a), qui ont étudié d'autres particules ultrafines en concomitance, c'est-à-dire la suie et le fer. Cette étude, qui utilisait un modèle de souris sensibilisées à l'ovalbumine et provoquées de façon répétée (10 mL contenant 1% d'ovalbumine, 1 h/d, 3 d/sem, jusqu'à 6 semaines), a montré que l'inhalation de 250 µg/m³ de ces particules, 4h/d, 3 fois/sem n'affectait pas le nombre de cellules inflammatoires pulmonaires lorsque les particules étaient inhalées pendant 2 semaines immédiatement précédant ou suivant 4 semaines d'expositions à l'ovalbumine. Par contre, lorsque les particules et l'ovalbumine étaient inhalées en concomitance pendant 6 semaines consécutives, l'inflammation pulmonaire était inférieure au groupe exposé à l'ovalbumine seule.

3.6. Mécanismes de toxicité des PUF/nanoparticules

L'induction de l'inflammation causée par l'exposition par inhalation aux PUF se produit lorsque les défenses de l'organisme, e.g. macrophages alvéolaires, sont surchargées et qu'il y a oxydation des cellules. L'état d'oxydoréduction cellulaire est un équilibre homéostatique essentiel au fonctionnement normal de toute cellule. Une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) pourrait provoquer un déséquilibre dans le système de défense antioxydant et ainsi induire un stress oxydatif, définit comme une réduction du ratio cellulaire de l'antioxydant glutathion réduit (GSH) / glutathion disulfide oxydé (GSSH) (Li et al., 2003). D'un point de vue fonctionnel, le stress oxydatif est une réponse cellulaire qui active plusieurs cascades de réactions déclenchées par un déséquilibre dans l'état d'oxydoréduction de la cellule. Parmi les nombreux mécanismes ayant été proposés afin d'expliquer le potentiel de toxicité pulmonaire des particules, la surproduction d'ERO et le stress oxydant sont ceux qui ont reçu le plus d'attention (Nel et al., 2006). Le processus derrière la production d'ERO suite à une exposition aux particules n'est pas encore bien compris. Certains stipulent que, suite à la phagocytose des particules par les macrophages, il y a activation du complexe enzymatique NADPH oxydase à partir de la membrane des phagosomes et que ce complexe serait responsable de la production d'ERO (Beck-Speier et al., 2005; Dörger & Krombach, 2000). D'autres croient plutôt qu'une réaction entre les particules et les radicaux libres présents dans le milieu intracellulaire serait à la source de la production d'ERO (Gurgueira et al., 2002; Imrich et al., 1999). Certains ont par ailleurs soulevé la possibilité que les particules puissent être libérées dans le milieu intracellulaire au cours de la fusion des phagosomes avec les lysosomes et ainsi être libre d'interagir avec la membrane des organelles intracellulaires, telles les mitochondries, pour induire la production d'ERO (Nel et al., 2006; Xia et al., 2006; Xia et al., 2004).

La première ligne de défense des cellules, lorsqu'il y a augmentation de la production d'ERO, se fait par l'activation du facteur de transcription « nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), qui active à son tour la transcription de plus de 200 agents de détoxification (antioxydants) (Cho et al., 2006; Li & Nel, 2006). Si ce mécanisme de défense cellulaire n'est pas suffisant pour répondre au stress oxydant induit par les particules à travers la production d'ERO, l'état d'oxydoréduction de la cellule se retrouvera en déséquilibre et des facteurs pro-inflammatoires intracellulaires sensibles à ces changements, tels « Mitogen-activated protein kinase » (MAPK) et « Nuclear factor-kappa B » (NF- κ B), activeront les cascades de réactions

responsables de l'expression de médiateurs de l'inflammation (cytokines, chimiokines, molécules d'adhésion, etc.) (Xiao et al., 2003). Tel que mentionné plus tôt, la production et libération de ces médiateurs sont responsables de l'induction de l'inflammation au niveau du site affecté par le contaminant exogène.

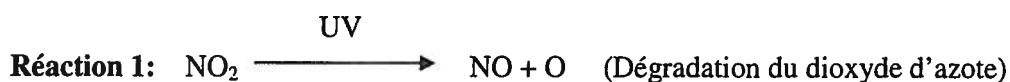
SECTION 4:

DONNÉES GÉNÉRALES SUR L'OZONE

Avant d'élaborer sur la formation de l'ozone et sa toxicité, il est important de préciser le contexte du type d'ozone dont nous allons traiter dans ce chapitre. Très souvent en regard avec la pollution atmosphérique on traite de la protection de la couche d'ozone. Ce contexte transporte une connotation positive à l'endroit de l'ozone et avec raison, étant donné son importance au niveau de la stratosphère, c'est-à-dire entre 15 et 40 km d'altitude. L'ozone dont il sera question dans ce chapitre est celui qui se retrouve dans la troposphère, c'est-à-dire au niveau du sol et jusqu'à environ 10 km d'altitude, car c'est à ce dernier que l'être humain se retrouve exposé et il est donc important d'évaluer sa toxicité sur les diverses fonctions physiologiques, notamment au niveau pulmonaire. Tout comme lors du chapitre précédent, la voie d'exposition priorisée ici sera celle de l'inhalation.

4.1. Qu'est-ce que l'ozone ?

L'ozone est une molécule très instable formée de 3 atomes d'oxygène (O_3). C'est un gaz incolore qui a une odeur forte avec un seuil olfactif très bas de 0,1 ppm (Centre canadien d'hygiène et de sécurité au travail, 2003). Au niveau du sol, il est formé à partir du dioxyde d'azote (NO_2), provenant, entre autres, de la combustion d'essence des voitures, et des rayons ultraviolets (UV). Lorsque les rayons UV entrent en contact avec le NO_2 , ce dernier se décompose de façon radicalaire en une molécule d'oxyde d'azote (NO) et un atome d'oxygène (O) (Réaction 1). Ensuite, l'atome d'oxygène nouvellement libéré va se combiner avec une molécule d'oxygène (O_2) présente dans l'air pour former l' O_3 (Réaction 2). Le NO peut ensuite neutraliser l' O_3 en réagissant avec ce dernier afin de produire du NO_2 et de l' O_2 (Réaction 3). Notons qu'en plus de contribuer à la formation d'ozone, la combustion d'essence rejette des hydrocarbures dans l'air qui contiennent des radicaux libres réagissant avec le NO, ce qui empêche ce dernier d'interagir avec l' O_3 afin de le dégrader (Muller & Bartsch, 1997).





Étant donné le nombre important d'études portant sur le potentiel de toxicité de l'ozone, les instances gouvernementales de la plupart des pays industrialisés ont établi des limites d'expositions à ce contaminant atmosphérique. Au Canada, depuis 2010, la valeur d'exposition acceptable à l'ozone est une moyenne de 0,065 ppm (parties par million) sur une période de 8 heures (Le Conseil canadien des ministres de l'environnement, 2000). Aux États-Unis, l'Agence de Protection de l'Environnement (US EPA) propose une limite de 0,075 ppm pour la même durée et de 0,12 ppm pour 1 heure d'exposition selon les valeurs du National Ambient Air Quality Standards (NAAQS) (US EPA, 2009). Du côté de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la ligne directrice sur l'exposition à l'ozone a été réduite en 2005, passant de $120 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (0,056 ppm) à $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (0,047 ppm) (WHO, 2005). L'OMS a justifié cette réduction en citant des études épidémiologiques qui « ont révélé des associations positives, faibles, mais convaincantes, entre la mortalité journalière et les concentrations d'ozone ».

4.2. Toxicité pulmonaire de l'ozone : Études épidémiologiques

Les grands milieux urbains sont souvent utilisés pour étudier les effets de la pollution atmosphérique à l'ozone chez les asthmatiques parce qu'ils sont reconnus pour souvent dépasser les limites d'exposition acceptables établies par les instances gouvernementales (Cody et al., 1992). Une association importante existe entre l'augmentation de la concentration d'ozone dans l'air ambiant et les répercussions cliniques chez les sujets asthmatiques. Une augmentation de la morbidité et de la mortalité a d'ailleurs été rapportée lorsque la concentration d'ozone s'élève au-delà de 0,1 ppm dans la ville de New York (George et al., 1997). Dans cette même région, une étude rétrospective de 5 ans a montré qu'il y avait une augmentation des visites à l'hôpital de 28 % chez les asthmatiques lorsque le niveau d'ozone moyen dépasse 0,06 ppm (Weisel et al., 1995). Quant à la probabilité de subir des crises asthmatiques, Holguin et al. (1985) ont montré que ce chiffre était plus élevé lorsque la concentration d'ozone s'élevait entre 0,02 et 0,16 ppm. En Californie, une région reconnue pour dépasser les limites acceptables d'ozone atmosphérique établies par l'EPA, des études ont montré que l'augmentation d'ozone, indépendamment des autres polluants, était

associée à une augmentation de l'incidence du cancer du poumon et de la mortalité reliée à ce type de cancer chez les non-fumeurs (Beeson et al. 1998; Abbey et al., 1999).

Chez les enfants asthmatiques, l'augmentation de l'ozone en milieu urbain a aussi été associée à une augmentation de la prise de médicaments (Eggleston et al., 1998). Parmi les asthmatiques, les enfants seraient, selon certaines études, à risque de subir une exacerbation de leur réaction asthmatique induite par l'augmentation du niveau d'ozone dans l'air. En effet, plusieurs études portant sur le lien entre l'ozone ambiant et l'asthme en milieux urbains, comme à Mexico et à Atlanta, ont trouvé des corrélations entre les niveaux d'ozone et les effets néfastes reliés à la réaction asthmatique (Romieu et al., 1996; White et al., 1994). Lors d'une étude prospective de 10 ans chez les enfants asthmatiques dans le sud de la Californie, Peters et al. (1999) ont montré une association entre les concentrations élevées d'ozone atmosphérique (pics d'expositions) et une réduction de la capacité vitale forcée (CVF) et du volume expiratoire maximal par seconde (VEMS), des mesures de la capacité pulmonaire. Par contre, d'autres ont plutôt nuancé ces propos en considérant le potentiel toxique d'autres polluants atmosphériques. Par exemple, lors d'une autre étude prospective de 10 ans, les différences observées au niveau de la capacité respiratoire chez les enfants asthmatiques étaient associées aux variations des concentrations de particules atmosphériques plutôt qu'à l'ozone (Avol et al., 2001).

Quoique les études épidémiologiques soient d'excellents outils pour évaluer les effets des concentrations réelles de divers contaminants atmosphériques chez un grand nombre d'individus, sans subir les contraintes éthiques pouvant limiter la capacité d'étudier les sujets à risque lors des études expérimentales chez les humains, l'une des plus grandes difficultés est de pouvoir associer avec certitude un effet toxique mesuré chez une population donnée à un seul paramètre causal. Puisque l'ozone se retrouve en compagnie d'autres contaminants atmosphériques lorsque les individus asthmatiques y sont exposés, il est souvent difficile de dissocier l'exposition à l'ozone de celle aux autres contaminants lorsqu'un effet toxique est observé. Par exemple, une étude sur les admissions hospitalières dans le sud de l'Ontario a observé une corrélation entre les niveaux d'ozone et de dioxyde de soufre (SO_2) durant l'été et le nombre d'admissions chez les patients asthmatiques, mais les auteurs ne sont pas parvenus à attribuer cette corrélation de façon spécifique à l'un ou l'autre de ces contaminants (Bates & Sizto, 1987). Lors d'une autre étude analysant le lien potentiel entre une augmentation d'ozone, de dioxyde de soufre et de particules et une augmentation du nombre de mortalités

au Mexique entre 1990 et 1992, les auteurs ont trouvé que le risque de mortalité était plutôt associé à l'augmentation de particules qu'à l'augmentation de l'ozone, mais ils ont tout de même conclu que cette distinction était difficile étant donné la complexité et la variabilité des mélanges de polluants auxquels les individus étaient exposés de façon quotidienne (Borja-Aburto et al., 1997). En revanche, une étude chez les fumeurs asthmatiques a montré un lien entre le tabagisme et l'augmentation de la morbidité chez ces sujets lors des expositions à l'ozone (Cassino et al., 1999). Enfin, certaines études ayant ajusté leurs données pour considérer l'importance d'autres facteurs sur les effets néfastes chez les asthmatiques (e.g. statut socioéconomique, température, présence d'autres polluants) ont trouvé que l'association entre l'ozone et l'exacerbation de la réaction asthmatique persistait néanmoins (Yang et al., 2003; Cody et al., 1992).

4.3. Toxicité pulmonaire de l'ozone : Études expérimentales chez l'être humain

Plusieurs études ont montré que des expositions à l'ozone seul en milieu contrôlé induisent une inflammation au niveau des voies respiratoires chez les sujets sains. Chez l'humain par exemple, Devlin et al. (1991) ont exposé des hommes à 0,08 ou 0,10 ppm d'ozone pendant 6,6 heures en les soumettant à un exercice modéré. Des lavages bronchoalvéolaires, effectués 18 heures suivant la fin des expositions, ont révélé une augmentation des cellules et médiateurs de l'inflammation, tels les neutrophiles, prostaglandine E₂, IL-6 et lactate déshydrogénase pour les deux concentrations d'ozone. Ils ont aussi noté une diminution de la capacité phagocytaire des macrophages alvéolaires. Les mêmes auteurs ont par la suite montré que les augmentations de neutrophiles et des médiateurs de l'inflammation mentionnés plus haut survenaient dès 1 heure suivant l'exposition à 0,4 ppm durant 2 heures lors d'un exercice intense intermittent (Devlin et al., 1996). Les auteurs mentionnent toutefois que ces changements biochimiques résultants de l'exposition à l'ozone sont réversibles. Les résultats de ces études sont conformes avec ceux de Frampton et al. (1997), qui ont montré qu'une exposition de 4 heures à 0,22 ppm d'ozone chez les sujets sains augmentait l'IL-6 et l'IL-8, avec une augmentation plus marquée immédiatement suivant l'exposition comparativement à 18 heures plus tard, ainsi que le nombre de neutrophiles, lymphocytes et mastocytes, avec une augmentation plus marquée 18 heures suivant l'exposition. Les neutrophiles sont d'ailleurs reconnus pour être responsables de la toxicité aiguë des cellules épithéliales pulmonaires suivant l'exposition à l'ozone (Basset et al., 2001).

Chez les enfants sains, Frischer et al. (1993) ont effectué des lavages bronchoalvéolaires pour mesurer l'inflammation pulmonaire lors de périodes où la concentration d'ozone atmosphérique était soit élevée (concentration journalière maximale > 0,05 ppm) ou soit basse (concentration journalière maximale < 0,04 ppm). Leurs résultats ont montré une association dose-dépendante de l'exposition à l'ozone sur le nombre de neutrophiles présents dans les BAL et sur la concentration des protéines cationiques éosinophiles. Lors d'une étude subséquente, ce même groupe a montré une association dose-dépendante de l'exposition à l'ozone sur la protéine X des éosinophiles, un marqueur urinaire (non invasif) utilisé pour mesurer la variation de l'activité des éosinophiles dans le corps. Quoique ce marqueur soit normalement utilisé pour mesurer l'activité intestinale des éosinophiles, les auteurs ont conclu que l'augmentation mesurée suite à l'exposition à l'ozone par voie d'inhalation provenait probablement d'une augmentation de l'activité des éosinophiles dans le poumon (Frischer et al., 2001).

Étant donné que la toxicité reliée à l'inhalation d'ozone se traduit par une inflammation et une diminution de la fonction pulmonaire chez les sujets sains, plusieurs études se sont penchées sur le cas des personnes souffrant d'une condition pulmonaire, comme l'asthme, afin de vérifier la susceptibilité de ces sujets d'être affectés par une exposition à l'ozone. En effet, Scannel et al. (1996) ont voulu vérifier cette hypothèse en exposant des sujets asthmatiques à 0,2 ppm d'ozone pendant 4 heures lors d'un exercice physique. Leurs résultats ont montré une diminution de la fonction pulmonaire, mesurée notamment par le VEMS et la CVF, et une augmentation du pourcentage de neutrophiles et de plusieurs médiateurs de l'inflammation, dont l'IL-8 et le GM-CSF, lorsque comparées aux sujets asthmatiques exposés à l'air. Horsmann et al. (1995), qui ont exposé des individus asthmatiques et sains à 0,16 ppm d'ozone pendant 7 heures lors d'exercices physiques modérés intermittents, ont eux aussi observé une réduction significative du VEMS, mais pas de la CVF. Lors d'une étude récente, la toxicité de l'exposition à l'ozone a été analysée chez des sujets atopiques asthmatiques et des sujets atopiques non asthmatiques. Les deux groupes ont été exposés à 0,4 ppm d'ozone pendant 2 heures lors d'un exercice physique intermittent. Chez les deux groupes, l'exposition à l'ozone s'est traduite par une augmentation de neutrophiles et d'IL-8 comparativement aux mesures prises avant l'exposition. Les niveaux d'IL-6, IL-1 β , « macrophage Toll-like factor 4 », Fc ϵ RI et CD23 ont augmenté chez les atopiques asthmatiques, mais pas chez les atopiques non-asthmatiques. Les auteurs suggèrent que les atopiques asthmatiques ont un

risque plus élevé de subir une exacerbation de la toxicité pulmonaire induite par l'ozone à travers la promotion de la réponse immunitaire innée (Hernandez et al., 2010).

4.4. Toxicité pulmonaire de l'ozone : Études expérimentales chez les animaux

Une inflammation des voies respiratoires a été notée chez toutes les espèces animales exposées à l'ozone (Bascom et al., 1996). Chez le singe rhésus exposé à 0,4 et 1 ppm d'ozone, une augmentation dose-dépendante de l'inflammation pulmonaire et des cellules épithéliales ont aussi été notées (Plopper et al., 1998). Chez le cochon d'Inde, une exposition de 90 minutes à 2,15 ppm d'ozone s'est traduite par une bronchoconstriction et une augmentation du rythme respiratoire 5 heures suivant la fin de l'exposition, ainsi que par une augmentation de l'inflammation, c'est-à-dire du nombre de macrophages, neutrophiles et éosinophiles, et de l'œdème pulmonaire 12, 24 et 48 heures après l'exposition (Toward & Broadley, 2002). Une exposition à 0,8 ppm d'ozone pendant 3 heures chez la souris a provoqué une augmentation de leucocytes et de protéines totales présentes dans les BAL, avec un maximum atteint entre 24 et 48 heures (Fakhrzadeh et al., 2002). Toujours chez la souris, une exposition aiguë unique de 2 heures à 3 ppm s'est traduite par une augmentation significative des leucocytes totaux, marquée principalement par une augmentation des neutrophiles, dans les BAL 12 heures suivant l'exposition ; aucun changement n'a été mesuré chez les éosinophiles et les lymphocytes, tandis que le nombre de macrophages a diminué de façon non significative. Les analyses des concentrations de cytokines mesurées dans les BAL ont montré une augmentation significative de l'IL-5, du « granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) et du granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF), des médiateurs importants des éosinophiles et/ou macrophages. Il est surprenant que le nombre de cellules n'ait pas aussi augmenté. De plus, les résultats sur la résistance des voies respiratoires en réponse à l'exposition à l'ozone se sont avérés contradictoires, montrant une augmentation significative lorsque mesurée par pléthysmographie (animal entier) et aucun changement lorsque mesurée sur des coupes de trachées (*ex vivo*) (Kierstein et al., 2008). Chez le rat Brown Norway, le modèle utilisé dans cette thèse, Wagner et al. (2007) ont exposé les animaux à 1 ppm d'ozone, 8 heures par jour, pendant deux jours. Des BAL effectués 24 heures plus tard ont révélé une tendance de l'ozone à augmenter l'inflammation pulmonaire, c'est-à-dire les leucocytes totaux, les neutrophiles, les macrophages, mais pas les éosinophiles, lorsque comparés à des animaux témoins exposés à l'air. Ces augmentations n'étaient cependant pas statistiquement

significatives. Les mesures de certains médiateurs de l'inflammation, tels les leucotriènes B₄, IL-6 et « cysteinyl leukotriene 1 » (Cys-LT1) ont diminué de façon non significative, tandis que le « monocytes chemoattractant protein 1 » (MCP-1) a augmenté de façon non significative. En contrepartie, une autre étude chez le rat Brown Norway a montré qu'une exposition de 6 heures à 1,2 ppm d'ozone provoquait une augmentation du nombre d'éosinophiles dans les BAL, qui était 3 et 15 fois supérieures immédiatement et 20 heures suivant l'exposition, respectivement, lorsque comparé aux rats témoins exposés à l'air (Ishi et al., 1998). Cette augmentation du nombre d'éosinophiles chez le rat Brown Norway à la suite d'une exposition à l'ozone, qui survient aussi chez d'autres espèces tels l'être humain et le cochon d'Inde (Frischer et al., 2001; Yost et al., 2005), est d'ailleurs une conséquence importante la réaction inflammatoire qui survient chez les asthmatiques, comme mentionné plus tôt.

Quoique plusieurs études ont en commun d'analyser les effets de l'inhalation d'ozone chez les êtres humains asthmatiques, des raisons éthiques limitent les études expérimentales chez les personnes en cours de réaction asthmatique, c'est-à-dire lorsque les poumons se retrouvent affectés par les symptômes, dont l'inflammation. Les modèles animaux sont donc d'excellents outils pour étudier les effets pulmonaires de l'inhalation d'ozone en cours de réaction asthmatique, c'est-à-dire lors de la provocation allergénique. Toutefois, très peu d'articles ont été publiés sur le sujet et les résultats présentés sont contradictoires. Tout d'abord, des souris sensibilisées et provoquées avec l'allergène *Aspergillus fumigatus* ont été exposées à 3 ppm d'ozone pendant 2 heures, débutant 82 heures suivant la provocation allergénique. Les résultats des BAL, effectués 12 heures suivant la fin de l'exposition à l'ozone (96 heures suivant la provocation allergénique), ont montré une augmentation significative des leucocytes totaux chez les animaux exposés à l'ozone lorsque comparés à ceux exposés à l'air. Quoique les nombres de macrophages, éosinophiles, neutrophiles et lymphocytes aient tous augmenté, seuls les éosinophiles étaient significativement plus élevés. Ces résultats sont appuyés par les niveaux de cytokines dans les BAL, qui étaient significativement plus élevés pour l'IL-5, le G-CSF et le GM-CSF, mais pas pour l'IL-4. Les analyses de la résistance de voies respiratoires, mesurées par pléthysmographie et par des coupes de trachées, ont montré une augmentation de l'hyperréactivité bronchique provoquée par l'exposition à l'ozone. Il est intéressant de noter que lors de cette même étude, l'exposition à l'ozone chez le rat sain a augmenté l'apoptose cellulaire, mais que chez le rat asthmatique elle l'a diminué de façon significative par rapport au groupe exposé à l'ozone seul et aussi au groupe asthmatique

exposé à l'air (Kierstein et al., 2008). Dans le même ordre d'idée, Farraj et al. (2010) ont exposé des souris sensibilisées (jour 0) et provoquées (jours 14 et 28) à l'ovalbumine à 0,5 ppm d'ozone pendant 5 heures une fois par semaine (jours 3, 10, 17 et 24). Au jour 29, c'est-à-dire 1 jour suivant la dernière provocation et 5 jours suivant la dernière exposition à l'ozone, les éosinophiles et les neutrophiles étaient significativement plus élevés (85% et 103%, respectivement) chez les animaux exposés à l'ovalbumine et à l'ozone lorsque comparés aux animaux exposés à l'ovalbumine seule ; aucune différence pour les macrophages et lymphocytes. Par contre, chez ces mêmes souris, seul le MCP-1 était significativement plus élevé dans les BAL ; aucune différence ne fut observée pour l'IL-4 et l'IL-5. De plus, les mesures de résistance pulmonaire n'ont révélé aucun effet de l'ozone. Les deux études décrites ci-haut ont donc montré une exacerbation de la réponse inflammatoire asthmatique provoquée par l'exposition à l'ozone. En revanche, une étude de Wagner et al. (2007) a montré, chez des rats Brown Norway sensibilisés et provoqués à l'ovalbumine, qu'une exposition de 2 jours à 1 ppm d'ozone pendant 8 heures augmentait seulement les neutrophiles de façon significative dans les BAL des animaux lorsque comparé aux animaux asthmatiques exposés à l'air 1 jour suivant la dernière exposition à l'ozone et 4 jours suivant la dernière provocation. Étonnamment, malgré le manque d'effet de l'ozone sur plusieurs globules blancs importants, tels les éosinophiles et les macrophages, et sur l'inflammation totale, plusieurs médiateurs de l'inflammation, dont MCP-1, IL-6 et Cys-LTs étaient augmentés dans les BAL.

Quelques études ont vérifié les effets pulmonaires de l'ozone dans des modèles animaux de provocations allergéniques répétées. Tout d'abord, Last et al. (2004b) ont exposé des souris sensibilisées à l'ovalbumine à 0,2 ou 0,5 ppm d'ozone, 8 h/nuit, pour une période allant de 2 à 6 semaines et à l'ovalbumine 1 h/d, 3 d/sem (10 ml à 1% ovalbumine) de 4 à 6 semaines (quatre scénarios d'expositions ont été utilisés). Leurs résultats cellulaires ont montré une diminution significative du nombre de leucocytes totaux lorsque les expositions à l'ozone et à l'ovalbumine étaient effectuées en concomitance, mais aucune différence lorsque les animaux étaient exposés pendant 2 semaines à l'ozone suivies de 4 semaines à l'ovalbumine ou de 4 semaines à l'ovalbumine suivies de 2 semaines à l'ozone. Par contre, lors d'une autre étude, des singes sensibilisés à l'allergène *dermatophagoides pteronyssinus* ont été exposés à 11 épisodes (5 jours d'exposition à l'allergène et/ou ozone, suivis de 9 jours d'exposition à l'air filtrée) à une concentration de 0,5 ppm d'ozone 8 h/d. Les effets des expositions à l'allergène et à l'ozone sur l'inflammation pulmonaire étaient modestes, résultant uniquement en une

augmentation des éosinophiles lorsque comparés au groupe témoin et au groupe exposé à l'allergène et à l'air (Schelegle et al., 2003).

4.5. Mécanismes de toxicité pulmonaire de l'ozone

L'ozone est un agent oxydant causant une cascade de réactions menant à la formation de radicaux libres responsables de l'induction de l'inflammation pulmonaire. Tout d'abord, l'ozone entre en contact avec l'épithélium bronchique ou alvéolaire. En fait, la réactivité très élevée de l'ozone fait en sorte qu'il est complètement « consommé » par les cellules tapissant les voies aériennes, dont les cellules épithéliales. Les membranes cellulaires contiennent des quantités importantes d'acides gras polyinsaturés, libres ou faisant partie des lipoprotéines, qui réagissent avec l'ozone pour former une série de composés menant à la formation d'aldéhydes et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ces réactions d'oxydation lipidique, causant des dommages importants aux membranes cellulaires et libérant plusieurs radicaux libres lipidiques, sont à l'origine de l'inflammation provoquée par une exposition à l'ozone en agissant sur les voies de signalisations intracellulaires, induisant la synthèse et la sécrétion de médiateurs de l'inflammation de la part des cellules épithéliales et des macrophages alvéolaires (Pryor et al., 1995; Uhlson et al., 2002). Une étude a d'ailleurs montré que de faibles concentrations d'ozone (0.05-0.2 ppm) augmentent la production et la concentration d'ATP extracellulaire, un marqueur de lésions cellulaires, de 10 fois sept minutes suivant le début de l'exposition (Ahmad et al., 2005).

HYPOTHÈSES DE RECHERCHE

La littérature suggère un potentiel de toxicité relié à l'inhalation d'éthanol, d'ozone ou de nano-TiO₂. Des études ont rapporté que l'inhalation d'éthanol est en mesure de provoquer une crise chez certains individus asthmatiques. Aucune étude n'a cependant été effectuée pour vérifier si l'éthanol peut moduler la réponse inflammatoire pulmonaire en cours de réaction asthmatique. En outre, des études épidémiologiques ont montré une association entre l'augmentation des concentrations d'ozone atmosphériques et la morbidité chez les individus souffrant d'un désordre pulmonaire, comme chez les asthmatiques. Par contre, les résultats des études expérimentales chez les animaux asthmatiques, quoique peu nombreuses, n'ont pas toujours montré une toxicité suite à des expositions à l'ozone. Finalement, des études expérimentales sur les nano-TiO₂ ont montré leur capacité à induire une inflammation pulmonaire chez les animaux sains. Cependant, seulement quelques études ont été effectuées chez les asthmatiques et ces dernières se sont avérées contradictoires quant à la toxicité pulmonaire des ces particules.

Nous émettons l'hypothèse que l'exposition, simple ou répétée, à ces trois contaminants de l'air peut accentuer l'inflammation pulmonaire chez le rat Brown Norway sensibilisé à l'ovalbumine, modèle expérimental utilisé pour extrapoler leur toxicité potentielle chez les sujets asthmatiques. Cette thèse de doctorat a donc pour objectif principal d'étudier l'inflammation pulmonaire dans un modèle animal d'asthme allergique dans lequel les animaux sont exposés à des vapeurs d'éthanol, à l'ozone ou à des nano-TiO₂. Ainsi, trois objectifs spécifiques sont poursuivis: (1) Étudier l'effet d'une exposition à l'éthanol par voie d'inhalation sur l'inflammation pulmonaire en mesurant le nombre de leucocytes pulmonaires, notamment les éosinophiles, au cours du développement, de la réponse maximale et de la récupération de la réponse inflammatoire pulmonaire chez le rat Brown Norway asthmatique; (2) Étudier l'effet d'une exposition à l'ozone par voie d'inhalation, seul ou en concomitance avec l'éthanol, sur l'inflammation pulmonaire en mesurant le nombre de leucocytes et de médiateurs de l'inflammation, et sur la trachée en mesurant la contractilité trachéale chez le rat Brown Norway asthmatique; (3) Étudier l'effet d'une exposition aux nano-TiO₂ par voie d'inhalation sur l'inflammation pulmonaire en mesurant le nombre de leucocytes et de médiateurs de l'inflammation chez le rat Brown Norway asthmatique.

DEUXIÈME PARTIE

PRÉSENTATION DES ARTICLES

SECTION 1:

IMPACT OF EMERGING POLLUTANTS ON PULMONARY INFLAMMATION IN ASTHMATIC RATS: ETHANOL VAPORS AND AGGLOMERATED TiO₂ NANOPARTICLES

Andrea Scarino, Alexandra Noël, Paolo M. Renzi, Yves Cloutier, Renaud Vincent, Ginette Truchon, Robert Tardif et Michel Charbonneau

Accepté pour publication dans *Inhalation Toxicology*, 24(8) : 528-538, 2012

1.1. Résumé français de l'article

Les nanoparticules de dioxyde de titane (nano-TiO₂) et les vapeurs d'éthanol sont des contaminants de l'air qui gagnent en importance. La présence d'une pathologie pulmonaire, telle que l'asthme, peut augmenter la susceptibilité des poumons à être affectés par ces contaminants. Cette étude visait à vérifier si l'inhalation de vapeurs d'éthanol ou de nano-TiO₂ peut moduler la réponse pulmonaire inflammatoire résultant d'une réaction asthmatique allergique chez le rat. Des rats Brown Norway ont été sensibilisés (s.c.) et provoqués (inhalation de 15 min, 14 d plus tard) avec l'ovalbumine (OVA) d'œufs de poulet. Les leucocytes ont été comptés dans le liquide des lavages bronchoalvéolaires (BAL), récoltés aux temps 6, 24, 36, 48 et 72 h suivant la provocation et immédiatement suivant la dernière exposition à l'éthanol (3000 ppm, 6 h/d) ou 48 h suivant la provocation (inflammation maximale) et immédiatement suivant l'exposition aux nano-TiO₂ (9.35 mg/m³ sous forme d'aérosol pendant 6 h). Pour les expositions aux nano-TiO₂, les cytokines présentes dans le plasma et dans le liquide des BAL ont été mesurées et des coupes histologiques des poumons ont été effectuées. Les résultats ont montré que l'exposition à l'éthanol chez les animaux asthmatiques (exposés à l'OVA) n'a pas changé les leucocytes des BAL de façon significative. L'exposition aux nano-TiO₂ a réduit les leucocytes des BAL de façon significative chez les animaux asthmatiques lorsque comparés aux asthmatiques exposés à l'air. Les niveaux d'IL-4, IL-6 et IFN- γ ont aussi été réduits par l'exposition aux nano-TiO₂ chez les asthmatiques. Quoique les vapeurs d'éthanol n'aient pas modifié l'inflammation pulmonaire des rats au cours d'une réaction asthmatique, étonnamment un effet protecteur des nano-TiO₂ agglomérées a été observé. Un mécanisme possible impliquant une réduction de la réponse Th2 causée par l'OVA est proposé. En conclusion, l'inflammation pulmonaire

allergique n'est pas augmentée par l'inhalation d'éthanol ou de nano-TiO₂. Au contraire, les nano-TiO₂ réduisent l'inflammation pulmonaire chez les rats asthmatiques.

1.2. Contribution de l'étudiant

L'étudiant a contribué à l'élaboration du projet de recherche, c'est-à-dire la planification de chaque expérience (avec l'aide et le soutien des directeurs de recherche et des collaborateurs). L'étudiant a aussi piloté et effectué chaque expérience du début à la fin, c'est-à-dire la commande des animaux et matériels nécessaires, les expositions aux contaminants, la collecte des échantillons lors des journées de sacrifices des animaux (avec l'aide de Guylaine Lassonde, technicienne du laboratoire du Dr Charbonneau, pour les sacrifices), la préparation et l'analyse des échantillons, l'interprétation des résultats (avec l'aide des collaborateurs) et la rédaction de l'article.

**IMPACT OF EMERGING POLLUTANTS ON PULMONARY INFLAMMATION IN
ASTHMATIC RATS: ETHANOL VAPORS AND AGGLOMERATED TiO₂
NANOPARTICLES**

Running title: Inhalation of pollutants in asthmatic rats

**A Scarino¹, A Noël², PM Renzi³, Y Cloutier⁴, R Vincent⁵, G Truchon⁴, R Tardif² and M
Charbonneau¹**

¹ INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, Quebec, Canada.

² Département de santé environnementale et santé au travail. Université de Montréal,
Montreal, Quebec, Canada.

³ CHUM Research Center, Notre-Dame Hospital, Montreal, Quebec, Canada.

⁴ Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST), Montreal,
Quebec, Canada.

⁵ Inhalation Toxicology Laboratory, Healthy Environments and Consumer Safety Branch,
Health Canada, Ottawa, Ontario, Canada.

Please address correspondence to:

Michel Charbonneau, Ph. D.
Institut national de la recherche scientifique - Institut Armand-Frappier
Université du Québec
531, boul. des Prairies
Laval, Québec
Canada
H7V 1B7
Tel.: (450) 687-5010 ext. 8831
Fax: (450) 686-5309
E-mail: michel.charbonneau@iaf.inrs.ca

ABSTRACT

Context:

Titanium dioxide nanoparticles (nano-TiO₂) and ethanol vapors are air contaminants with increasing importance. The presence of a pathological pulmonary condition, such as asthma, may increase lung susceptibility to such contaminants.

Objective:

This study aimed to investigate if exposure to inhaled ethanol vapors or nano-TiO₂ can modulate the rat pulmonary inflammatory response resulting from an allergic asthmatic reaction.

Materials and methods:

Brown Norway rats were sensitized (sc) and challenged (15 min inhalation, 14 d later) with chicken egg ovalbumin (OVA). Leukocytes were counted in bronchoalveolar lavages (BAL) performed at 6, 24, 36, 48 and 72h following the challenge and either after ethanol exposures (3000 ppm, 6 h/d, daily) or at 48 h (peak inflammation) for nano-TiO₂ exposures (9.35 mg/m³ aerosol for 6 and 42 h after the OVA challenge). For the nano-TiO₂ exposures, plasma and BAL cytokines were measured and lung histological analyses were performed.

Results:

Exposure to ethanol did not significantly affect BAL leukocytes after OVA-challenge. Exposure to nano-TiO₂ significantly decreased BAL leukocytes compared to OVA-challenged controls. Plasma and BAL IL-4, IL-6, and INF- γ levels were also decreased in the nano-TiO₂ group.

Discussion:

While ethanol vapors do not modify the pulmonary inflammation in rats during an asthmatic response, a surprising protective effect for agglomerated nano-TiO₂ was observed. A putative mechanistic basis involving a decrease in the Th2 response caused by OVA is proposed.

Conclusion:

Allergic pulmonary inflammation is not up-regulated by inhalation of the pollutants ethanol and nano-TiO₂. On the contrary, nano-TiO₂ decreases lung inflammation in asthmatic rats.

INTRODUCTION

Asthma affects approximately 300 million individuals worldwide (WHO, 2008) and is characterized by bronchial obstruction, airway hyper-responsiveness and a sustained inflammatory response; children and adults suffering from asthma are more likely to be affected by several inhaled pollutants including volatile organic compounds (Rumchev et al., 2004; Arif & Shah, 2007). Amongst these, alcohol and titanium dioxide (TiO_2) are relatively new agents for which there have been few studies assessing their potential toxicity when inhaled by susceptible individuals.

Very little is known on the effects of ethanol through inhalation exposure. Although this entry route has been neglected in studies on ethanol toxicity, it is of growing concern. Indeed, the re-emergence of ethanol blended gasoline in several countries (Health Canada, 2010), the increasing use of hydro alcoholic solutions and gels in the health care sector, and other occupational exposures stemming from industrial uses such as in paints, varnishes, detergents, and distilleries/wineries have raised concerns over potential toxicity when ethanol vapors are inhaled. In France, ethanol represents 11% of all solvents and 50% of all alcohols used in the industrial sector (Triolet, 2005). Such uses imply that human beings find themselves exposed to various concentrations of ethanol vapors in the ambient air.

The impact of ethanol inhalation on the health of patients suffering from asthma has yet to be studied. A study on six healthy subjects showed that acute inhalation of ethanol vapors (2000 ppm, 30 min) caused a significant decrease in flow rates on partial expiratory flow-volume (PEFV) curves for up to 90 min without significantly affecting FEV1 values (Zuskin et al., 1981). Ingestion of ethanol (30 g over 5 to 10 min) did not change FEV1 in a group of 30 volunteers, but caused a fall in FEV1 associated with a rise in blood acetaldehyde and

histamine concentrations in 15 of 32 asthmatic subjects (Takao et al., 1998). Inhalation exposure to acetaldehyde caused bronchoconstriction indirectly via histamine release in asthmatic subjects, and nonspecific bronchial hyperresponsiveness appeared to be a necessary precondition for the expression of acetaldehyde-induced bronchoconstriction (Myou et al. 1993). In addition, in patients with alcohol-induced asthma, the evaluation of bronchial responsiveness showed that ascending doses of inhaled ethanol did not significantly affect FEV1, but that a higher dose of metacholine was necessary to decrease FEV1 by 20 % following ethanol inhalation (Myou et al., 1996). The authors concluded that in alcohol-induced asthma, ethanol can reduce non specific bronchial responsiveness. To this day, there have been no scientific articles studying ethanol as a potential modulator of the allergic airway response *in vivo*. Considering that about 90% of asthmatics suffer from allergic asthma, this question needs to be addressed.

Nanotechnologies are growing at a tremendous pace and today represent a multi billion dollar industry (Lux research, 2006). Due to their wide range of uses in various fields, although relatively new, nanoparticles (≤ 100 nm) are an important source of concern in occupational and environmental toxicology. TiO_2 nanoparticles (nano- TiO_2), which are chemically stable and relatively inexpensive, are used in industries for the manufacturing of paints, cosmetics, sunscreens, packaging, and many more (Chen & Mao, 2007). When inhaled by workers, nano- TiO_2 enters the lungs generally in a particulate form. Thus, aerosolized nano- TiO_2 in experimental studies represents the most realistic route of exposure (Pauluhn & Mohr, 2000; Pauluhn, 2005; Mühlfeld et al., 2008; Jacobsen et al., 2009). Although the initial size of nano- TiO_2 is in the nanometer range (< 100 nm), the actual size of the particles entering the lungs can be higher because of its tendency to agglomerate, especially at high concentrations (Hinds, 1999; Murr et al., 2004; Grassian et al., 2007a; Ma-Hock et al., 2007, 2009).

Characterization of nano-TiO₂ administered to experimental animals, despite its complexity, is therefore necessary in order to make adequate conclusions regarding nanoparticle exposure characteristics and resulting biological responses (Oberdörster et al., 2005; Warheit et al., 2007a, 2007b, 2007c, 2008, 2010; Pauluhn, 2009).

TiO₂ is classified as possibly carcinogenic to humans (group 2B) and is believed to induce inflammatory responses when inhaled as nanoparticles (Ma-Hock et al., 2009; Bermudez et al., 2002). While Rossi et al. (2010) observed that healthy mice elicited pulmonary neutrophilia accompanied by significantly increased chemokine CXCL5 expression when exposed to nano-TiO₂ by inhalation and that the allergic pulmonary inflammation was dramatically suppressed in asthmatic mice exposed to nano-TiO₂, Hussain et al. (2011) recently reported that intrapulmonary doses of TiO₂ or gold nanoparticles can aggravate pulmonary inflammation and airway hyperreactivity in a mouse model of diisocyanate-induced asthma. Given the importance of asthma worldwide and the increased use of engineered nanomaterials, notably nano-TiO₂, it is relevant to confirm their potential for toxicity in such susceptible populations.

This study aimed to determine if exposure to ethanol vapors or nano-TiO₂ can modulate the pulmonary inflammatory response associated with allergic asthma, through changes in the development, maximum response intensity or recuperation time. Brown Norway (BN) rats were sensitized subcutaneously with the allergen ovalbumin (OVA) and then challenged by inhalation with the same allergen 14 days later to induce lung inflammation. BAL were performed at various times following the challenge and pulmonary toxicity was assessed by counting leucocytes in BAL fluid, measuring cytokines levels in the blood, and analyzing

histological samples of the lungs. The effects of repeated exposures to ethanol vapors or a single exposure to nano-TiO₂ were assessed.

MATERIALS ET METHODS

Choice of animal model

In a previous study (Scarino et al., 2009), we assessed the pulmonary toxicity of ethanol vapors in Sprague-Dawley (SD) rats carrying an ALDH2 deficiency. BN rats, 6 to 8 weeks of age, were used in the present study instead of SD rats because of their higher pulmonary sensitivity to atmospheric pollutants (Tesfaigzi et al., 2005). Furthermore, BN rats are commonly used in animal studies on allergic asthma induced by OVA sensitization and challenge (Elwood et al., 1991; Renzi et al., 1993). Given that the only available data on ethanol inhalation toxicity was obtained using SD rats, we could not make the assumption that the BN strain would have the same metabolic, toxicological, and gender profiles. Therefore, the first step of this study was to gather information on the pulmonary and toxicokinetics of inhaled ethanol in both male and female BN rats in order to insure the absence of toxicity before moving on to asthmatic BN rats. A comparison of the toxicological profiles between both strains, i.e. BN rats from this study and SD rats from our previous study (Scarino et al., 2009), is presented in the Results section.

Induction of allergic asthma in rats

Male BN rats (6-8 weeks old) were used in this study. These animals are known to have an enhanced Th2 response, making them ideal for asthma studies. Chicken egg ovalbumin, a common allergen for this type of study, was used to induce allergic asthma in two phases, i.e. sensitization and challenge. Animals were sensitized by s.c. injection of 1 ml solution containing 0.9% saline (w/v), 1 mg ovalbumin, and 3.5 mg aluminum hydroxide (adjuvant).

Fourteen days later, animals were challenged for 15 min by inhalation with a freshly prepared 0.9% saline solution containing a specific OVA concentration (see below) (Renzi et al., 1992). A DevilBiss 5650D compressor was used to vaporize OVA solution from the nebulizer to the cage (2 rats/exposure).

To verify if ethanol vapors or nano-TiO₂ could modulate, upwardly or downwardly, the inflammatory asthma response caused by allergen inhalation, it was important to verify that OVA challenge alone did not cause maximum pulmonary inflammation. To that end, various OVA concentrations (1.5 to 5 %) were tested in order to find one that would cause around 30-40% of maximal pulmonary inflammation (defined as the response for the 5 % level).

The pulmonary response is determined by measuring increases in leukocytes, mainly eosinophils, in BAL and their mediators. The temporal profile following OVA challenge was assessed to determine the development, maximal intensity, and recuperation phases of the inflammatory response.

Ethanol exposure protocol

Animals (n = 8 per group) were kept on a 12 hour light/dark cycle in a humidity- and temperature-controlled room prior to experimentation. During inhalation exposures, animals were individually caged in the exposure chamber and were not provided with food or water. Animals were exposed to 3000 ppm ethanol (95%, Les Alcools de Commerce Inc., Montreal, Quebec), 6 h/d, every day starting immediately following OVA sensitization until the animals were killed.

Ethanol exposures were conducted in a dynamic exposure chamber of 500 L (Unifab, Kalamazoo, MI) for which the air-flow rate was set at 280 L/min. A high-pressure liquid chromatography (HPLC 2510) pump (Varian Canada, Montreal, Quebec) was used to deliver ethanol into the inhalation chamber. A Hewlett-Packard HP-5890 Series II gas chromatograph equipped with an Air Cadet pump (Cole Parmer model 7530-40) was used to monitor the ethanol concentration in the exposure chamber at 10 min intervals (Scarino et al., 2009).

Generation and measurements of nano-TiO₂ aerosols

Anatase nano-TiO₂ with a primary particle size of 5 nm were purchased from Nanostructured & Amorphous Materials Inc. (Texas, USA). Nano-TiO₂ aerosols were generated over 6.83 h in the same type of chamber used for ethanol exposures (500 L Unifab, Kalamazoo, MI), but equipped with six conical tubes placed on one wall of the inhalation chamber for rodent nose-only exposures. A small fan was placed inside the chamber at the opposite side of the wall with the conical tubes. The aerosols were generated by a dry NP powder dispersion technique, using a fluidized bed 3400A device (Fluidized Bed, TSI Inc., Shoreview, MN, USA). The low and high dose concentrations were achieved by adjusting the various feed rates of the generator. Each aerosol was generated with compressed air. No aerosol neutralizer was used.

Air samples were collected throughout the experiment on cassettes (Sure Seal, SKC Inc.) using 37-mm polyvinyl chloride (PVC) filters at a flow rate of 4 L/min for gravimetric analysis. The mass concentrations were followed and adjusted in real time using a Model 8520 Dust Trak Aerosol Monitor (TSI Inc., Shoreview, MN, USA) previously calibrated with TiO₂ by comparison with the gravimetric method. Numbers and particle size distributions were monitored in real time with an electrical low pressure impactor (ELPI) (Dekati Ltd., Tampere, Finland) which was operated at a flow rate of 10 L/minute in the filter stage

configuration. Cumulative size distributions were acquired for the entire aerosol generation period. The ELPI was also used to determine the median aerodynamic diameter based on the number (NMAD) (Noël et al., submitted). Air samples were all collected in the area of the inhalation chamber corresponding to the breathing zone of the animals.

Nano-TiO₂ exposure protocol

Animals (n = 6 per group) were exposed nose-only to nano-TiO₂ aerosols for 6 h (single exposure to 9.4 mg/m³ or 15.7 mg/m³), 42 h following the OVA challenge. Upon reception, animals were kept at the animal quarters for 1 week. Prior to TiO₂ exposure, animals were acclimatized to the inhalation system, i.e. individually placed in cylindrical tubes with a small opening for the nose at the conical end, insuring a nose-only exposure, for 6 days where they were exposed to compressed air: 15 min/d for the first three days and 3h/d for the following three days. The animals were killed immediately after the 6 h exposure, i.e. 48 h following the OVA challenge. Thus, there was no recuperation time between nanoparticle exposure and sacrifice.

Determination of blood ethanol concentration (BEC)

Ethanol being quickly metabolized in the organism using multiple pathways (Parkinson, 2001), blood samples were collected immediately (i.e. 2 min) following exposure to allow the assessment of peak BEC. A detailed method was previously described (Scarino et al., 2009). Briefly, blood samples (100 µl) were taken at 2, 20, and 40 min post exposure on days 1 and 22, and kept in sealed vials at -80 °C until analyzed, within 72 h. Concentrations were measured using a Varian Compak CP-3800 gas chromatograph with a Combi-Pal automatic injector from CTC Analytics (head-space sampling).

Bronchoalveolar lavages (BAL)

For ethanol exposures, BAL were performed in different groups of rats at 6, 24, 36, 48, and 72 h following OVA challenge, always immediately after the last ethanol exposure. For nano-TiO₂ exposures, BAL were performed 48 h following OVA challenge, immediately after nanoparticles exposure. The BAL preparation method was previously described (Scarino et al., 2009). Briefly, animals were anesthetized with isoflurane and exsanguinated from the descending abdominal artery. Saline (0.9%) was injected (5 X 5 ml) into the lungs through the trachea, using a 16G needle, and then removed. Following centrifugation of pooled BAL, supernatant was removed and the cells were re-suspended in 500 µl of saline (100 µl aliquot was fixed 1:1 with formalin for cell count). The lungs and the trachea were fixed *in situ* with buffered formalin and then removed and placed in containers with formalin at room temperature for 24 h, before being transferred into phosphate buffer solution and kept at 4°C.

Cell count

Fixed white blood cells (WBC) were mixed 1:1 with methylene blue and then counted using a hemacytometer. To determine the proportion of WBC represented by macrophages, eosinophils, neutrophils, or lymphocytes, 100 µl of the previously re-suspended cells in saline were centrifuged at 600 rpm for 2 min using a Cytospin, followed by fixation and staining with Hema 3 solutions (Fisher Diagnostics no cat. 122-911A, 122-911B, and 122-911C). Slides were analyzed using a photonic microscope.

Cytokine analysis in plasma and BAL

The plasma concentrations of seven cytokines relevant to asthma inflammation were measured using the Milliplex Rat Cytokine Kit (Millipore, Ottawa, Canada): MCP-1, IL-1β, IL-4, IL-6, IL-10, INF-γ, and TNF-α. Assays were performed using Luminex xMAP

Technology (Bio-Plex 200 System, Biorad, Ottawa, Canada). The relative levels of 29 cytokines were measured in BAL fluid using Rat Cytokine Array Panel A (R&D Systems). BAL samples for each group (6 samples/group) were respectively pooled together to perform the assay.

Lung histology

Lungs were first sliced into sections 2-3 mm thick. Following dehydration of the sections in a series of ethanol solutions ranging from 65% to 100%, ethanol was removed using Citrisolv (Fisher Scientific, Montreal, Quebec) as solvent and sections were then embedded with paraffin. Using a microtome, sections were sliced into 5 μ m cuts and colored using H&E staining protocol. Pictures were taken using a Cooke SensiCam High Performance camera mounted on a Leica DMRE microscope.

Statistical Analysis

Results are presented in the form of the mean $\pm$ SEM and statistical significance was determined using ANOVA and Tuckey's test with $p < 0.05$.

RESULTS

Strain differences in BEC

Following the first day of ethanol exposure (day 1), significant ($p < 0.05$) gender differences in BEC for BN rats were observed at 2 min (mean $\pm$ SEM of 357.2 ± 17.7 for males vs. 308.9 ± 14.6 for females) and 20 min (167.2 ± 12.5 for males vs. 134.3 ± 27.4 for females) post-exposure (half life was 13.2 min in males and 13.6 min in females) (Figure 1). On day 22, BEC in males were significantly higher than levels in females at 2 min (266.7 ± 27.6 vs. 228.3 ± 23.5 , respectively) and lower at 40 min (24.9 ± 4.0 vs. 39.3 ± 13.0 , respectively) post-

exposure (half life was 11.1 min in males and 15.0 min in females). The relative change in BEC from day 1 to day 22 for each gender was similar, i.e. a 25.3% decrease for males vs. a 26.1% decrease in females. Further, when comparing BN and SD rat strains within gender, the only statistically significant change on day one occurred between males at 20 min post exposure. On day 22, although females BN vs. SD had significantly different BEC at all times, males showed no significant changes at any timepoint analyzed (Figure 1).

Development of the allergic asthma model

Exposure to 1.5, 3.0, or 5.0% (w/v) OVA for the challenge dose showed that the optimal allergen concentration to use to reach the moderate response target, i.e. 30-40% of maximal inflammatory response, was reached at 1.5% (yielding 39% of the maximal inflammatory response) (Figure 2). Since dose-response experiments were conducted prior to time-response experiments, the precise peak inflammatory response was unknown. Therefore, BAL were performed 36 h following the OVA challenge based on an estimation of peak inflammation resulting from past studies (Renzi et al., 1993).

Results for the time-response experiments, using 1.5% OVA for the challenge, showed that peak inflammatory response takes place 48 h post-challenge. These results indicate that the development phase of pulmonary inflammation following induction of the asthmatic response occurs from the time of the challenge until 48 h post-challenge and that recovery occurs after this time point (Figure 3, OVA group).

Evaluation of pulmonary toxicity following ethanol exposure

When comparing leucocytes present in the BAL fluid of BN rats, results showed statistically significant ($p < 0.05$) gender differences in the percentage of macrophages (mean $\pm$ SEM of

91.4 $\pm$ 0.9 vs. 79.8 $\pm$ 4.5), eosinophils (0.4 $\pm$ 0.2 vs. 3.4 $\pm$ 0.8), and neutrophils (1.4 $\pm$ 0.3 vs. 9.7 $\pm$ 3.5) for males vs. females, respectively (Figure 4). Within a gender, no significant strain differences were seen in males for any of the four types of leukocytes counted but a significant difference was seen in females only for eosinophils (3.4 $\pm$ 0.8 for BN vs. 0.0 $\pm$ 0.0 for SD), indicating a similar pulmonary inflammatory pattern between both strains (Figure 4).

In OVA sensitized and challenged animals, exposure to ethanol every day yielded no significant differences in eosinophil counts at most points when compared to rats exposed to OVA alone. The only exception was found at 6 h following OVA challenge (mean $\pm$ SEM of 0.481E⁶ $\pm$ 0.059 for OVA alone vs. 0.792E⁶ $\pm$ 0.128 for OVA + ethanol, $p=0.045$) (Figure 3). Results for other leukocytes are presented in Table 1 and the only significant difference ($p<0.05$) is found in neutrophils 72 h following OVA challenge. As previously reported, inhalation of ethanol alone did not cause pulmonary inflammation as demonstrated by BAL leucocytes counts and histology results (Scarino et al., 2009).

Furthermore, histological analysis of lung tissue showed that OVA exposure alone induced pulmonary inflammation, as shown by the leukocytes surrounding bronchioles and to a lesser extent, alveoli, when compared to healthy animals. Lung tissue of animals exposed to both OVA and ethanol did not differ from those exposed to OVA alone with regards to the changes assessed (Figure 5).

Characterization of nano-TiO₂ exposures

Characterization of the nano-TiO₂ aerosols generated for the nose-only animal exposures is found in Table 2. NMADs measured with the ELPI were of 168 and 171 nm and

appreciatively 30 % of the particles present in the aerosols were of nanometric dimension. Cumulative size distributions of the nano-aerosols generated are shown in Figure 6.

Evaluation of pulmonary toxicity following exposure to nano-TiO₂

In asthmatic rats, exposure to a low dose of nano-TiO₂ (9.4 mg/m³) 42 hours after allergen challenge significantly ($p < 0.05$) decreased total leukocytes ($7.12E^6 \pm 0.93$ for OVA vs. $4.18E^6 \pm 0.52$ for OVA + TiO₂) and eosinophils ($3.2E^6 \pm 0.42$ for OVA vs. $1.41E^6 \pm 0.17$ for OVA + TiO₂, Figure 7). In addition, changes in the levels of plasma cytokine levels were also found (Figure 8). Levels of MCP-1, IL-4, IL-6, and INF- γ in asthmatic rats exposed to nano-TiO₂ (OVA + nano-TiO₂) decreased by 21, 54, 53, and 92%, respectively, when compared to asthmatic rats exposed to compressed air (OVA) ($p > 0.05$) (levels of l'IL-1 β , l'IL-10, and TNF- α were below detection limit for all animals). Similar results were found in BAL, the levels of relevant cytokines decreased in OVA + nano-TiO₂ group when compared to OVA group. Levels of IL-4, IL-6, and INF- γ decreased by 36, 17, and 10%, respectively (data not shown).

To determine the effect of nano-TiO₂ in normal (not asthmatic) BN rats, exposure to a high dose (15.7 mg/m³) of nano-TiO₂ was tested. Nano-TiO₂ did not induce inflammation, yielding no significant differences in total leukocytes when compared to animals exposed to filtered air (mean $\pm$ SEM of 1.412 ± 0.267 for TiO₂ group vs. 2.235 ± 0.297 for control group), eosinophils (0.154 ± 0.029 for TiO₂ group vs. 0.247 ± 0.033 for control group), macrophages (1.242 ± 0.235 for TiO₂ group vs. 1.949 ± 0.259 for control group), and neutrophils (0.010 ± 0.002 for TiO₂ group vs. 0.006 ± 0.001 for control group).

Interestingly, histological analyses of lung tissue lesions support BAL cellular and molecular findings (Figure 9A). On one hand, animals exposed to OVA alone had increased lung inflammation when compared to healthy animals, as expected. On the other hand, animals exposed to OVA and nano-TiO₂ showed decreased leukocyte infiltration when compared to those exposed to OVA alone. Figure 9B shows macrophages with phagocytosed nano-TiO₂ agglomerates in exposed animals when compared to those exposed to filtered air.

DISCUSSION

In the present study we assessed whether nano-TiO₂ or ethanol affected pulmonary inflammation in asthmatic BN rats. Our objective was not to compare both pollutants between them, but rather to assess their level of toxicity individually. We used leukocyte count as our primary endpoint and histological analyses of the lungs as our secondary endpoint to determine the level of inflammation. The results of these two endpoints provided us with an overview of pulmonary inflammation and allowed us to determine if more endpoints were necessary in order to support cellular results. In order to be cost efficient, further analyses (e.g. cytokine analyses) would only be pursued in the presence of significant changes among groups for the primary and secondary endpoint, as others have done when studying multiple pollutants (Cho et al., 2010). Moreover, given that we were not comparing ethanol toxicity with that of nano-TiO₂, we were able to customize study designs for each pollutant that would provide answers to our objectives while ensuring an optimal ethical use of animals.

We first assessed whether a single high dose of nano-TiO₂ caused pulmonary inflammation in healthy, unsensitised and unchallenged BN rats. A high dose (15.7 mg/m³) did not induce pulmonary inflammation as measured in BAL immediately following 6 h exposure. This result is in line with other studies that have shown that exposure to particulate matter, such as

wood smoke and diesel exhaust particles, at concentrations of 1, 10, and 20 mg/m³, did not cause an acute lung inflammatory response in BN rats (Tesfaigzi et al., 2002; Dong et al., 2005). However, other studies have shown that exposure to nano-TiO₂ at concentrations higher than 10 mg/m³ can significantly induce pulmonary inflammation in Wistar and Fisher rats (Oberdörster et al., 1994; Baggs et al., 1997; Bermudez et al., 2002; Ma-Hock et al., 2009; Van Ravenzwaay et al., 2009). The reason for this discrepancy remains unclear but may be related to either a difference in the size of the particulates of TiO₂ administered (and thus their effects on the immune response) or in a difference in the immune response between the different strains of rats, the BN rat known to have less of an acute phase response and more of a humoral response to different substances (Siegel et al., 2004).

We also assessed whether a single low dose of nano-TiO₂ (9.4 mg/m³) would affect a lung inflammatory response that is ongoing in the BN rat. Nano-TiO₂ was administered to BN rats 42 h after allergen challenge and lung BAL was retrieved. The level of nano-TiO₂ used in asthmatic rats was 31 times higher than the current NIOSH TWA acceptable level of 0.3 mg/m³. We found that nano-TiO₂ reduced allergic inflammation, as measured by total inflammatory cells and decreased systemic and BAL cytokines. This reduction was observed with anatase nano-TiO₂, which is considered more toxic than rutile nano-TiO₂ (Jiang et al., 2008; Warheit et al., 2007b). These results were unexpected since it had previously been shown in a mouse model of diisocyanate-induced asthma that oropharyngeal exposure to anatase nano-TiO₂ increased the lung inflammatory response (Hussain et al., 2011). Also, rats are reported to be more sensitive than mice to the pulmonary toxic effects induced by nano-TiO₂ (Bermudez et al., 2002). We have considered the possibility, as suggested by Persson & Uller (2010), that inflammatory cells might persist in the lung interstitium during lung disease/injury instead of migrating towards the airway lumen, therefore decreasing the

number of leukocytes found in BAL fluid. However this hypothesis was rejected following lung histology analyses, which showed that the level of inflammation in the lungs was proportional to BAL cellular results. Others have also reported results that are similar to ours. While healthy mice exposed to nano-TiO₂ had an increase in pulmonary neutrophilia accompanied by significantly increased chemokine CXCL5 expression, reduced inflammation after nano-TiO₂ exposure was observed after allergen challenge by Rossi et al. (2010). They found that in OVA-sensitized mice, inhalation of aerosolized needle-like silica-coated rutile nano-TiO₂ (10 mg/m³, 2 h/d, 3 times per week for 4 weeks, geometric mean size of particles in aerosol of 199 nm as measured by an ELPI) significantly reduced the OVA-induced increase in the number of BAL eosinophils and lymphocytes (without changing the level of neutrophils), lowered the level of macrophages, decreased Th2 cytokines, airway hyperresponsiveness and the number of mucus-producing goblet cells, two important aspects of an asthmatic reaction. It is interesting to note that Rossi et al. (2010) obtained similar results when exposing mice to fine TiO₂ particles (< 5 µm) instead of nano (< 100 nm) particles. Thus, both rutile nano-TiO₂ in mice and anatase nano-TiO₂ in rats have been shown to cause a reduction of allergic lung inflammation in this model.

Although it is unclear why studies show contradictory effects regarding either enhancement (Hussain et al., 2011; De Haar et al., 2006) or suppression (Rossi et al., 2010 and the present study) of allergic pulmonary inflammation in rodents following nano-TiO₂ exposure, one possibility may also reside in the way the particles reach the lungs. Grassian et al. (2007a) reported that the route of exposure, instillation vs. inhalation, can have an impact on the agglomeration state of nano-TiO₂ and thus their potential physiologic effects. Hussain et al. (2011) exposed rodents oropharyngeally to nano-TiO₂ in suspension, De Haar et al. (2006) exposed mice intranasally to nano-TiO₂, whereas inhalation of aerosolized nano-TiO₂ powder

was used in the study by Rossi et al. (2010) and in the present study. Thus, different exposure routes between the two groups of studies may have lead to the formation of different TiO₂ nanoparticles agglomerates, which can lead to various effective concentrations in the different lung compartments. Therefore, the effective nanoparticle biological dose may have been different and could be partly responsible for the discrepancy in the results. Finally, Hussain et al. (2011) used TDI as the allergen and studies on the mechanisms of asthma caused by TDI, which can induce a Th1 or Th2 response, are controversial (Ban et al., 2006) and may not fully mimic the Th2 response in humans.

Nano-TiO₂ inhalation caused a decrease in both Th2 cytokines and the Th1 cytokine (INF- γ) retrieved in either plasma or BAL. Whether the decrease in cytokines caused a decrease in inflammatory cells or a decrease in inflammatory cells led to a decrease in the release of cytokines is a question that remains unanswered. Amongst the possible mechanisms by which this occurred one may speculate that nano-TiO₂ induced a decrease in release of pro-inflammatory mediators from macrophages thus down-regulating the immune response, such as a reduction in IL-1 and/or a release of the soluble receptor of IL-1. Another possibility is that nano-TiO₂ directly affected the cells that are known to release IL-4 and INF- γ (lymphocytes, mastocytes) and caused a down-regulation of their cytokine production/release. In this regard, the effects of nano-TiO₂ on the immune response seem similar to what has been demonstrated in OVA challenge with agents such as black seed oil (Shahzad et al., 2009) and thymoquinone (El Gazzar et al., 2006).

Since inflammatory kinetics are cell-dependent, i.e. the various leukocytes peak at different times during the course of an allergic inflammatory reaction, we can hypothesize that the effect of nano-TiO₂ exposure on specific inflammatory cells may differ according to timing of

exposure. For instance, neutrophils peak 4 to 8 hours following allergen challenge (Lukacs et al., 1998), whereas eosinophils peak 48 hours following the challenge. The timing of exposure may therefore account for differences in effects induced by nano-TiO₂ in rodents by either promoting inflammation when TiO₂ exposure occurs prior to challenge (de Haar et al. 2006; Larsen et al., 2010; Hussain et al., 2011) or suppressing it when exposure is subsequent to allergen challenge, as demonstrated by our results.

Macrophages are the main cells responsible for particle clearance through phagocytosis in the alveolar region. We observed that macrophages from BAL fluid have engulfed nano-TiO₂ agglomerates (Figure 9B). Phagocytosis activity of alveolar macrophages is optimal for micrometer particles, but as reported in several studies, seems to be less efficient for particles in the nanoscale range (Oberdörster, 1988, 2001; Oberdörster et al., 1997; Takenaka et al., 2001, 2006; Geiser et al., 2008). Accordingly, the optimal particle size range for phagocytosis by alveolar macrophages would be between 0.5 and 3 μm and particles having a size below 0.26 μm would not mainly undertake this clearance pathway (Oberdörster, 1988; Morrow, 1988; Yang et al., 2008; Mansour et al., 2009). Hence, given that nano-TiO₂ tends to agglomerate when administered by aerosol, especially at high concentrations, the size of nanoparticle agglomerates in the physiological environment may have a crucial impact on macrophage phagocytosis, as it represents the real size that could elucidate a pulmonary immune cell response.

We then assessed the effects of ethanol on the response to allergen in the BN rat. The level for ethanol vapors was 3 times higher than the current TWA NIOSH or ACGIH level, and OSHA PEL, of 1000 ppm. We found that repeated exposure to ethanol vapors by inhalation did not exacerbate the allergic inflammatory response caused by the OVA challenge. Results showed

that, aside from 6 h following OVA challenge, there were no statistically significant differences between exposed groups (OVA + ethanol) and control groups (OVA only) for all phases, i.e. the development, peak, and recuperation of the lung inflammatory response. Furthermore, no significant differences were observed when either 0.1% or 0.5 % OVA was used instead of 1.5 %, with BAL performed 24 h following challenge, which allowed us to evaluate the effect of ethanol inhalation on a smaller inflammatory response (data not shown). Although this study does not focus on alcohol-induced asthma, our results are in accordance with what has been suggested in some studies on alcohol-induced asthma, i.e. that ethanol is not the substance causing the pulmonary response. Studies have shown that acetaldehyde, a direct metabolite of ethanol, causes pulmonary responses following inhalation (Fujimura et al., 1999), by increasing pressure at the airway opening (Myou et al., 1993); blood acetaldehyde was increased in patients suffering from alcohol-induced asthma with changes in FEV1 higher than 20%, but not in those with a response lower than 20%, while blood alcohol levels remained unchanged (Watanabe, 1991). Acetaldehyde has been detected in the expired air of human volunteers during and after a 6 h acute exposure to 25-1000 ppm ethanol (Tardif et al., 2002). Further, Takao et al. (1998) showed that while ingestion of ethanol (30 g over 5 to 10 min) did not change FEV1 in a group of 30 volunteers, it caused a fall in FEV1 associated with a rise in blood acetaldehyde and histamine concentrations in asthmatic subjects. The response was positive in 19% of 16 patients with normal homozygote ALDH2 genotype, 71% of 14 patients with type mutant heterozygote, and 100% of two patients with type mutant homozygote ALDH2 genotype. It was therefore suggested that alcohol-induced asthma is probably caused by increased blood acetaldehyde concentration resulting from abnormalities of ALDH2, an enzyme responsible for metabolizing acetaldehyde. In a previous study, we have shown, however, that repeated exposure (13 weeks) to ethanol vapors (3000 ppm) did not induce pulmonary toxicity in normal Sprague-Dawley (SD) rats nor in a

subgroup carrying a deficiency in type 2 acetaldehyde dehydrogenase (ALDH2) (Scarino et al., 2009).

In conclusion, data show that acute exposure to the emerging pollutant nano-TiO₂ agglomerates decreases allergic lung inflammation in rats. This response occurs in association with a decrease in both Th2 and Th1 cytokines. Characterization of the nano-TiO₂ aerosols and timing of the nanoparticle exposure in relation to the induction of the asthmatic lung inflammation may play a crucial role in this protective effect. Inhalation exposure to another emerging pollutant, ethanol vapors, does not exacerbate allergic lung inflammation in a rat model. Results obtained with the OVA-induced Brown Norway rat model are relevant to humans as i) it is a validated asthma model for the human disease, ii) exposure was done using the inhalation route, and iii) levels were representative of human exposure. Considering the increasing number of individuals exposed to contaminated urban air with various pollutants data reported herein contributes to public health risk assessment.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to acknowledge the technical contribution of Guylaine Lassonde, Ginette Charest-Tardif, and the team at Topigen Pharmaceuticals Inc. We thank the Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (*AFSSET*) and the Réseau de recherche en santé environnementale (RRSE) for their financial support.

DECLARATION OF INTEREST

There are no conflicts of interest for all authors included in this manuscript.

REFERENCES

- Arif AA, Shah SM. 2007. Association between personal exposure to volatile organic compounds and asthma among US adult population. *Int Arch Occup Environ Health* 80(8):711-9.
- Baggs RB, Ferin J, Oberdörster G (1997). Regression of pulmonary lesions produced by inhaled titanium dioxide in rats. *Vet Pathol* 34(6): 592-7.
- Ban M, Morel G, Langonne I, Huguet N, Pepin E, Binet S 2006. TDI can induce respiratory allergy with Th2-dominated response in mice. *Toxicology* 218:39-47.
- Bermudez E, Mangum JB, Asgharian B, Wong BA, Reverdy EE, Janszen DB, Hext PM, Warheit DB, Everitt JJ. 2002. Long-term pulmonary responses of three laboratory rodent species to subchronic inhalation of pigmentary titanium dioxide particles. *Toxicol Sci* 70(1):86-97.
- Chen X, Mao SS. 2007. Titanium Dioxide Nanomaterials: Synthesis, Properties, Modifications, and Applications. *Chem Rev* 107:2891-2959.
- Cho WS, Poland CA, Howie SE, MacNee W, Megson IL, Donaldson K. 2010. Metal oxide nanoparticles induce unique inflammatory footprints in the lung: important implications for nanoparticle testing. *Environ Health Perspect* 118(12): 1699-706.
- De Haar C, Hassing I, Bol M, Bleumink R, Pieters R. 2006. Ultrafine but not fine particulate matter causes airway inflammation and allergic airway sensitization to co-administrated antigen in mice. *Clinical and Experimental Allergy* 36:1469-1479.
- Dong CC, Yin XJ, Ma JY, Millecchia L, Barger MW, Roberts JR, Zhang XD, Antonini JM, Ma JK. 2005. Exposure of brown Norway rats to diesel exhaust particles prior to ovalbumin (OVA) sensitization elicits IgE adjuvant activity but attenuates OVA-induced airway inflammation. *Toxicol Sci* 88(1):150-60.
- El Gazzar M, El Mezayen R, Marecki JC, Nicolls MR, Canastar A, Dreskin SC. 2006. Anti-inflammatory effect of thymoquinone in a mouse model of allergic lung inflammation. *Int Immunopharmacol* 6(7):1135-42.
- Elwood W, Loetvall JO, Barnes PJ, Chung KF. 1991. Characterization of allergen-induced bronchial hyperresponsiveness and airway inflammation in actively sensitized Brown-Norway rats. *J Allergy Clin Immunol* 88:951-960.
- Fujimura M, Myou S, Kamio Y, Ishiura Y, Iwasa K, Hashimoto T, Matsuda T. 1999. Increased airway responsiveness to acetaldehyde in asthmatic subjects with alcohol-induced bronchoconstriction. *Eur Respir J* 14(1):19-22.
- Geiser, M., Casaulta, M., Kupferschmid, B., Schulz, H., Semmler-Behnke, M., & Kreyling, W. 2008. The role of macrophages in the clearance of inhaled ultrafine titanium dioxide particles. *Am J Respir Cell Mol Biol* 38(3):371-376.

Grassian VH, O'shaughnessy PT, mcakova-Dodd A, Pettibone JM, & Thorne PS. 2007a. Inhalation exposure study of titanium dioxide nanoparticles with a primary particle size of 2 to 5 nm. *Environ Health Perspect* 115:397-402.

Health Canada (2010). Ethanol Benefits [online] Available at:
<http://oee.nrcan.gc.ca/transportation/alternative-fuels/fuel-facts/ethanol/benefits.cfm?attr=16>
 Accessed on 13 February 2012

Hinds WC. 1999. *Aerosol Technology, Properties, Behavior and Measurement of airborne particles*. John Wiley & sons inc., New York.

Hussain S, Vanoirbeek JA, Luyts K, De Vooght V, Verbeken E, Thomassen LC, Martens JA, Dinsdale D, Boland S, Marano F, Nemery B, Hoet PH. 2011. Lung exposure to nanoparticles modulates an asthmatic response in a mouse model. *Eur Respir J* 37(2):299-309.

Jacobsen NR, Moller P, Jensen KA, Vogel U, Ladefoged O, Loft S, & Wallin H. 2009. Lung inflammation and genotoxicity following pulmonary exposure to nanoparticles in ApoE-/- mice. *Part Fibre Toxicol* 6:2.

Jiang J, Oberdörster G, Elder A, Gelein R, Mercer P, Biswas P. 2008. Does nanoparticle activity depend upon size and crystal phase? *Nanotoxicology* 2:33-42.

Larsen ST, Roursgaard M, Jensen KA, Nielsen GD. 2010. Nano titanium dioxide particles promote allergic sensitization and lung inflammation in mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 106:114-117.

Lukacs LW, Hogaboam CM, Kunkel SL, Chensue SW, Burdick MD, Evanoff HL, Steiter RM. 1998. Mast cells produce ENA-78, which can function as a potent neutrophil chemoattractant during allergic airway inflammation. *J Leukoc Biol* 63(6):746-51

Lux Research. 2006. *Nanotech Report*, 4th ed. The indispensable Reference Guide to Nanotechnology. www.luxresearchinc.com/press/RELEASE_TNR4.pdf

Ma-Hock L, Gamer AO, Landsiedel R, Leibold E, Frechen T, Sens B, Linsenhuehler M, van Ravenzwaay B. 2007. Generation and characterization of test atmospheres with nanomaterials. *Inhal Toxicol* 19:833-848.

Ma-Hock L, Burkhardt S, Strauss V, Gamer AO, Wiench K, van RB, Landsiedel R. 2009. Development of a short-term inhalation test in the rat using nano-titanium dioxide as a model substance. *Inhal Toxicol* 21: 102-118.

Mansour HM, Rhee YS, Wu X. 2009. Nanomedicine in pulmonary delivery. *Int J Nanomedicine* 4:299-319.

Morrow PE. 1988. Possible mechanisms to explain dust overloading of the lungs. *Fundam Appl Toxicol* 10(3): 369-384.

Muhlfeld C, Rothen-Rutishauser B, Blank F, Vanhecke D, Ochs M, Gehr P. 2008. Interactions of nanoparticles with pulmonary structures and cellular responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294:L817-L829.

Murr LE, Esquivel EV, Bang JJ. 2004. Characterization of nanostructure phenomena in airborne particulate aggregates and their potential for respiratory health effects. *J Mater Sci Mater Med* 15:237-247.

Myou S, Fujimura M, Nishi K, Ohka T, Matsuda T. 1993. Aerosolized acetaldehyde induces histamine-mediated bronchoconstriction in asthmatics. *Am Rev Respir Dis* 148:940-3.

Myou S, Fujimura M, Nishi K, Watanabe K, Matsuda M, Ohka T, Matsuda T. 1996. Effect of ethanol on airway caliber and nonspecific bronchial responsiveness in patients with alcohol-induced asthma. *Allergy* 51:52-5.

Noël A, Cloutier Y, Wilkinson KJ, Dion C, Hallé S, Maghni K, Tardif R, Truchon G. 2012. Generating nano-aerosols from TiO₂ (5 nm) nanoparticles showing different agglomeration states. Application to toxicological studies. Submitted to the *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*

Oberdörster G. 1988. Lung clearance of inhaled insoluble and soluble particles. *J Aerosol Med* 1:289-329.

Oberdörster G, Ferin J, Lehnert BE. 1994. Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. *Environ Health Perspect* 102 Suppl 5:173-179.

Oberdörster G, Cox C, Gelein R. 1997. Intratracheal instillation versus intratracheal-inhalation of tracer particles for measuring lung clearance function. *Exp Lung Res* 23(1):17-34.

Oberdörster G. 2001. Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles. *Int Arch Occup Environ Health*, 74:1-8.

Oberdörster G, Maynard A, Donaldson K, Castranova V, Fitzpatrick J, Ausman K, Carter J, Karn B, Kreyling W, Lai D, Olin S, Monteiro-Riviere N, Warheit DB, Yang H. 2005. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Part Fibre Toxicol* 2:8.

Parkinson A. 2001. Biotransformation of xenobiotics. In Casarett and Doull's toxicology. The basic science of poisons, ed., C.D. Klaassen, 6th ed., pp. 152-156. New York: McGraw-Hill.

Pauluhn J, Mohr U. 2000. Inhalation studies in laboratory animals--current concepts and alternatives. *Toxicol Pathol* 28:734-753.

Pauluhn J. 2005. Overview of inhalation exposure techniques: strengths and weaknesses. *Exp Toxicol Pathol* 57 Suppl 1:111-128.

Pauluhn J. 2009. Pulmonary toxicity and fate of agglomerated 10 and 40 nm aluminum oxyhydroxides following 4-week inhalation exposure of rats: toxic effects are determined by agglomerated, not primary particle size. *Toxicol Sci* 109(1):152-167.

Renzi PM, Sapienza S, Wasserman S, Du T, Olivenstein R, Wang NS, Martin JG. 1992. Effect of interleukin-2 on the airway response to antigen in the rat. *Am Rev Respir Dis* 146(1):163-9.

Renzi PM, Olivenstein R, Martin JG. 1993. Inflammatory cell populations in the airways and parenchyma after antigen challenge in the rat. *Am Rev Respir Dis* 147(4):967-74.

Rossi EM, Pylkkänen L, Koivisto AJ, Nykäsenoja H, Wolff H, Savolainen K, Alenius H. 2010. Inhalation exposure to nanosized and fine TiO₂ particles inhibits features of allergic asthma in a murine model. *Part Fibre Toxicol* 25(7):35.

Rumchev K, Spickett J, Bulsara M, Phillips M, Stick S. 2004. Association of domestic exposure to volatile organic compounds with asthma in young children. *Thorax* 59(9):746-51.

Scarino A, Charbonneau M, Tardif R. 2009. Influence of ALDH2 polymorphism on ethanol kinetics and pulmonary effects in males and female rats exposed to ethanol vapors. *Inhal Toxicol* 21(3):193-9.

Shahzad M, Yang X, Raza Asim MB, Sun Q, Han Y, Zhang F, Cao Y, Lu S. 2009. Black seed oil ameliorates allergic airway inflammation by inhibiting T-cell proliferation in rats. *Pulm Pharmacol Ther* 22(1):37-43.

Siegel PD, Saxena RK, Saxena QB, Ma JK, Ma JY, Yin XJ, Castranova V, Al-Humadi N, Lewis DM. 2004. Effect of diesel exhaust particulate (DEP) on immune responses: contributions of particulate versus organic soluble components. *J Toxicol Environ Health A* 13;67(3):221-31.

Takao A, Shimoda T, Kohno S, Asai S, Harda S. 1998. Correlation between alcohol-induced asthma and acetaldehyde dehydrogenase-2 genotype. *J Allergy Clin Immunol* 101:576-80.

Takenaka S, Karg E, Roth C, Schulz H, Ziesenis A, Heinzmann, U, Schramel P, Heyder J. 2001. Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats. *Environ Health Perspect* 109 Suppl 4:547-551.

Takenaka S, Karg E, Kreyling WG, Lentner B, Moller W, Behnke-Semmler M, Jennen L, Walch A, Michalke B, Schramel P, Heyder J, Schulz H. 2006. Distribution pattern of inhaled ultrafine gold particles in the rat lung. *Inhal Toxicol* 18(10):733-740.

Tardif R, Lui L, Raizenne M. 2002. Exhaled ethanol and acetaldehyde in human subjects exposed to low levels of ethanol. *Inhal Toxicol* 16(4):203-7.

Tesfaigzi Y, Singh SP, Foster JE, Kubatko J, Barr EB, Fine PM, McDonald JD, Hahn FF, Mauderly JL. 2002. Health effects of subchronic exposure to low levels of wood smoke in rats. *Toxicol Sci* 65(1):115-25.

Tesfaigzi Y, McDonald JD, Reed MD, Singh SP, De Sanctis GT, Eynott PR, Hahn FF, Campen MJ, Mauderly JL. 2005. Low-level subchronic exposure to wood smoke exacerbates inflammatory responses in allergic rats. *Toxicol Sci* 88(2):505-13.

Triolet. 2005. Overview of solvent usage in France at end of 2004. *Hygiène et sécurité du travail - Cahiers de notes documentaires*; 199: 65-97. [In French].

van Ravenzwaay B, Landsiedel R, Fabian E, Burkhardt S, Strauss V, Ma-Hock L. 2009. Comparing fate and effects of three particles of different surface properties: nano-TiO₂, pigmentary TiO₂ and quartz. *Toxicol Lett* 8;186(3):152-9.

Warheit DB, Hoke RA, Finlay C, Donner EM, Reed KL, Sayes CM. 2007a. Development of a base set of toxicity tests using ultrafine TiO₂ particles as a component of nanoparticle risk management. *Toxicol Lett* 171:99-110.

Warheit DB, Webb TR, Colvin VL, Reed KL, Sayes CM. 2007b. Pulmonary bioassay studies with nanoscale and fine-quartz particles in rats: toxicity is not dependent upon particle size but on surface characteristics. *Toxicol Sci* 95(1):270-280.

Warheit DB, Webb TR, Reed KL, Frerichs S, Sayes CM (2007c). Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine-TiO₂ particles: differential responses related to surface properties. *Toxicology* 25;230(1): 90-104

Warheit DB. 2008. How meaningful are the results of nanotoxicity studies in the absence of adequate material characterization? *Toxicol Sci* 101:183-185.

Warheit DB. 2010. Assessing health risks of inhaled nanomaterials: development of pulmonary bioassay hazard studies. *Anal Bioanal Chem* 398:607-612.

Watanabe T. 1991. Mechanism of ethanol-induced bronchoconstriction in Japanese asthmatic patients. *Arerugi* 40(9):1210-7.

WHO (2008). Asthma [online]. Fact sheet N°307. Available at:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs307/en/index.html>
Accessed on 13 February 2012

Yang W, Peters JI, Williams RO III. 2008. Inhaled nanoparticles--a current review. *Int J Pharm* 356(1-2):239-247.

Zuskin E, Bouhuys A, Saric M. 1981. Lung function changes by ethanol inhalation. *Clin Allergy* 11:243-8.

Table 1:
White blood cells in BAL fluid at different times following ovalbumin exposure. BAL were performed immediately following the final ethanol exposure (Results are shown as mean $\pm$ SEM).

Cell type	Group	Time following ovalbumin challenge (h)				
		6	24	36	48	72
Total leukocytes (10^6)	OVA	2.11 $\pm$ 0.26	4.41 $\pm$ 1.56	6.29 $\pm$ 1.06	9.39 $\pm$ 1.06	7.52 $\pm$ 0.59
	OVA + EtOH	2.91 $\pm$ 0.47	5.88 $\pm$ 1.22	7.24 $\pm$ 0.44	10.24 $\pm$ 2.14	7.05 $\pm$ 0.84
Macrophages (10^6)	OVA	1.24 $\pm$ 0.15	1.78 $\pm$ 0.35	2.40 $\pm$ 0.40	3.54 $\pm$ 0.40	3.85 $\pm$ 0.30
	OVA + EtOH	1.56 $\pm$ 0.25	2.34 $\pm$ 0.49	2.51 $\pm$ 0.15	4.04 $\pm$ 0.84	4.11 $\pm$ 0.49
Neutrophils (10^6)	OVA	0.32 $\pm$ 0.04	0.71 $\pm$ 0.14	0.73 $\pm$ 0.12	1.26 $\pm$ 0.14	0.74 $\pm$ 0.06*
	OVA + EtOH	0.46 $\pm$ 0.07	0.93 $\pm$ 0.19	0.97 $\pm$ 0.06	1.77 $\pm$ 0.37	0.53 $\pm$ 0.06*
Lymphocytes (10^6)	OVA	0.07 $\pm$ 0.01	0.13 $\pm$ 0.03	0.13 $\pm$ 0.02	0.40 $\pm$ 0.05	0.21 $\pm$ 0.02
	OVA + EtOH	0.10 $\pm$ 0.02	0.14 $\pm$ 0.03	0.09 $\pm$ 0.01	0.42 $\pm$ 0.09	0.21 $\pm$ 0.31

OVA = ovalbumin; EtOH = ethanol

* Significant difference ($p < 0.05$) between OVA and OVA + EtOH groups.

Table 2:
Nano-TiO₂ aerosols characterization

Parameters	Low dose of nano-TiO ₂	High dose of nano-TiO ₂
Primary particle size (nm)	5	5
Mass concentration (Cassette) (mg/m ³)	9.4	15.7
Min and max concentrations (Dust trak) (mg/m ³)	6.4 and 13.5	14.9 and 17.4
Number concentration (ELPI) (/cm ³)	76 169	617 709
Number median aerodynamic diameter (NMAD) (D ₅₀) (ELPI) (nm) ^a	168	171
D ₂₅ and D ₇₅ ELPI (nm) ^a	75 and 1000	70 and 321
Percentage of nano-agglomerates (< 100 nm) in aerosol (%)	37	31

^a Aerodynamic diameters for which 25% (D₂₅), 50% (D₅₀ or NMAD) or 75% (D₇₅) of the particles in the aerosol are smaller than this value.

LEGENDS

Figure 1. Blood ethanol concentration 2, 20, and 40 minutes following ethanol exposure on day 1 and day 22 (mean $\pm$ SD) for males (A) and females (B). Data for Sprague Dawley rats were extracted from Scarino et al. (2009). a: $p < 0.05$ for males BN vs. males SD at 20 min post exposure; b: $p < 0.05$ for females BN vs. females SD at 2 min post exposure; c: $p < 0.05$ for females BN vs. females SD at 20 min post exposure; d: $p < 0.05$ for females BN vs. females SD at 40 min post exposure.

Figure 2. Dose-response effects of ovalbumin challenge on eosinophils collected in BAL 36h following challenge for concentrations ranging between 1.5% and 5% (mean $\pm$ SEM).

Figure 3. Time-response for the effect of a repeated exposure to ethanol vapors on lung inflammation for rats challenged with 1.5 % ovalbumin (mean $\pm$ SEM). *: $p < 0.05$ at 6 h following challenge for OVA vs. OVA + TiO₂.

Figure 4. Comparison of the proportion of each type of leukocyte found in the BAL fluid between rat strains (BN vs. SD) in males (A) and females (B) (mean $\pm$ SEM). a: $p < 0.05$ for macrophages in males BN vs. females BN; b: $p < 0.05$ for eosinophils in males BN vs. females BN; c: $p < 0.05$ for neutrophils in males BN vs. females BN; d: $p < 0.05$ for eosinophils in females BN vs. females SD.

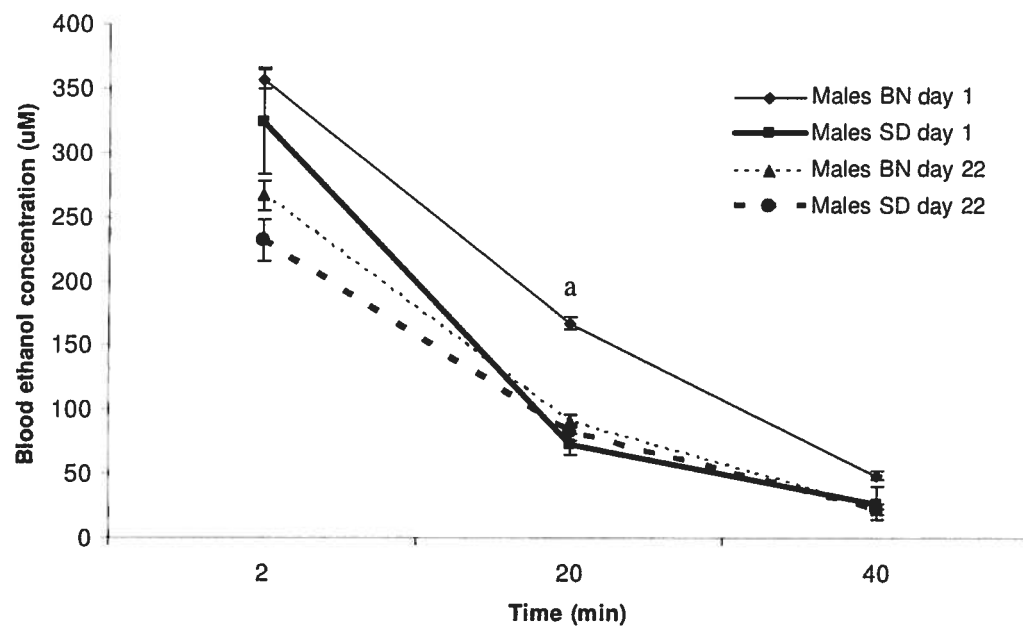
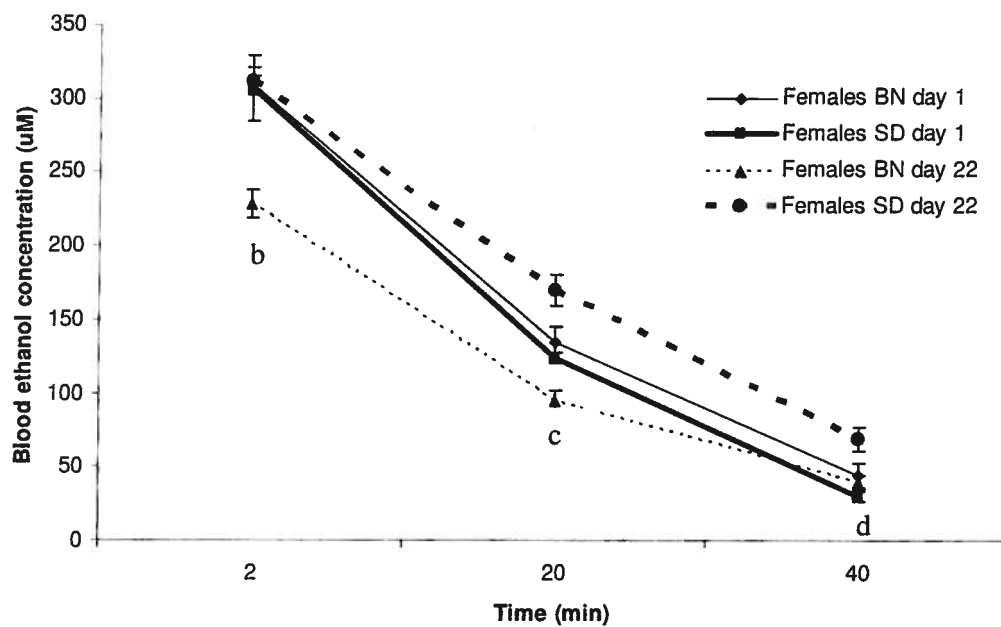
Figure 5. Photomicrograph (5 μ m slices, H&E staining) of rat lungs for control (top left), ethanol alone (top right), ovalbumin alone (bottom left) and ovalbumin + ethanol (bottom right) exposed rats (100X).

Figure 6. Cumulative size distribution of nano-TiO₂ aerosols (measured by ELPI).

Figure 7. Effect of exposure to a low dose of nano-TiO₂ (9.4 mg/m³) on pulmonary inflammation of exposed rats (mean ± SEM). a: p<0.05 for total leukocytes in OVA vs. OVA + TiO₂; b: p<0.05 for eosinophils in OVA vs. OVA + TiO₂.

Figure 8. Effect of nano-TiO₂ aerosols on the plasma levels of various plasma cytokines involved in the inflammatory reaction: IL-6 (A) and MCP-1, IL-4, INF-γ (B) (mean ± SEM).

Figure 9. A: Photomicrograph (5 μm slice, H&E staining) of rat lungs for control (top left), nano-TiO₂ alone (top right), ovalbumin alone (bottom left), and ovalbumin + nano-TiO₂ (bottom right) exposed rats (100X). B: Photomicrograph showing Nano-TiO₂ phagocytosis by a macrophage in an exposed rat (1000X).

A**B****Figure 1**

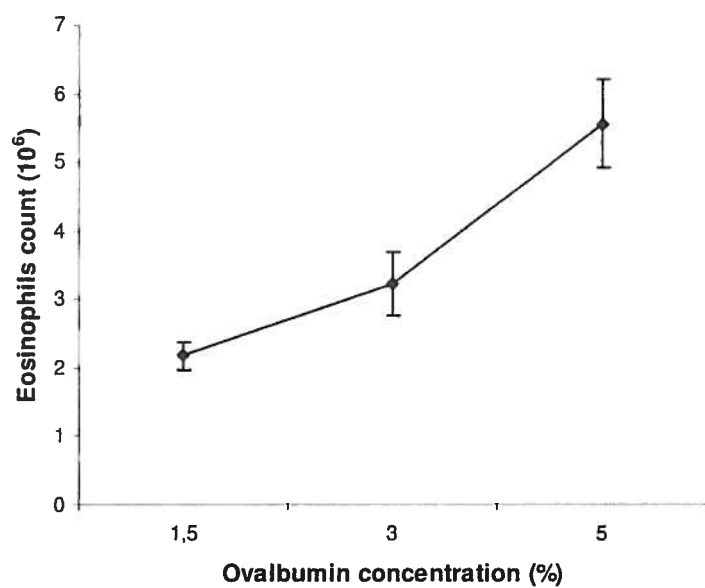


Figure 2

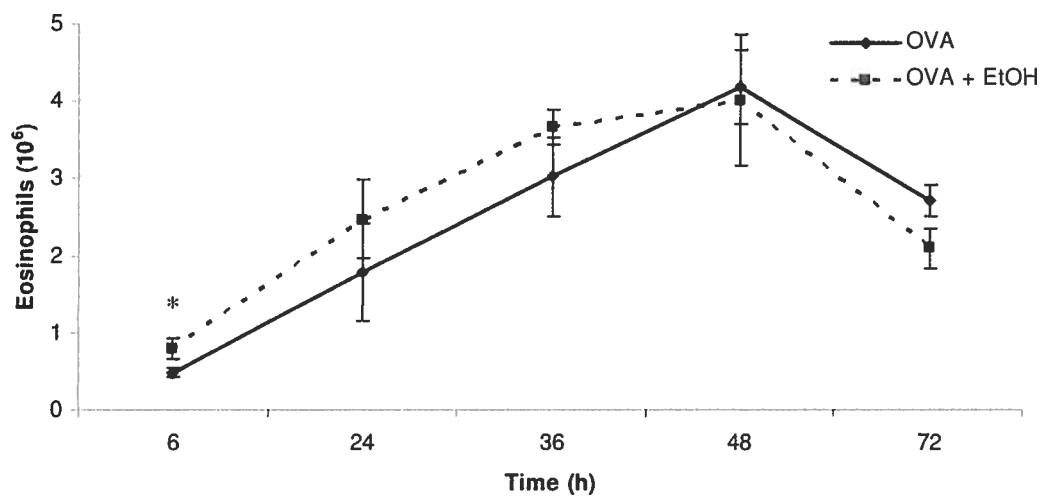


Figure 3

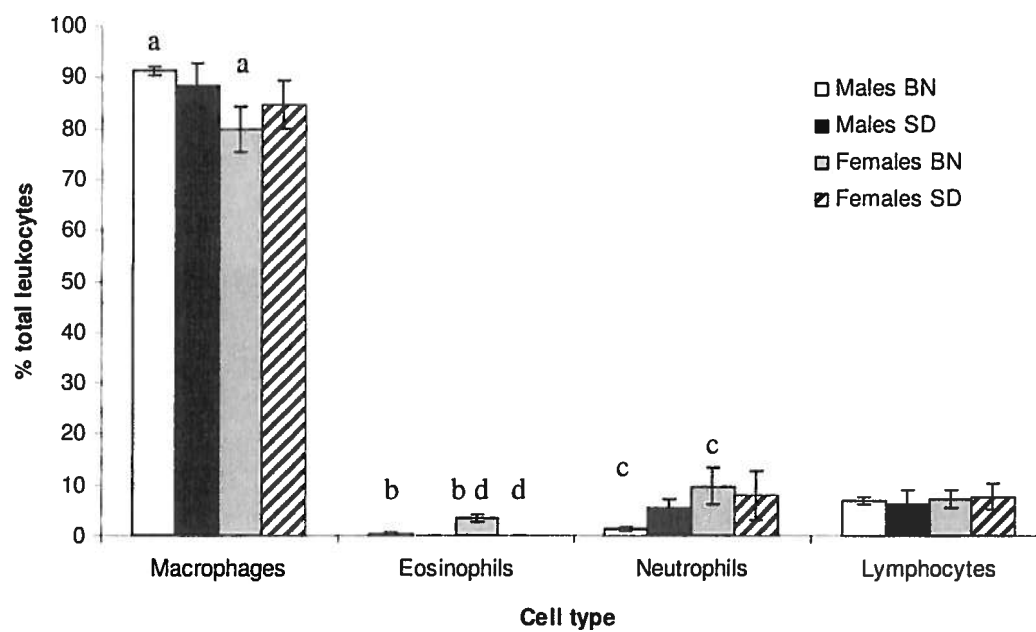
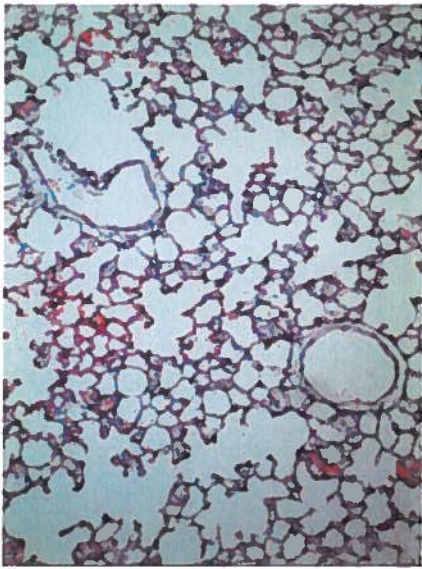
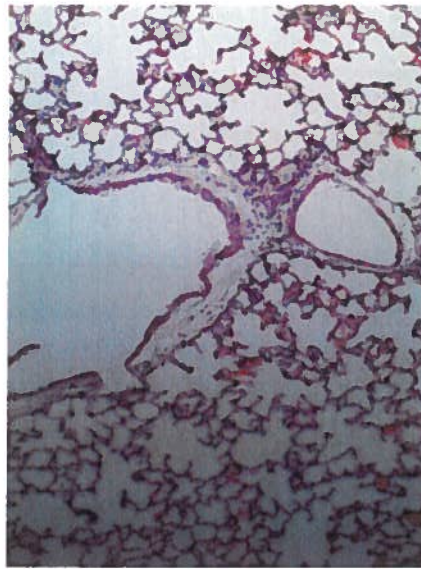


Figure 4

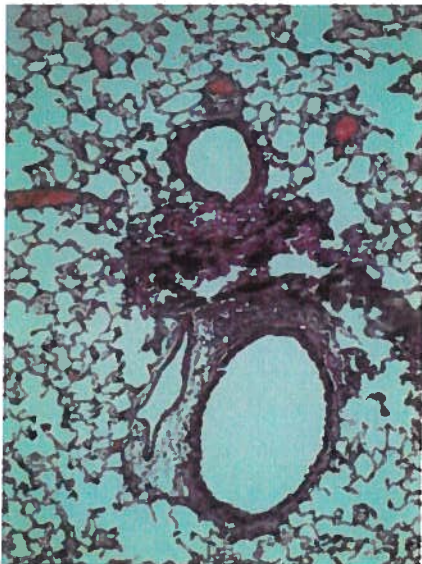
Control



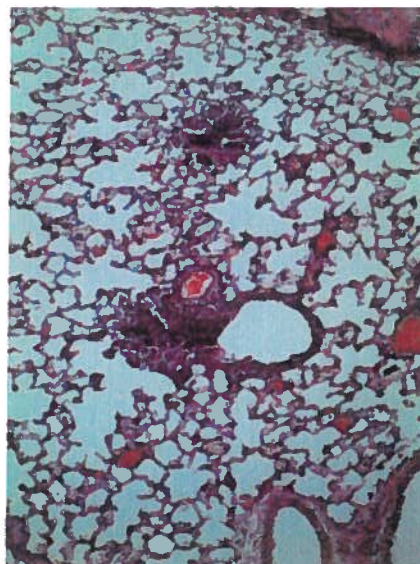
Ethanol



OVA



OVA + Ethanol

**Figure 5**

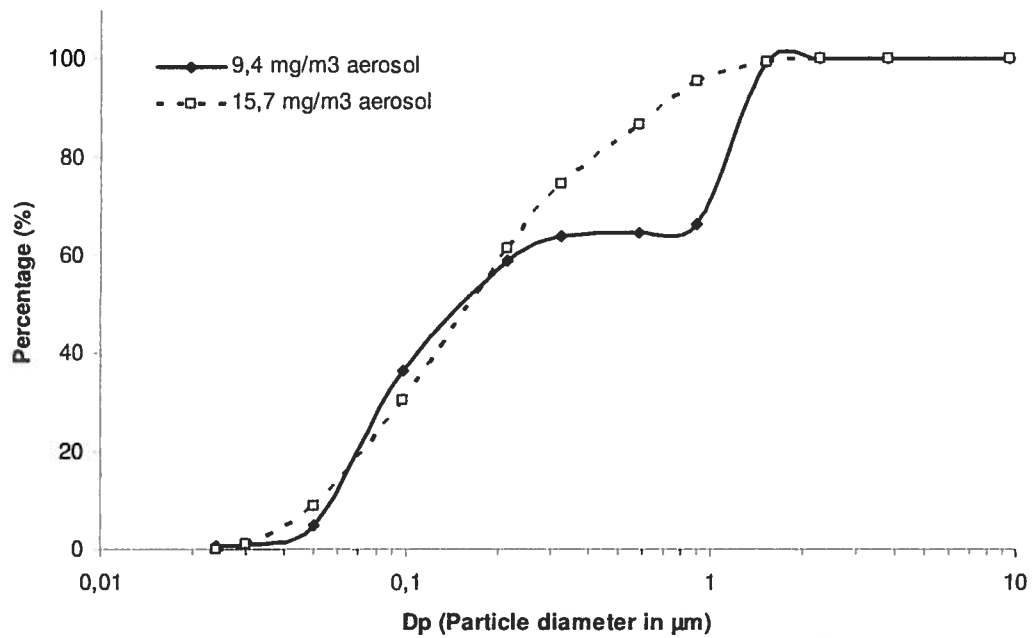


Figure 6

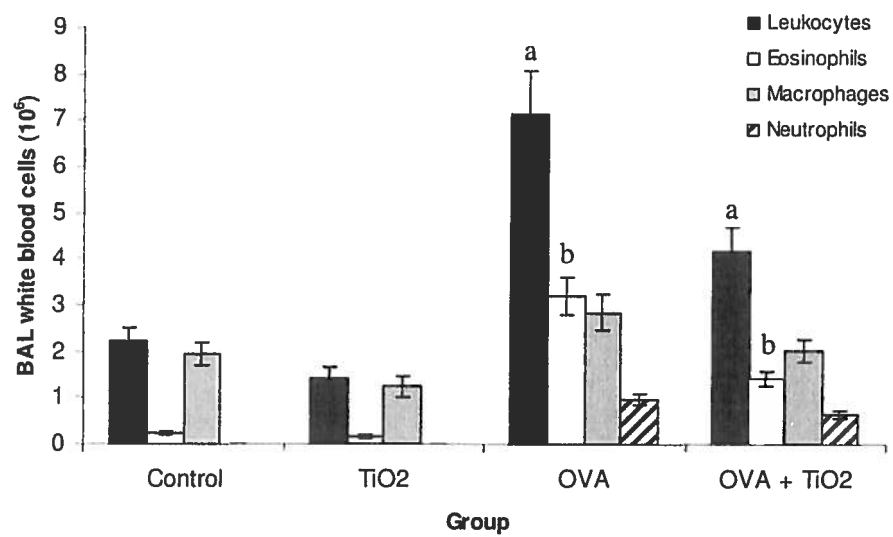
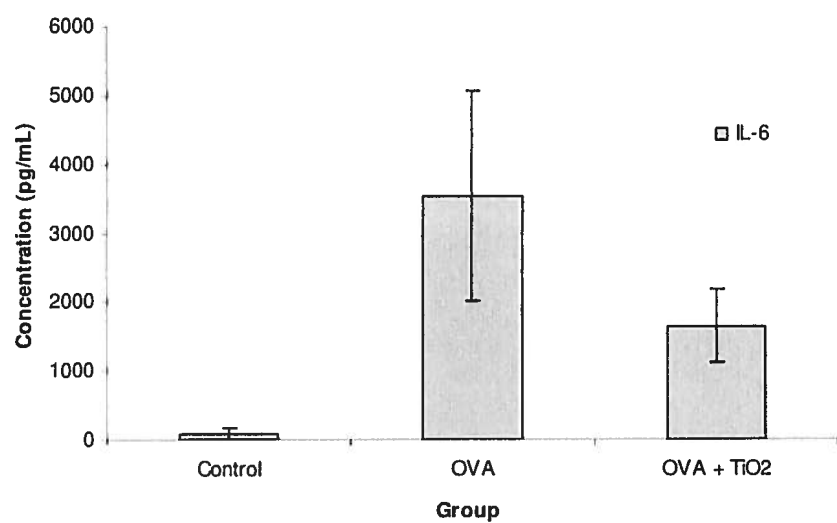
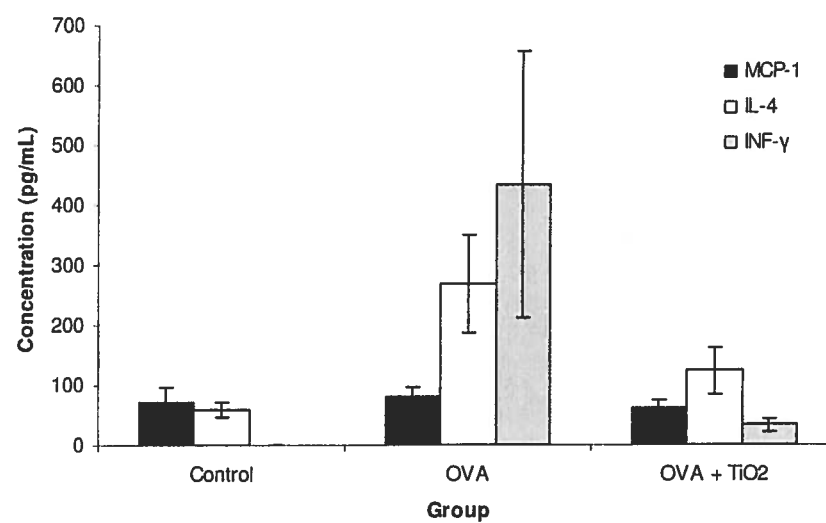
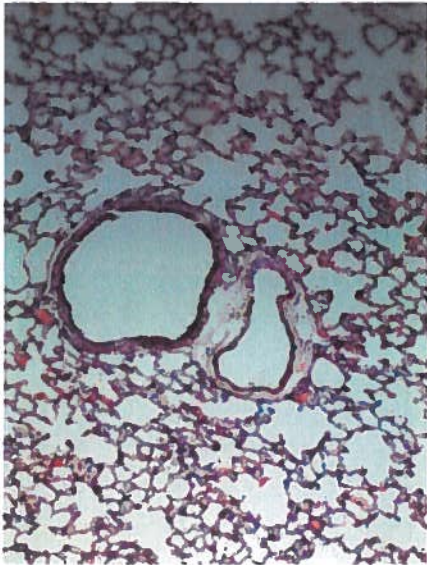
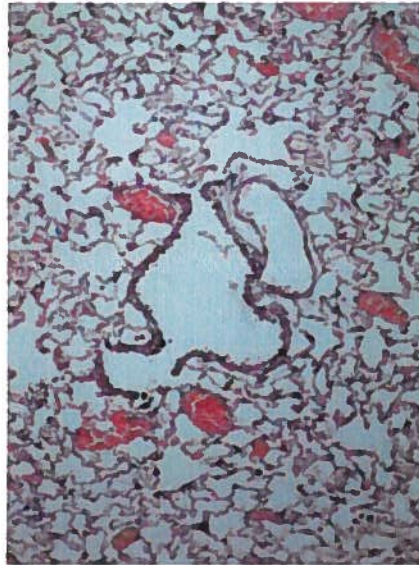


Figure 7

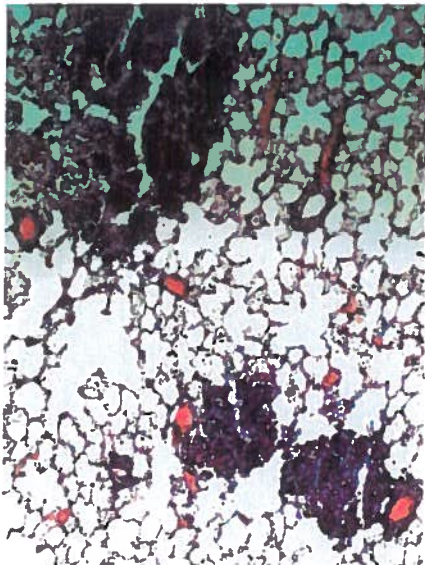
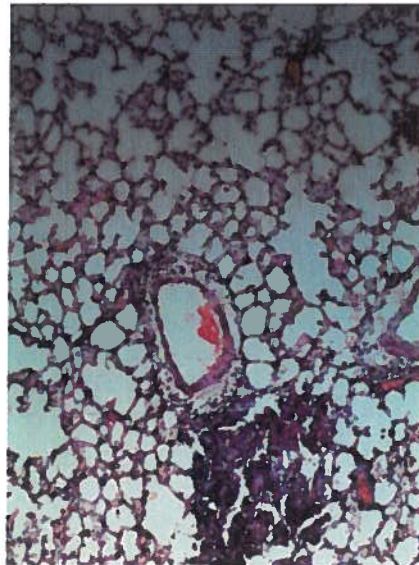
A**B****Figure 8**

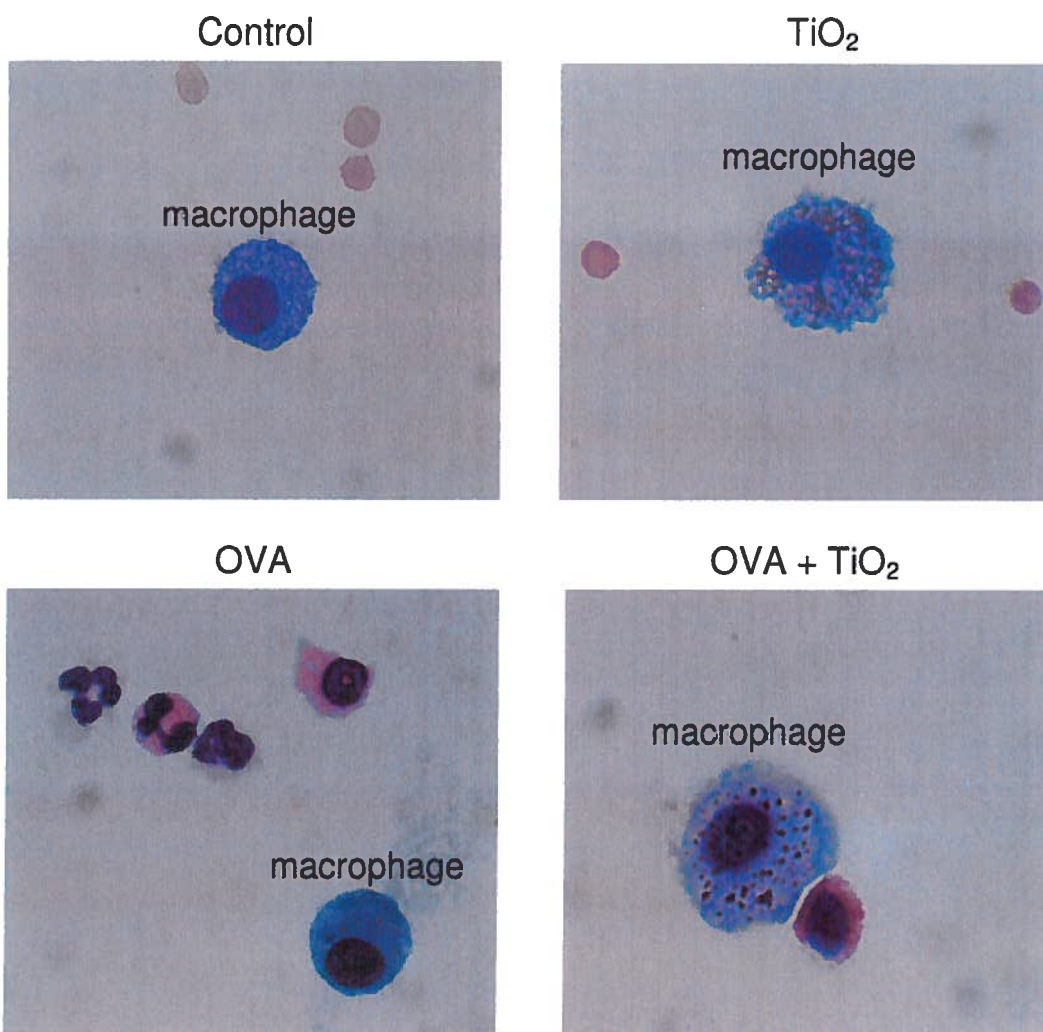
A

Control

TiO₂

OVA

OVA + TiO₂**Figure 9 (A)**

B**Figure 9 (B)**

SECTION 2:

OZONE, ALONE OR IN COMBINATION WITH ETHANOL, ATTENUATES ALLERGEN-INDUCED PULMONARY INFLAMMATION IN A RAT MODEL OF ALLERGIC ASTHMA

Andrea Scarino, Paolo M. Renzi, Susantha Mohottalage, Premkumari Kumarathasan, Renaud Vincent, Robert Tardif et Michel Charbonneau

Soumis pour publication dans *Toxicology Letters*, 2013

2.1. Résumé français de l'article

Une grande partie de la population, particulièrement dans les grandes villes, est exposée de façon chronique à des concentrations variables d'ozone, un polluant atmosphérique. Les études épidémiologiques ont rapporté des associations significatives entre l'exposition à des concentrations urbaines d'ozone et une augmentation du nombre de visites à l'urgence et des admissions hospitalières. L'asthme est une maladie respiratoire caractérisée par une hyperréactivité bronchique et une réponse inflammatoire soutenue. Des observations équivoques ont été rapportées quant aux effets de l'exposition à l'ozone sur l'inflammation pulmonaire allergique chez les animaux. Dans le but de déterminer si l'exposition à l'ozone peut moduler la réponse inflammatoire pulmonaire associée à une réaction asthmatique allergique, cette étude a utilisé un modèle animal de rat provoqué à l'ovalbumine (OVA) et exposé à l'ozone par voie d'inhalation sous des conditions d'expositions variées. Les leucocytes présents dans le liquide des lavages bronchoalvéolaires (BAL) chez les rats asthmatiques (provoqués à l'ovalbumine) 24 h suivant une exposition de 3 d à 0.4 ppm (4 h/d) d'ozone (48 h suivant les provocations allergéniques) n'étaient pas significativement différents lorsque comparés aux rats asthmatiques exposés à l'air. L'exposition des rats asthmatiques à 1 ppm d'ozone sous 3 conditions différentes ont diminué significativement ($p < 0.05$) le nombre de leucocytes totaux, d'éosinophiles et de neutrophiles. Cependant, une exposition unique à l'ozone s'est traduite par une augmentation de la contractilité trachéale maximale chez les rats asthmatiques. Les rats asthmatiques exposés à l'ozone ont montré une diminution significative des niveaux de MCP-1 dans le plasma et des niveaux de TNF- α , MIP-3 α et IL-13 dans le liquide des BAL lorsque comparés aux rats asthmatiques exposés à l'air. En conclusion, l'inflammation pulmonaire résultant de la réaction asthmatique

inflammatoire est diminuée par une exposition aiguë à l'ozone, tandis que la contractilité trachéale maximale est augmentée.

2.2. Contribution de l'étudiant

L'étudiant a contribué à l'élaboration du projet de recherche, c'est-à-dire la planification de chaque expérience (avec l'aide et le soutien des directeurs de recherche et des collaborateurs). L'étudiant a aussi piloté et effectué chaque expérience du début à la fin, c'est-à-dire la commande des animaux et matériels nécessaires, les expositions aux contaminants (avec l'aide d'Alexandra Noël pour les expositions aux nano-TiO₂), la collecte des échantillons (BAL et plasma) lors des journées de sacrifices des animaux (avec l'aide de Guylaine Lassonde, technicienne du laboratoire du Dr Charbonneau, pour les sacrifices), la préparation et l'analyse des échantillons, l'interprétation des résultats (avec l'aide des collaborateurs) et la rédaction de l'article.

**OZONE, ALONE OR IN COMBINATION WITH ETHANOL, ATTENUATES
ALLERGEN-INDUCED PULMONARY INFLAMMATION IN A RAT MODEL OF
ALLERGIC ASTHMA**

Running title: Ozone inhalation in asthmatic rats

**A Scarino¹, PM Renzi², S Mohottalage³, P Kumarathasan³, R Vincent³, R Tardif⁴ and M
Charbonneau¹**

¹ INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, Quebec, Canada.

² CHUM Research Center, Notre-Dame Hospital, Montreal, Quebec, Canada.

³ Health Canada, Environment Health Science and Research Bureau. Ottawa, Ontario, Canada

⁴ Département de santé environnementale et santé au travail. Université de Montréal,
Montreal, Quebec, Canada.

Please address correspondence to:

Michel Charbonneau, Ph. D.
Institut national de la recherche scientifique- Institut Armand-Frappier
Université du Québec
531, boul. des Prairies
Laval, Québec
Canada
H7V 1B7
Tel.: (450) 687-5010 ext. 8831
Fax: (450) 686-5309
E-mail: michel.charbonneau@iaf.inrs.ca

ABSTRACT

A large portion of the population, especially in large cities, is chronically exposed to variable concentrations of the environmental pollutant ozone. Epidemiological studies have reported significant associations between exposure to urban ozone concentrations and increases in emergency room visits and hospital admissions. Ethanol is an environmental pollutant of concern since it is being added to gasoline and will therefore be present in the atmosphere with other pollutants, such as ozone. Asthma is a respiratory disease characterized by bronchial hyper-responsiveness and a sustained inflammatory response. Equivocal observations have been reported on the effects of ozone exposure on allergen-induced pulmonary inflammation in animals. In order to determine if exposure to ozone can modulate the pulmonary inflammatory response associated with an allergic asthmatic response, this study used the ovalbumin (OVA) challenge rat model exposed to ozone, alone or in combination with ethanol, by inhalation under various temporal sequences. Inflammatory cells in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid of challenged rats 24 hours after exposure for 3 d (4 h/d) to 0.4 ppm ozone, alone or with 3000 ppm ethanol were not significantly different (48 h following OVA challenge) compared to air-exposed rats, aside from neutrophils, which increased in asthmatic animals exposed to both pollutants when compared to asthmatic animals and asthmatic animals exposed to ozone alone. Exposure of challenged rats to 1 ppm ozone under three different conditions caused significant decreases ($p < 0.05$) in total leukocytes, eosinophils, and neutrophils. Concomitant exposure to 1 ppm, but not 0.4 ppm, ozone and 3000 ppm ethanol also significantly decreased total leukocytes, eosinophils, and neutrophils. However, a single exposure to ozone produced a non significant increase in maximum tracheal contractility of challenged rats. Challenged rats exposed to 1 ppm ozone, alone or with 3000 ppm ethanol, showed a significant decrease in the plasma level of MCP-1 and BAL levels of $\text{TNF-}\alpha$, $\text{MIP-3}\alpha$ and IL-13 compared to air-exposed rats. In summary,

pulmonary inflammation resulting from an allergic asthmatic reaction is decreased by acute exposure to ozone, alone or with ethanol, while tracheal maximal contractility is increased.

INTRODUCTION

Ground-level ozone is an environmental pollutant of growing concern. It is produced through the photochemical reaction of UV light with nitrogen oxides or hydrocarbons, both present in exhaust of motor vehicles, in the presence of oxygen (4). This means that a large portion of the population, especially in large cities, is chronically exposed to variable concentrations of ozone by inhalation. Experimental studies have shown that ozone alone can induce pulmonary inflammation (2,18,23,27,36). Pulmonary function has been reduced with concentrations as low as 0.12 ppm when combined with moderate exercise in healthy human subjects (8). Ozone is known to induce cell damage and promote inflammation by reacting with lipids and proteins present in cell membranes and by causing oxidative stress (25).

Epidemiological studies have reported significant associations between exposure to urban ozone concentrations and increases in emergency room visits and hospital admissions (34,40,41), especially among children (26,32,33). Ozone exposure has also been linked to various adverse health effects, including death (2,12). A recent meta-analysis identified 136 risk estimates from 96 studies and indicated associations between ozone and various types of respiratory hospitalizations; however, study characteristics affected risk estimates (22).

Ethanol (EtOH) is being used in gasoline in order to reduce greenhouse gas emissions from motor vehicles. Although this initiative might be useful for the environment, human beings find themselves exposed to increasing concentrations of ethanol vapors by inhalation. We have previously reported that ethanol alone does not induce lung damage in metabolically impaired rats lacking type 2 aldehyde dehydrogenase, an important enzyme involved in the metabolism of acetaldehyde, a direct and toxic metabolite of ethanol (38). In another study, we reported that exposure to ethanol vapors alone does not exacerbate allergen-induced

inflammation in asthmatic rats (39). However, since both studies were performed using ethanol alone, it is important to evaluate its effect in the presence of known toxic pollutants affecting the general population, such as ozone. It has been suggested that ozone can affect the tight junctions of the airway epithelium (48, 49), which could increase the amount of ethanol entering the lungs and therefore exert a potential toxic effect which would otherwise not be present. In fact, ethanol has been shown to be a respiratory tract irritant at high concentrations (50).

Asthma, a respiratory disease characterized by bronchial hyper-responsiveness and a sustained inflammatory response, affects approximately 300 million individuals worldwide (46). One of the most important components of allergic asthma, which affects 90% of asthmatic subjects, is severe airway inflammation induced by exposure to allergen. Eosinophils are known to play a crucial role in asthma pathogenesis. Studies have shown that in the absence of eosinophils, asthmatic mice do not develop important symptoms associated with asthmatic reaction, such as mucus accumulation, airway hyperresponsiveness (AHR), and remodeling of the airways (19,29). Similarly, ozone is also capable of inducing an eosinophilic inflammatory reaction in humans (9), guinea pigs (47), and Brown Norway rats (20). The latter study showed that in rats exposed to ozone 1.2 ppm for 6 h the number of eosinophils present in bronchoalveolar lavages (BAL) immediately after and at 20 h was 3 and 15-fold greater, respectively, compared to air-exposed controls. Exposure to ozone has been reported to increase an allergen-induced pulmonary inflammation in sensitized mice by increasing the number of neutrophils and eosinophils, as well as inflammatory mediators such as IL-5, GM-CSF, and G-CSF (7,24). In contrast, Wagner et al. (2007) (45) showed that leukocyte, macrophages, and eosinophil increases caused by an allergen challenge were unaffected by exposure to 1 ppm of ozone (8 h/d, for 2 d).

Scannel et al. (1996) (37) showed that asthmatic subjects exposed to 0.2 ppm ozone for 4 h during mild exercise had significant increases in inflammatory cells and markers in BAL fluid collected 18 h after ozone exposure. Hernandez et al. (2010) (16) reported that atopic asthmatic subjects have increased airway inflammatory responses to ozone (0.4 ppm for 2 h with intermittent exercise). Increased Toll-like receptor 4 expression suggests a potential pathway through which ozone generates the inflammatory response in allergic asthmatic subjects but not in atopic subjects without asthma. They suggested that mild atopic asthma confers an increased risk for exacerbation of ozone-induced lung disease through promoting an enhanced innate immune inflammatory response to ozone. The greater susceptibility of asthmatic subjects reported in these two studies (16,37) did not however assess the possible effects of ozone on the intensity of an allergen-induced asthmatic inflammation at the time of ozone exposure. Therefore, this study aimed to determine if exposure to ozone can modulate the pulmonary inflammatory response associated with an allergic asthmatic response. To this end, we used an allergic rat model, the ovalbumin (OVA) sensitized and pulmonary challenged Brown Norway rats, to investigate the impact of ozone inhalation exposure on the pulmonary toxicity by measuring various markers of inflammation and airway contractility.

MATERIALS AND METHODS

Allergen challenge and induction of an inflammatory reaction in rat lungs was performed as previously described (39). Briefly, male Brown Norway rats (6-8 weeks old), known to have an enhanced Th2 response, were sensitized by a s.c. injection of allergen, OVA (1 mL solution containing 0.9% saline (w/v), 1 mg OVA, and 3.5 mg aluminum hydroxide (adjuvant)) and 14 days later, animals were challenged for 15 min by inhalation of a freshly

prepared 0.9% saline solution containing 1.5% (w/v) OVA. This exposure was found to cause a response around 30-40% of the maximal pulmonary inflammation, allowing us to verify if ozone could modulate, upwardly or downwardly, the inflammatory asthmatic response caused by allergen inhalation. The pulmonary response was determined by measuring increases in leukocytes in bronchoalveolar lavages (BAL) and different mediators 48 hours after allergen challenge.

Ozone and ethanol exposures

Animals (n = 8 per group) were kept on a 12 h-light/dark cycle in a humidity- and temperature-controlled room prior to experimentation. During the inhalation exposure, animals were individually caged in the chamber and were not provided with food or water. Rats were exposed to ozone alone (0.4 or 1.0 ppm) or to a mixture of ozone (0.4 or 1.0 ppm) and ethanol (3000 ppm) (95%, Les Alcools de Commerce Inc., Montreal, Quebec), 4 h/d, for up to 3 consecutive days. Various exposure scenarios were used in order to assess the effects of both the ozone concentration and the timing of exposure in allergen-challenged rats (figure 1). In protocols 1 and 2, ozone is administered 24 hours prior, at the time of and 24 hours after allergen challenge, therefore differing only in the ozone concentration used (ethanol was used in protocol 1, but not 2). In protocol 3, the timing of three repeated exposures to ozone is changed and in protocol 4 the total number of exposures to ozone varies (ethanol was used in protocol 3, but not 4).

Exposures were conducted in a dynamic exposure chamber of 500 L (Unifab, Kalamazoo, MI) for which the air-flow rate was set at 280 L/min. Ozone was generated from pure oxygen (medical grade) using an ozonator and concentration was monitored continuously by ultraviolet spectrometry (Model 1003-AH, Dasabi Environmental, Glendale, CA) and

stabilized by feedback control ($\pm 5\%$). Ethanol was delivered in the inhalation chamber using a high-pressure liquid chromatography pump (HPLC 2510, Varian Canada, Montreal, Quebec). A Hewlett-Packard HP-5890 Series II gas chromatograph equipped with an Air Cadet pump (Cole Parmer model 7530-40) was used to monitor the ethanol concentration in the exposure chamber at 10 min intervals.

Bronchoalveolar lavages (BAL)

The total number and percentage of white blood cells and cytokine levels were analyzed in BAL fluid 48 h following the OVA challenge, which represents the peak in the inflammatory response as determined in a previous temporal study (38). The BAL method was used as previously described (38). Briefly, animals were anesthetized with isoflurane and exsanguinated from the descending abdominal aorta. Five ml of saline (0.9%) was injected into the lungs through the trachea, using a 16G needle, and then removed; this was repeated four more times. Following centrifugation of the pooled return (approximately 23 mL), the supernatant was removed and cells were resuspended in 500 μ l of saline (100 μ l aliquots were fixed 1:1 with formalin for cell count). The lungs and the trachea were fixed with fresh buffered formalin and then removed and placed in containers with formalin at room temperature for 24 h, before being transferred into PBS solution and stored at 4 C.

Cell count and differential

Fixed white blood cells (WBC) were mixed 1:1 with methylene blue and then counted using a hemacytometer. To determine the proportion of WBC represented by macrophages, eosinophils, neutrophils, or lymphocytes, 100 μ l were centrifuged at 600 rpm for 2 min using a Cytospin, followed by fixation and coloration with Hema 3 solutions (Fisher Diagnostics no cat. 122-911A, 122-911B, and 122-911C). Slides were analyzed using a photonic microscope.

Cytokine analysis in plasma and BAL

The plasma concentration of seven cytokines relevant to asthma inflammation was measured using the Milliplex Rat Cytokine Kit (Millipore, Ottawa, Canada): MCP-1, IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, INF- γ , and TNF- α . Assays were performed using Luminex xMAP Technology (Bio-Plex 200 System, Biorad, Ottawa, Canada). The relative levels of 29 cytokines were measured in BAL fluid using Rat Cytokine Array Panel A (R&D Systems). BAL samples for each group (8 rats/group) were respectively pooled together to perform the assay. The intensity of each spot on the membranes was measured with software AlphaEase FC.

Tracheal contractility

To verify if ozone could enhance airway hyperresponsiveness (AHR) in asthmatic animals, we measured *ex vivo* methacholine-induced force generation on tracheal rings harvested immediately after sacrifice of the animals (n = 4 per group). Sections of tracheas (2-3 rings) were submerged in a tissue bath containing 5 mL of Krebs-Henseleit (K-H) physiological solution aerated with a mixture of O₂/CO₂ (95%:5%) at 37 °C. Sections were supported by a Plexiglas rod with a stainless steel pin. The upper support was attached to an isometric transducer and changes in tension were measured using a polygraph. Initial tension was set at 0.5 g and baths were washed every 10 min with fresh K-H solution during 60 min. Once a steady-state tension was reached, methacholine was added starting with the lowest concentration.

Lung histology

Lungs were removed and sliced into sections 2-3 mm thick. Following dehydration of the sections in a series of ethanol solutions ranging from 65% to 100%, ethanol was removed

using Citrisolv (Fisher Scientific, Montreal, Quebec) as solvent and sections were then embedded into paraffin. Using a microtome, sections were sliced into 5 μm slices and colored using an H&E staining protocol. Pictures were taken using a Cooke SensiCam High Performance camera mounted on a Leica DMRE microscope.

Statistical Analysis

Results are presented in the form of the mean $\pm$ SEM and statistical significance was assessed using t-test, ANOVA, and Tuckey's test with $p < 0.05$.

RESULTS

Cellular and histological analyses

In order to verify the pulmonary effect of ozone inhalation at the time of allergen challenge, i.e. during an asthmatic reaction, four exposure protocols were elaborated. This allowed us to assess of the importance of various parameters, such as ozone concentration, exposure duration, and timing of exposure on the inflammatory response present during an asthmatic reaction. Our primary endpoint was the effect of ozone on leukocyte count, which is measured in all four protocols. However, other endpoints such as inflammatory mediators, tracheal contractility, and histological analyses were examined only in select protocols where a deeper understanding or validation of the primary endpoint was required.

Protocol #1:

The number of inflammatory cells (mean $\pm$ SEM) present in BAL fluid of OVA challenged rats, 24 hours after the last exposure to 0.4 ppm ozone, alone or in combination with ethanol, were not significantly different ($p > 0.05$) from that in rats exposed to air, for total leukocytes, eosinophils, and macrophages (Figure 2). In the OVA/ozone/ethanol group, neutrophils were

significantly higher than OVA and OVA/ozone groups. Results of tracheal contractility show that in asthmatic rats, exposure to ozone (OVA/ozone) or ozone-ethanol mixture (OVA-ozone-ethanol) did not change the tracheal contractility when compared to the OVA group alone (Figure 3A).

Protocol #2:

Exposure of allergen-challenged rats to 1 ppm ozone, with BAL performed 24 h following the third ozone exposure produced significant decreases in inflammatory cells ($p < 0.05$) when compared to allergen-challenged rats exposed to air (mean $\pm$ SEM) for total leukocytes (2.1-fold), eosinophils (3.7-fold), and neutrophils (2.2-fold) (Figure 4). Differences were not significant for macrophages. In non-allergen-challenged rats, exposure to ozone significantly increased total leukocytes (2.0-fold), macrophages (2.1-fold), and neutrophils (2.9-fold) when compared to no ozone exposure (Figure 4). Differences were not significant for eosinophils.

Protocol #3:

In allergen-challenged rats exposed to 1 ppm ozone, leucocytes, eosinophils, macrophages and neutrophils in BAL performed immediately following the third ozone exposure were all significantly decreased ($p < 0.05$) when compared to allergen-challenged rats exposed to air (total leukocytes : 3.3-fold, eosinophils : 3.6-fold, macrophages : 2.4-fold, and neutrophils : 5.5-fold) (Figure 5). In allergen-challenged rats exposed to 1 ppm ozone and 3000 ppm ethanol, leucocytes, eosinophils, macrophages and neutrophils in BAL performed immediately following the third ozone exposure were all significantly decreased ($p < 0.05$) when compared to allergen-challenged rats exposed to air (total leukocytes: 4.6-fold, eosinophils: 6.9-fold, macrophages: 2.9-fold, and neutrophils: 7.2-fold). Eosinophils also decreased significantly when compared to allergen-challenged rats exposed to 1 ppm ozone

alone (Figure 5). In non-allergen-challenged rats, exposure to ozone caused a significant increase in eosinophils (3.5-fold), but not in total leukocytes, macrophages, and neutrophils (Figure 5). Photomicrographs confirmed that the inflammation (see dark cluster of cells) is reduced by ozone in OVA rats (Figure 6).

Protocol #4:

This protocol differs from the previous protocol only in the fact that ozone exposure at days 15 and 16 was not done and did not include a group exposed to both ozone and ethanol. It shows that a single exposure to ozone is sufficient to yield similar results, i.e. when compared to allergen-challenged rats exposed to air a single exposure to 1 ppm ozone for 4 h significantly decreased ($p<0.05$) total leukocytes (1.9-fold), eosinophils (2.1-fold), and neutrophils (3.1-fold) (Figure 7). Changes in macrophages between both groups were not significant. In non-challenged rats, exposure to ozone significantly decreased total leukocytes (2.1-fold), eosinophils (3.8-fold), and macrophages (2.0-fold) when compared to controls (Figure 7). Difference was not significant for neutrophils. In non-challenged rats, exposure to ozone produced an increase (1.6-fold), yet non-significant ($p=0.30$), in maximum tracheal contractility (Figure 3B).

Levels of inflammatory mediators in plasma and BAL

OVA-challenged rats exposed to either filtered air or ozone under protocol 1 showed similar plasma cytokine levels for MCP-1, IL-4, IL-6, and IFN- γ , while levels of IL-1 β , IL-10, and TNF- α were below the detection limit (data not shown). Allergen-challenged rats exposed to ozone, alone or in combination with ethanol, under protocol 3 showed a significant decrease ($p<0.05$) in the level of plasma MCP-1 compared to air-exposed-allergen-challenged rats; the level for the latter was significantly higher ($p<0.05$) than the control value (Figure 8). Levels

of other plasma cytokines measured, i.e. IL-4, IL-6, and IFN- γ , were unchanged, whereas levels for IL-1 β , IL-10, and TNF- α were below the detection limit (data not shown). In non OVA-challenged rats, exposure to ozone did not significantly change all the plasma cytokines measured (data not shown). Levels for IL-4, IL-6, and INF- γ in BAL fluid were unchanged under all the conditions studied. However, when compared to air-exposed OVA-challenged rats, other important cytokines involved in inducing and maintaining allergic inflammation, such as TNF- α , MIP-3 α and IL-13, decreased by 38%, 60%, and 83% in the OVA/ozone group, respectively. Other decreases in BAL cytokines (OVA-O₃, OVA-O₃-ethanol) occurred in CINC-1 (69%, 75%), CINC-2 α/β (92%, 95%), CX3CL1/Fractalkine (51%, 67%), IL-1 α /IL1-F3 (75%, 51%), IP-10/CXCL10 (35%, 47%), LIX (70%, 78%), MIP-1 α /CCL3 (71%, 57%), MIP-3 α /CCL20 (60%, 71%), TNF- α (38%, 61%), and CXCL5/Thymus chemokine (64%, 74%). L-Selectin (CD62L/LECAM-1) was the only BAL cytokine, out of a total of 29 analyzed, which showed a small increase (15%, 12%). Plasma levels of ET-1 did not yield significant differences between groups for both protocols 1 and 3 (data not shown).

DISCUSSION

In the present study, we assessed whether exposure to ozone modulated the lung inflammatory response in sensitized BN rats following the onset of an asthmatic reaction induced by allergen inhalation. Considering the putative ozone potential to increase the severity of asthmatic symptoms, we first exposed animals to a low concentration of 0.4 ppm ozone (protocol #1) and measured inflammation 24 h following the last of the three exposures to ozone. Results showed that ozone exposure did not affect inflammation caused by the OVA challenge. We first hypothesized that the absence of expected toxicity possibly resulted from an insufficient ozone concentration to induce lung injury or from a possible recovery of the pulmonary inflammation during the 24 h period after the final ozone exposure. Therefore, we

increased the ozone concentration to 1 ppm in protocols #2, #3, and #4. Considering that i) the human lung receives four to five times more ozone than in Fisher F-344 rats, ii) Brown Norway rats are less sensitive to ozone exposure than F-344 rats, and iii) animals were exposed for 4-hours, it is reasonable to assume that exposure to 1 ppm in Brown Norway rats corresponds to a human dose ($0.1 \text{ ppm} \times 8 \text{ hr} \times 5 \text{ (human/rat ratio)}$) close to the National Ambient Air Quality Standard of 0.075 ppm average over 8-hours (15,44,45). In addition, based on the report of Wagner et al. (2007) (45) who did not observe cellular changes (except neutrophils) when BAL were performed 24 h following the final ozone exposure, we choose to collect BAL fluid immediately following final ozone exposure in protocols #3 and #4. A group of healthy rats exposed to ozone only was also included in protocols #2, #3, and #4 in order to verify if the dose selected of ozone alone is capable of inducing pulmonary inflammation in BN rats.

In non asthmatic rats, the results stemming from the three protocols involving the same concentration of ozone alone (1 ppm) indicated that the timing and/or the duration of exposure may play an important role in the onset of pulmonary inflammation, with total leukocytes in ozone alone compared to control groups being significantly higher in protocol #2, unchanged in protocol #3, and significantly lower in protocol #4.

Surprisingly in asthmatic allergen-challenged rats, ozone significantly decreased the OVA-induced inflammation as measured by cells present in BAL fluid for all the protocols that employed a concentration of 1 ppm ozone. These results were unexpected because it has previously been shown that in OVA-sensitized BALB/c mice exposure to 0.5 ppm ozone once per week (4 h) for four weeks enhanced the OVA-induced inflammatory cells infiltration (7). Kierstein et al. (2008) (24) showed that in BALB/c mice sensitized to *Aspergillus fumigatus*

(Af), a single exposure (2 h) to 3 ppm (BAL performed 12 h post exposure) increased the total number of BAL inflammatory cells and eosinophils 96 h following Af challenge. The level of cytokines that play a crucial role in the presence of eosinophils in the lungs during inflammation (IL-5, GM-CSF, and G-CSF) were significantly higher in mice exposed to Af and ozone when compared to mice exposed to Af only. Another study using a different animal model of asthma than that presented in this study, i.e. repeated exposure to allergen vs. one single exposure in this study, found that concomitant exposure (6 weeks, continuously or intermittently) to 0.2 or 0.5 ppm ozone and ovalbumine resulted in a decreased total leukocyte count in the lungs, but not when animals were exposed to ozone for 2 weeks either prior to or after 4 weeks of ovalbumin exposure (3 d/week) (51). We have considered the possibility, as suggested by Persson & Uller (2010) (35), that inflammatory cells might persist in the lung interstitium during lung disease/injury instead of migrating towards the airway lumen, therefore decreasing the number of leukocytes found in BAL fluid. However this hypothesis was rejected following lung histology, which showed that the level of inflammation in the lungs was consistent with BAL cellular results (correlation between Figures 5 and 6).

We recently reported that exposure to nanoparticles of TiO_2 reduced the allergic inflammation as measured by total inflammatory cells and eosinophils, and decreased systemic and BAL cytokines in the same OVA-induced allergic Brown Norway rat model (39). Indeed, TiO_2 nanoparticle inhalation caused a decrease in both Th2 cytokines and the Th1 cytokine (IFN- γ) retrieved in either plasma or BAL. Given that in the same allergic asthma rat model both ozone and TiO_2 nanoparticles showed a decrease in inflammation at the morphological, cellular, and molecular level, the mechanisms underlying this reduction in inflammation may be similar. Both compounds were reported to induce a toxic response at the cellular level in a similar manner, i.e. by inducing oxidative stress (30,31). In asthmatic rats

exposed to ozone, decreases in macrophages and key mediators involved in macrophage activity, such as plasma MCP-1, BAL MIP-1 α /CCL3, and BAL MIP-3 α /CCL20 suggest that macrophage activity may also play a crucial role in the reduction of the asthmatic inflammatory response. However, given that inflammation in general, for both cells and mediators, decreased in asthmatic animals exposed to ozone, it is difficult to draw definite conclusions on the precise mechanism causing this reduction.

Other studies have shown that exposure to ozone in the allergen-challenged rat does not necessarily translate into an enhancement of inflammatory cell infiltration into the lungs. For instance, Wagner et al. (2007) (45) induced an asthmatic response in Brown Norway rats by sensitizing and 2 weeks later challenging animals with OVA, which increased total leukocytes and eosinophils present in BAL fluid by 267% and 4000%, respectively. Their results showed that exposure to 1 ppm ozone, 8 h per day for two days, in OVA-sensitized and challenged rats did not change total leukocytes, macrophages, or eosinophils with BAL performed 24 h following the final ozone exposure (96 h following OVA challenge). BAL cytokine results did not, however, support BAL cellular results, showing a significant increase in both MCP-1 and IL-6.

Interestingly, the studies mentioned above showing an increase in lung inflammation in allergen-challenged animals following ozone exposure used mice, whereas studies showing a lack of inflammatory toxicity (45, and our study) were performed with rats. Therefore, we hypothesize that these contradictory results may be related to the choice of the animal model. However, Hatch et al. (1986) (14), who studied the pulmonary effects of ozone exposure at various concentrations using different species in order to find the best animal model for ozone studies, found that mice and rats did not react differently to direct ozone exposures,

suggesting that both are equally appropriate in ozone studies. Another possibility may reside in the concentration of ozone used in studies showing different results. Indeed, Kierstein et al. (2008) (24) used 3 ppm ozone, which is 3-fold higher than the concentration used in Wagner et al. (2007) (45) and our study. It is likely that, ozone being an oxidizing agent acting mainly on proteins and fatty acids (25), increasing exposure concentration may translate into increased cell damage, and in turn, increased inflammation.

Another interesting result came from tracheal contractility experiments. Contrary to what is reported in the literature (11,21,24), our results did not show that the OVA challenge in sensitized rats increased airway hyperresponsiveness (AHR) when compared to control group. However, while our inflammatory cell results suggest a “protection” from ozone with regards to allergen-induced pulmonary inflammation, the addition of ozone to allergen challenge did not show a decrease, but rather a trend to increase tracheal contractility in both experiments where data was collected, i.e. protocols #1 and # 3. Although results did not reach a level of significance, probably due to low sample size, the observed trend needs to be addressed. While studies have shown that cytokines play an important role in AHR by increasing smooth muscle sensitivity and therefore tracheal contractility (1,10,42), the decrease of cytokines in OVA/ozone group when compared to OVA group herein suggests that different molecules/mediators may be involved in regulating inflammation and hyperresponsiveness. For instance, secondary autacoid mediators, such as leukotrienes and prostaglandins, are known to play a key role in AHR by stimulating the contraction of the airway smooth muscle (5,13,17). Indeed, Dye et al. (1999) (6) has shown that inhalation of ozone in rats increases the release of prostaglandins when animals were exposed to 1 ppm, but not 0.1 ppm ozone. This may explain the enhanced difference in tracheal contractility of OVA/ozone vs. OVA in protocol #4 (1 ppm ozone) when compared to protocol #1 (0.4 ppm ozone). Further, studies

have shown that prostaglandins and lipid mediators that derive from them have anti-inflammatory effects (28,43). The diverging effects of prostaglandins in the airways may therefore account for the discrepancy between inflammation and AHR results in our study.

We recently reported that ethanol inhalation in asthmatic rats does not modulate allergen-induced pulmonary inflammation at various times following allergen challenge, including 48 h (peak inflammation, used in this study) (39). In this study, the similarities in the number of inflammatory cells present in the BAL in asthmatic rats exposed to ozone or ozone and ethanol indicate that the attenuating effect observed by these pollutants were mainly due to ozone rather than ethanol. Interestingly, coexposure to ozone and ethanol had a significant effect in the decrease of eosinophils, which is difficult to explain given that the levels of cytokines are also similar between both groups.

In conclusion, our results show that pulmonary inflammation resulting from an allergic asthmatic reaction is decreased by acute exposure to 1 ppm ozone. However, this protective role of ozone is specific to inflammation since tracheal contractility results showed a trend to increase following exposure to ozone after allergen challenge increases AHR. Extrapolation of these data for public health assessment suggests that the increases in emergency room visits of asthmatic subjects following periods of high ozone concentration in urban air, as proven by epidemiological studies, may not be the result of an increase in pulmonary inflammation, but rather to an enhanced sensitivity of the airway smooth muscle causing AHR. Further studies are needed to elucidate the mechanism responsible for this effect.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to acknowledge the technical contribution of Guylaine Lassonde, Ginette Charest-Tardif, and the technical team at Topigen Pharmaceuticals Inc. We thank the Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (*AFSSET*) and the Réseau de recherche en santé environnementale (RRSE) for their financial support.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare that there are no conflicts of interest.

REFERENCES

1. **Amrani Y, Panettieri RA Jr.** Cytokines induce airway smooth muscle cell hyperresponsiveness to contractile agonists. *Thorax* 53(8): 713-6, 1998.
2. **Anderson HR, Ponce de Leon A, Bland JM, Bower JS, Strachan DP.** Air pollution and daily mortality in London: 1987-1992. *BMJ* 312: 665-669, 1996.
3. **Aris RM, Christian D, Hearne PQ, Kerr K, Finkbeiner WE, Balmes JR.** Ozone-induced airway inflammation in human subjects as determined by airway lavage and biopsy. *Am Rev Respir Dis* 148: 1363- 1372, 1993.
4. **Bascom R, Bromberg PA, Costa DA, Devlin R, Dockery DW, Frampton MW, Lambert W, Samet JM, Speizer FE, Utell M.** American Thoracic Society, Committee of the Environmental and Occupational Health Assembly: Health effects of outside air pollution, part I. *Am J Respir Crit Care Med* 153:3-50, 1996.
5. **Brightling CE, Bradding P, Symon FA, Holgate ST, Wardlaw AJ, Pavord ID.** Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. *N Engl J Med* 346: 1699-705, 2002.
6. **Dye JA, Madden MC, Richards JH, Lehmann JR, Devlin RB, Costa DL.** Ozone effects on airway responsiveness, lung injury, and inflammation. Comparative rat strain and in vivo/in vitro investigations. *Inhal Toxicol* 11(11):1015-40, 1999.
7. **Farraj AK, Boykin E, Ledbetter A, Andrews D, Gavett SH.** Increased lung resistance after diesel particulate and ozone co-exposure not associated with enhanced lung inflammation in allergic mice. *Inhal Toxicol* 22(1): 33-41, 2010.
8. **Folinsbee, L.J., McDonnell, W. & Horstman, D.H.** Pulmonary function and symptom responses after 6.6 hour ozone exposure to 0.12 ppm will moderate exercise. *JAPCA* 38: 28, 1988.
9. **Frischer T, Studnicka M, Halmerbauer G, Horak F Jr, Gartner C, Tauber E, Koller DY.** Ambient ozone exposure is associated with eosinophil activation in healthy children. *Clin Exp Allergy* 31: 1213-1219, 2001.
10. **Guo M, Pascual RM, Wang S, Fontana MF, Valancius CA, Panettieri RA Jr, Tilley SL, Penn RB.** Cytokines regulate beta-2-adrenergic receptor responsiveness in airway smooth muscle via multiple PKA- and EP2 receptor-dependent mechanisms. *Biochemistry* 44(42):13771-82, 2005.
11. **Haczku A, Takeda K, Hamelmann E, Oshiba A, Loader J, Joetham A, Irvin C, Kikutani H, Gelfand EW.** CD23 deficient mice develop allergic airway hyperresponsiveness following sensitization with ovalbumin. *Am J Respir Crit Care Med* 156(6): 1945-55, 1997.
12. **Halonen JI, Lanki T, Tiittanen P, Niemi JV, Loh M, Pekkanen J.** Ozone and cause-specific cardiorespiratory morbidity and mortality. *J Epidemiol Community Health* 64(9): 814-20, 2010.

13. **Hardy CC, Robinson C, Tattersfield AE, Holgate ST.** The bronchoconstrictor effect of inhaled prostaglandin D₂ in normal and asthmatic men. *N Engl J Med* 311: 209-213, 1984.
14. **Hatch GE, Slade R, Stead AG, Graham JA.** Species comparison of acute inhalation toxicity of ozone and phosgene. *Toxicol Environ Health* 19(1):43-53, 1986.
15. **Hatch GE, Slade R, Harris LP, McDonnell WF, Devlin RB, Koren HS, Costa DL, McKee J.** Ozone dose and effect in humans and rats. A comparison using oxygen-18 labeling and bronchoalveolar lavage. *Am J Respir Crit Care Med* 150: 676-683; 1994.
16. **Hernandez ML, Lay JC, Harris B, Esther CR Jr, Brickey WJ, Bromberg PA, Diaz-Sanchez D, Devlin RB, Kleeberger SR, Alexis NE, Peden DB.** Atopic asthmatic subjects but not atopic subjects without asthma have enhanced inflammatory response to ozone. *J Allergy Clin Immunol* 126(3):537-44.e1, 2010.
17. **Holgate ST, Peters-Golden M, Panettieri RA, Henderson WR Jr.** Roles of cysteinyl leukotrienes in airway inflammation, smooth muscle function, and remodeling. *J Allergy Clin Immunol* 111(1 Suppl): S18-34; discussion S34-6, 2003.
18. **Hollingsworth JW 2nd, Cook DN, Brass DM, Walker JK, Morgan DL, Foster WM, Schwartz DA.** The role of Toll-like receptor 4 in environmental airway injury in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 170: 126-132, 2004.
19. **Humbles AA, Lloyd CM, McMillan SJ, Friend DS, Xanthou G, McKenna EE, Ghiran S, Gerard NP, Yu C, Orkin SH, Gerard C.** A critical role for eosinophils in allergic airways remodeling. *Science* 305: 1776-1779, 2004.
20. **Ishi Y, Shirato M, Nomura A, Sakamoto T, Uchida Y, Ohtsuka M, Sagai M, Hasegawa S.** Cloning of rat eotaxin: ozone inhalation increases mRNA and protein expression in lungs of brown Norway rats. *Am J Physiol* 274(1 Pt 1): L171-6, 1998.
21. **Jain D, Keslacy S, Tliba O, Cao Y, Kierstein S, Amin K, Panettieri RA Jr, Haczku A, Amrani Y.** Essential role of IFN β and CD38 in TNF α -induced airway smooth muscle hyper-responsiveness. *Immunobiology* 213(6): 499-509, 2008.
22. **Ji M, Cohan, DS, Bell M.** Meta-analysis of the Association between Short-Term Exposure to Ambient Ozone and Respiratory Hospital Admissions. *Environ Res Lett* 6(2): 1-22, 2011.
23. **Kierstein S, Poulain FR, Cao Y, Grous M, Mathias R, Kierstein G, Beers MF, Salmon M, Panettieri RA Jr, Haczku A.** Susceptibility to ozone-induced airway inflammation is associated with decreased levels of surfactant protein D. *Respir Res* 7: 85, 2006.
24. **Kierstein S, Krytska K, Sharma S, Amrani Y, Salmon M, Panettieri RA Jr, Zangrilli J, Haczku A.** Ozone inhalation induces exacerbation of eosinophilic airway inflammation and hyperresponsiveness in allergen-sensitized mice. *Allergy* 63(4): 438-46, 2008.
25. **Kleis S, Louis R, Bartsch P.** Ozone exposure and asthma. *Rev Med Liege* 58(3): 132-8, 2003.

26. **Ko FW, Tam W, Wong TW, Lai CK, Wong GW, Leung TF, Ng SS, Hui DS.** Effects of air pollution on asthma hospitalization rates in different age groups in Hong Kong. *Clin Exp Allergy* 37(9): 1312-9, 2007.
27. **Koren HS, Devlin RB, Graham DE, Mann R, McGee MP, Horstman DH, Kozumbo WJ, Susanne Becker, House DE, McDonnell WF, Bromberg PA.** Ozone and induced inflammation in the lower airways of human subjects. *Am Rev Respir Dis* 139: 407-415, 1989.
28. **Lawrence T, Willoughby DA, Gilroy DW.** Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 2: 787-795, 2002.
29. **Lee JJ, Dimina D, Macias MP, Ochkur SI, McGarry MP, O'Neill KR, Protheroe C, Pero R, Nguyen T, Cormier SA, Lenkiewicz E, Colbert D, Rinaldi L, Ackerman SJ, Irvin CG, Lee NA.** Defining a link with asthma in mice congenitally deficient in eosinophils. *Science* 305: 1773-1776, 2004.
30. **Leikauf GD, Simpson LG, Santrock J, Zhao Q, Abbinante-Nissen J, Zhou S, Driscoll KE.** Airway epithelial cell responses to ozone injury. *Environ Health Perspect* 103 Suppl 2:91-5, 1995.
31. **Li N, Hao M, Phalen RF, Hinds WC, Nel AE.** Particulate air pollutants and asthma. A paradigm for the role of oxidative stress in PM-induced adverse health effects. *Clin Immunol* 109: 250-265, 2003.
32. **Lin S, Liu X, Le LH, Hwang SA.** Chronic exposure to ambient ozone and asthma hospital admissions among children. *Environ Health Perspect* 116(12): 1725-30, 2008.
33. **Moore K, Neugebauer R, Lurmann F, Hall J, Brajer V, Alcorn S, Tager I.** Ambient ozone concentrations cause increased hospitalizations for asthma in children: an 18-year study in Southern California. *Environ Health Perspect* 116(8):1063-70, 2008.
34. **Ostro BD, Tran H, Levy JI.** The health benefits of reduced tropospheric ozone in California. *J Air Waste Manag Assoc.* 56(7): 1007-21, 2006.
35. **Persson CG, Uller L.** Resolution of cell-mediated airways diseases. *Respir Res* 11;11: 75, 2010.
36. **Rivera-Sanchez YM, Johnston RA, Schwartzman IN, Valone J, Silverman ES, Fredberg JJ, Shore SA.** Differential effects of ozone on airway and tissue mechanics in obese mice. *J Appl Physiol* 96: 2200-2206, 2004.
37. **Scannell C, Chen L, Aris RM, Tager I, Christian D, Ferrando R, Welch B, Kelly T, Balmes JR.** Greater ozone-induced inflammatory responses in subjects with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 154(1): 24-9, 1996.
38. **Scarino A, Charbonneau M, Tardif R.** Influence of ALDH2 polymorphism on ethanol kinetics and pulmonary effects in males and female rats exposed to ethanol vapors. *Inhal Toxicol* 21(3): 193-9, 2009.

39. **Scarino A, Noël A, Renzi PM, Cloutier Y, Vincent R, Truchon G, Tardif R, Charbonneau M.** Impact of emerging pollutants on pulmonary inflammation in asthmatic rats: ethanol vapors and agglomerated TiO₂ nanoparticles. *Inhal Toxicol* 24(8): 528-538, 2012.
40. **Schwartz J:** Short term fluctuations in air pollution and hospital admissions of the elderly for respiratory disease. *Thorax* 50: 531-538, 1995.
41. **Stieb DM, Burnett RT, Beveridge RC, Brook JR.** Association between ozone and asthma emergency department visits in Saint John, New Brunswick, Canada. *Environ Health Perspect* 104: 1354-1360, 1996.
42. **Tliba O, Deshpande D, Chen H, Van Besien C, Kannan M, Panettieri RA Jr, Amrani Y.** IL-13 enhances agonist-evoked calcium signals and contractile responses in airway smooth muscle. *Br J Pharmacol* 140(7): 1159-62.
43. **Ueki S, Kato H, Kobayashi Y, Ito W, Adachi T, Nagase H, Ohta K, Kayaba H, Chihara J.** Anti- and proinflammatory effects of 15-deoxy-delta-prostaglandin J₂(15d-PGJ₂) on human eosinophil functions. *Int Arch Allergy Immunol* 143 Suppl 1:15-22, 2007.
44. **US EPA.** National Ambient Air Quality Standards (NAAQS) [online], 2008. Available at: <http://www.epa.gov/air/criteria.html>
Accessed on 27 August 2012.
45. **Wagner JG, Jiang Q, Harkema JR, Illek B, Patel DD, Ames BN, Peden DB.** Ozone enhancement of lower airway allergic inflammation is prevented by gamma-tocopherol. *Free Radic Biol Med* 15;43(8) :1176-88, 2007.
46. **WHO.** Asthma [online]. Fact sheet N°307. 2008. Available at <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs307/en/index.html>
Accessed on 27 August 2012.
47. **Yost BL, Gleich GJ, Jacoby DB, Fryer AD.** The changing role of eosinophils in long-term hyperreactivity following a single ozone exposure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289: L627-L635, 2005.
48. **Hu PC, Miller FJ, Daniels MJ, Hatch GE, Graham JA, Gardner DE, Selgrade MK.** Protein accumulation in lung lavage fluid following ozone exposure. *Environ Res* 29: 377-388, 1982.
49. **Guth DJ, Warren DL, Last JA.** Comparative sensitivity measurements of lung damage made by bronchoalveolar lavage after short-term exposure of rats to ozone. *Toxicology* 40: 131-143, 1986.
50. **Mullin LS, Krivanek ND.** Comparison of unconditioned reflex and conditioned avoidance tests in rats exposed by inhalation to carbon monoxide, 1,1,1-trichloroethane, toluene or ethanol. *Neurotoxicology* 3: 126-37, 1982.
51. **Last JA, Ward R, Temple L, Kenyon NJ.** Ovalbumin-induced airway inflammation and fibrosis in mice also exposed to ozone. *Inhal Toxicol* 16(1): 33-43, 2004.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Schematic representation of the ozone exposure, alone or with ethanol, protocols used in this study in OVA-sensitized and challenged rats.

Figure 2. Effect of ozone exposure, alone or with ethanol, on inflammatory cells present in BAL fluid of allergen-challenged rats according to protocol #1. Control rats were not challenged with OVA nor exposed to ozone. (mean $\pm$ SEM, n = 8). * indicates significantly different from the paired control group; $\blacktriangle$: p<0.05 indicates a significant difference compared to both OVA and OVA/ozone groups.

Figure 3. Methacholine (MCh)-induced tracheal ring contractility following exposures in allergen-challenged rats according to protocol #1 (A) and protocol #4 (B). Mean $\pm$ SEM (n = 4) of contractile tension is expressed in grams (g).

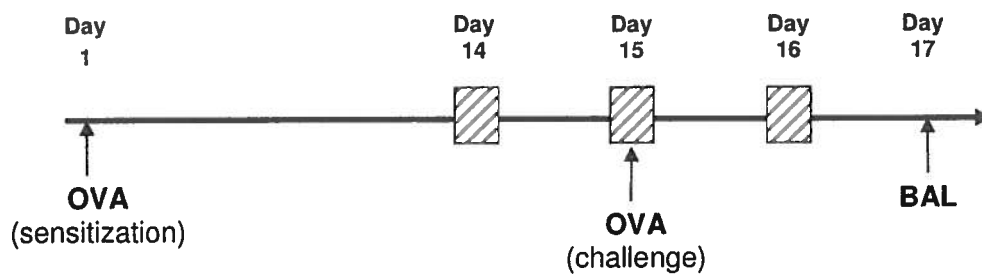
Figure 4. Effect of ozone exposure on inflammatory cells present in BAL fluid of allergen-challenged or non-allergen-challenged rats in protocol #2 (mean $\pm$ SEM, n = 8). *: p<0.05 indicates significantly different from the paired control group; $\blacktriangle$: p<0.05 indicates a significant difference between OVA and OVA/ozone groups.

Figure 5. Effect of ozone exposure, alone or with ethanol, on inflammatory cells present in BAL fluid of allergen-challenged or non-allergen-challenged rats according to protocol #3 (mean $\pm$ SEM, n = 8). *: p<0.05 indicates significantly different from the paired control group; $\blacktriangle$: p<0.05 indicates a significant difference between OVA and OVA/ozone or OVA/ozone/ethanol groups; $\blacksquare$: p<0.05 indicates a significant difference between OVA/ozone and OVA/ozone/ethanol groups.

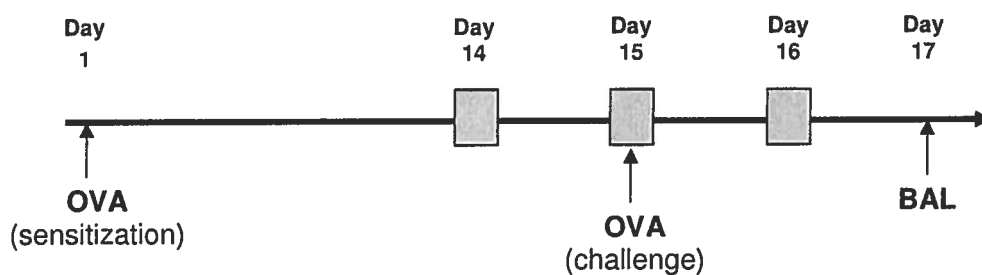
Figure 6. Photomicrographs (5 μ m slices, H&E staining, 100x)) of rat lungs for controls (left), OVA challenge alone (middle) and the OVA challenge/ozone (right) for rats exposed according to protocol #3 (100X).

Figure 7. Effect of ozone exposure on inflammatory cells present in BAL fluid of allergen challenge or non-allergen-challenged rats in protocol #4 (mean $\pm$ SEM, n = 8). *: $p < 0.05$ indicates significantly different from the paired control group; $\blacktriangle$: $p < 0.05$ indicates a significant difference between OVA and OVA/ozone groups.

Figure 8. Effect of ozone exposure, alone or with ethanol, on the plasma MCP-1 level (mean $\pm$ SEM) in protocol #3. *: $p < 0.05$ indicates significantly different from the control group; $\blacktriangle$: $p < 0.05$ indicates a significant difference between OVA and OVA/ozone groups.

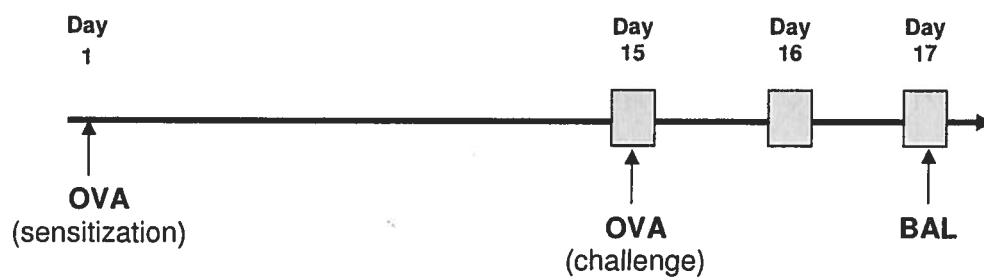
Protocol #1:

 = Exposure to 0.4 ppm ozone, alone or with 3000 ppm ethanol, 4 h/d

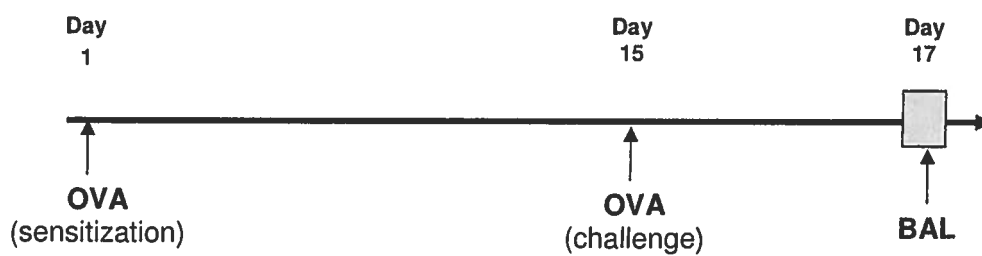
Protocol #2:

 = Exposure to 1 ppm ozone 4 h/d

Figure 1

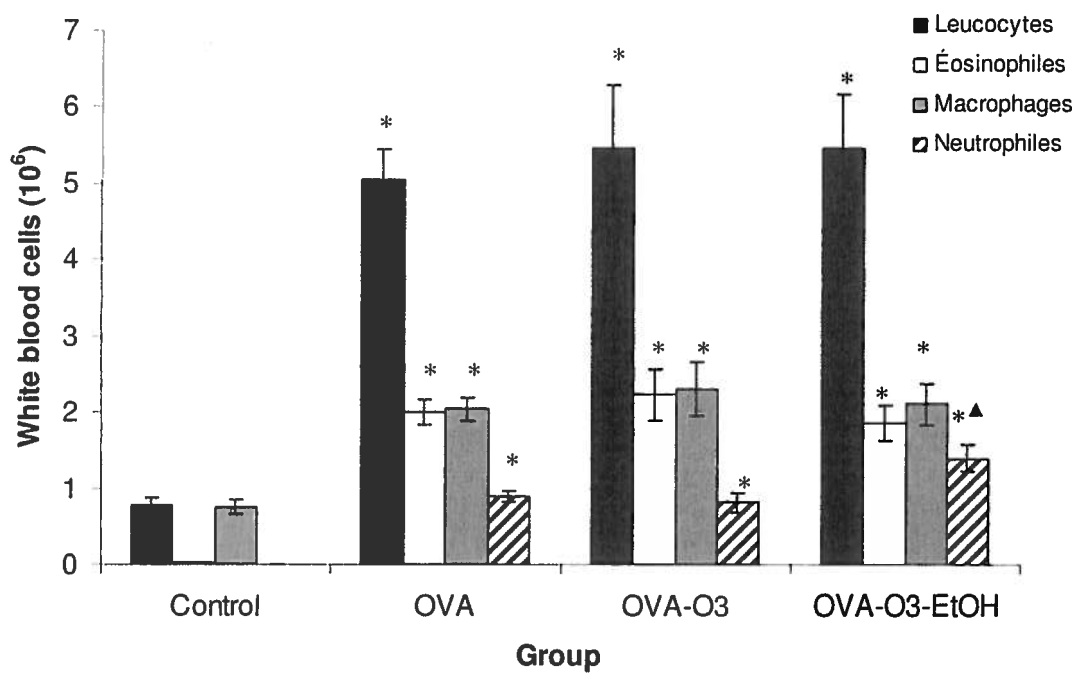
Protocol #3:

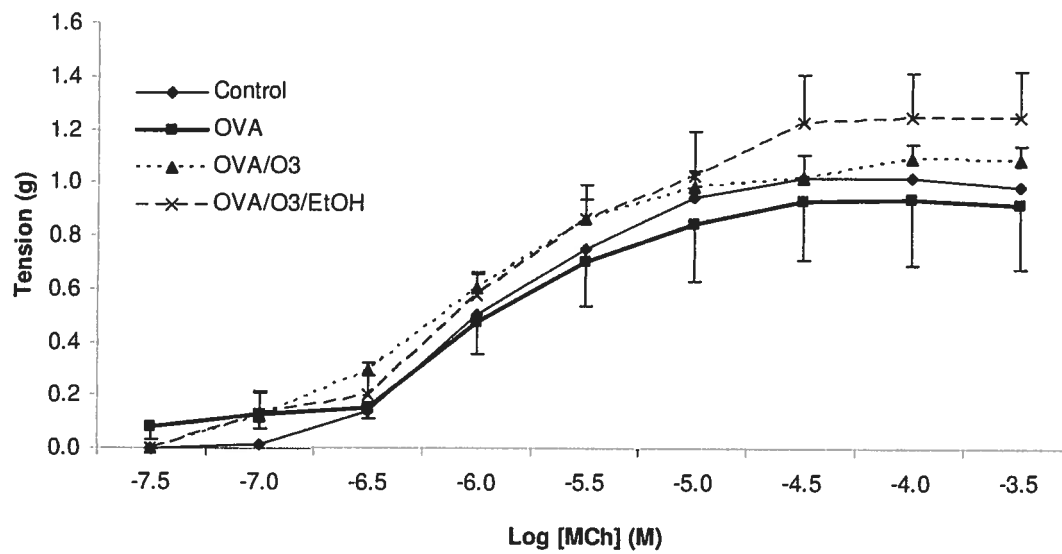
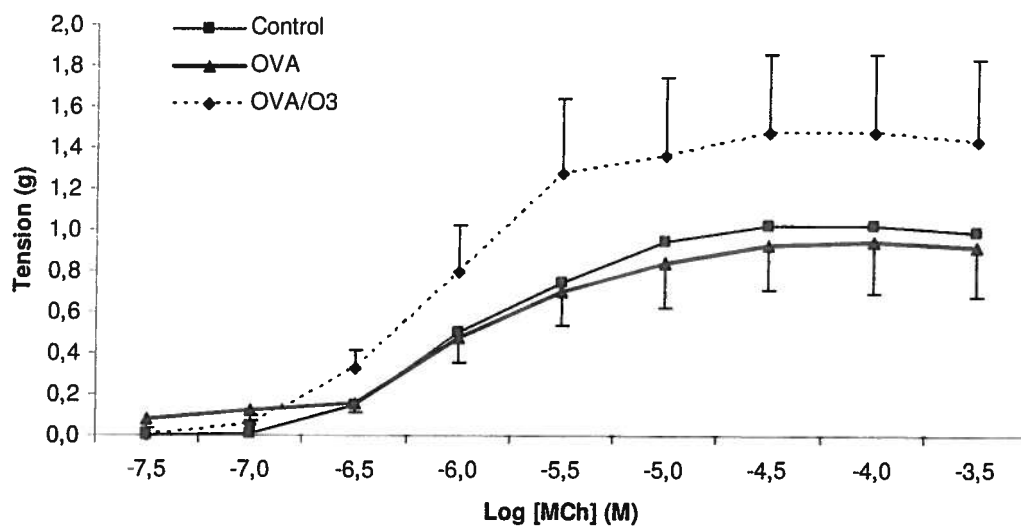
 = Exposure to 1 ppm ozone, alone or with 3000 ppm ethanol, 4 h/d

Protocol #4:

 = Exposure to 1 ppm ozone for 4 h

Figure 1

**Figure 2**

A**B****Figure 3**

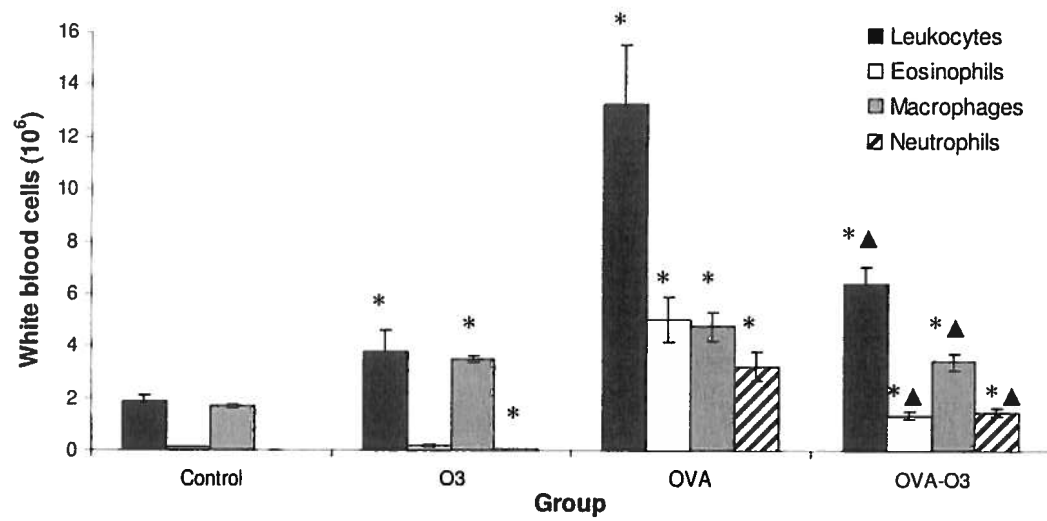
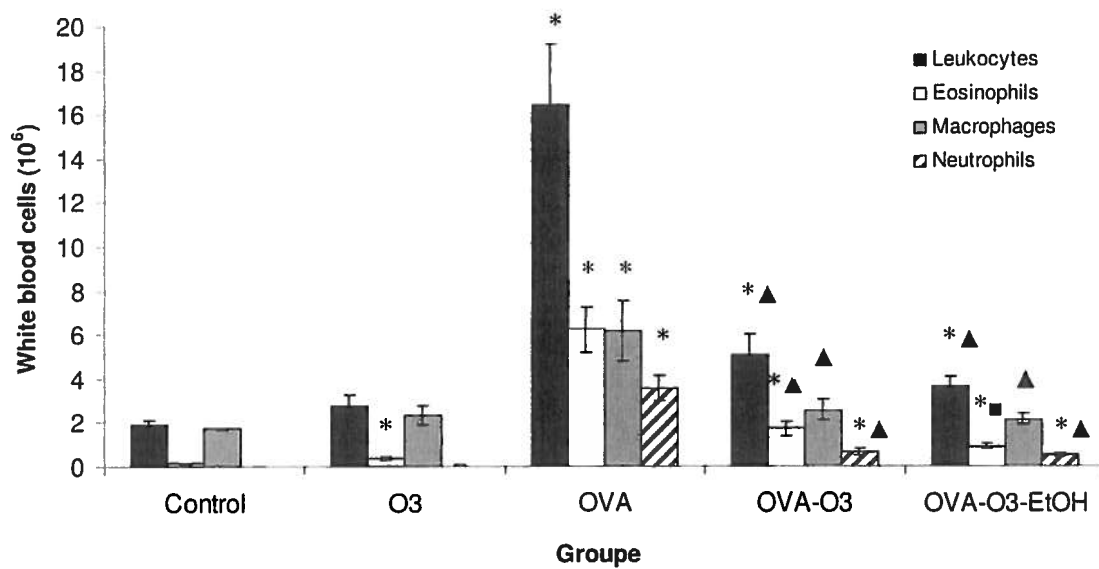


Figure 4

**Figure 5**

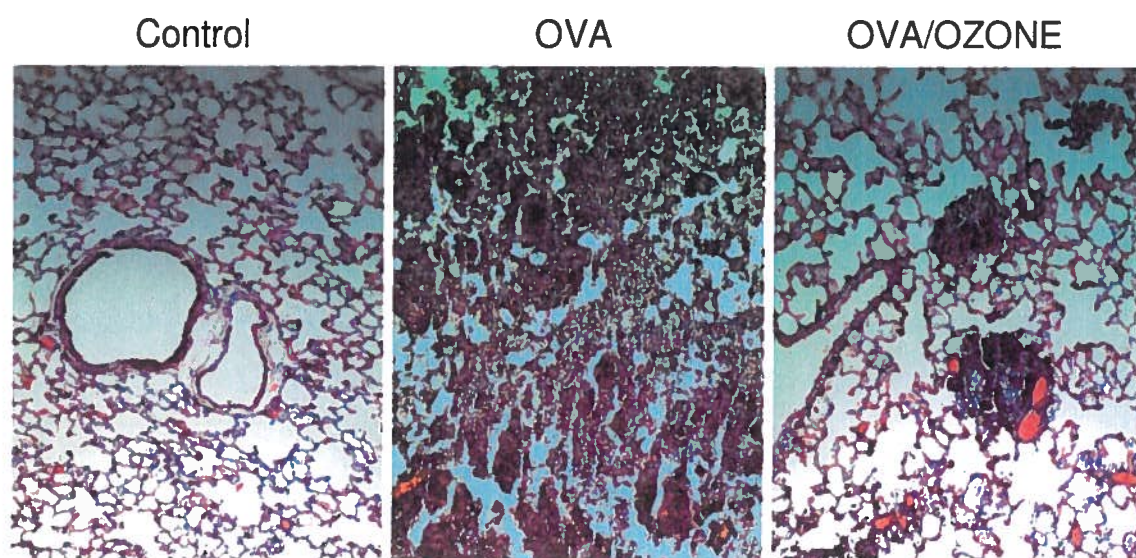
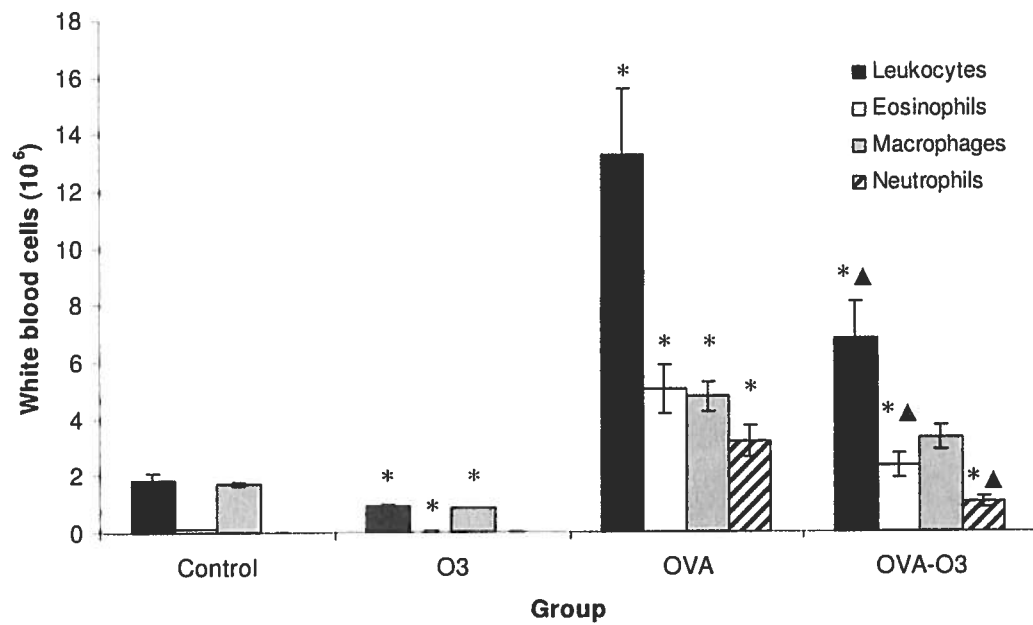


Figure 6

**Figure 7**

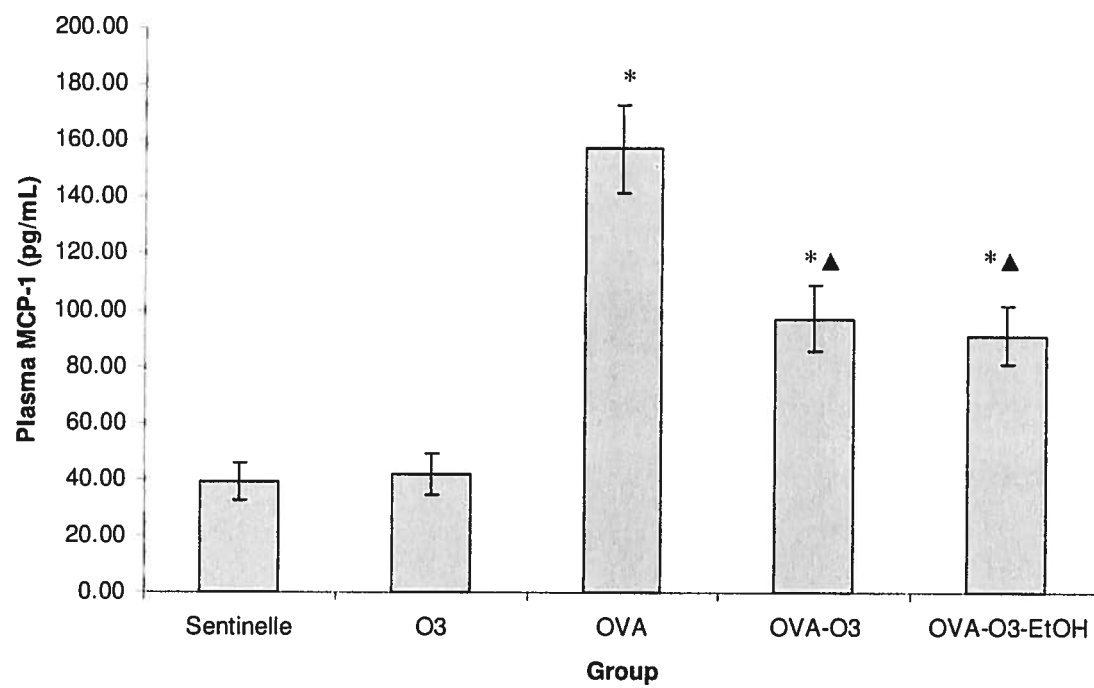
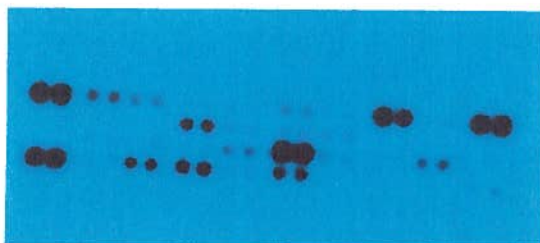


Figure 8

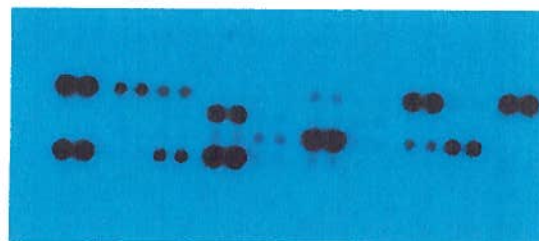
ANNEXE

Rat Cytokine Array Panel A membranes obtained from the BAL cytokine analyses in protocol 3. The membrane allows for duplicate measures of each cytokine. The BAL levels for every cytokine were determined by calculating a mean intensity between duplicate results. Given that many factors, other than cytokine concentration, can influence the intensity of the spots, we used the positive controls from each membrane (which should all be of same intensity) to adjust the intensities in order to have a common denominator that would allow us to compare results among all four membranes.

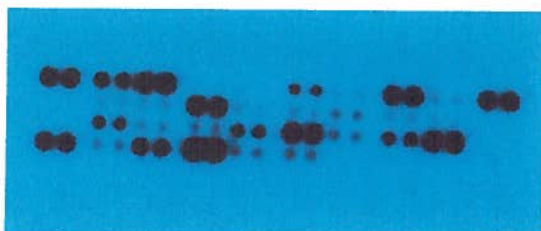
OZONE



OVA/OZONE



OVA



OVA/OZONE/EtOH



TROISIÈME PARTIE

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Nos travaux antérieurs (Scarino et al., 2009) ont montré que l'inhalation d'éthanol n'induit pas de toxicité pulmonaire chez les rats présentant une déficience métabolique les rendant incapables de métaboliser l'acétaldéhyde, un métabolite direct de l'éthanol. Quoiqu'une grande partie de la population est affectée par cette déficience enzymatique (environ 50% des Asiatiques), il ne s'agit pas des seuls individus qui auraient pu être potentiellement à risque d'être affectés par une augmentation de la concentration de vapeurs d'éthanol dans l'air ambiant. En effet, les personnes souffrant d'un désordre pulmonaire, tel l'asthme allergique, sont aussi à risque de subir une exacerbation de leurs symptômes à la suite de l'inhalation d'éthanol ou d'autres contaminants présents dans l'air. L'objectif principal de ce projet de recherche était donc d'étudier les effets de l'inhalation de divers contaminants atmosphériques, c'est-à-dire l'éthanol, l'ozone et les nano-TiO₂ sur l'inflammation pulmonaire induite par une provocation allergénique chez les rats Brown Norway asthmatiques.

Les résultats des expériences effectuées dans le cadre de cette thèse de recherche ont montré que l'inhalation d'éthanol n'induit pas une augmentation de l'inflammation pulmonaire chez les asthmatiques, mais étonnamment l'inhalation d'ozone et de nano-TiO₂ entraîne une diminution de cette inflammation. Dans la présente partie de la thèse, nous reviendrons sur les données en y apportant un complément d'analyse, en plus de discuter de mécanismes potentiels pouvant expliquer les résultats.

Mise au point du modèle d'asthme allergique

L'ovalbumine, une protéine retrouvée dans le blanc d'œuf, fut utilisée comme allergène pour induire l'asthme chez le rat. Cette protéine est largement utilisée dans ce type d'étude en raison d'une bonne réponse de l'animal, notamment chez le rat Brown Norway. Dans le but de vérifier si les contaminants étudiés peuvent moduler, à la hausse ou à la baisse, la réaction asthmatique inflammatoire induite par inhalation d'un allergène, il était important de s'assurer que la provocation asthmatique sans les contaminants ne se traduise pas par une réponse inflammatoire maximale ou, à l'opposé, trop faible. Il est bon de rappeler, à travers un graphique hypothétique présenté à la figure 1, qu'il fut important de mesurer l'effet de différentes concentrations d'allergène pour établir la relation dose-effet et ainsi faciliter le choix de la concentration pour obtenir la réaction inflammatoire prévue, c'est-à-dire environ 30% de la réponse maximale.

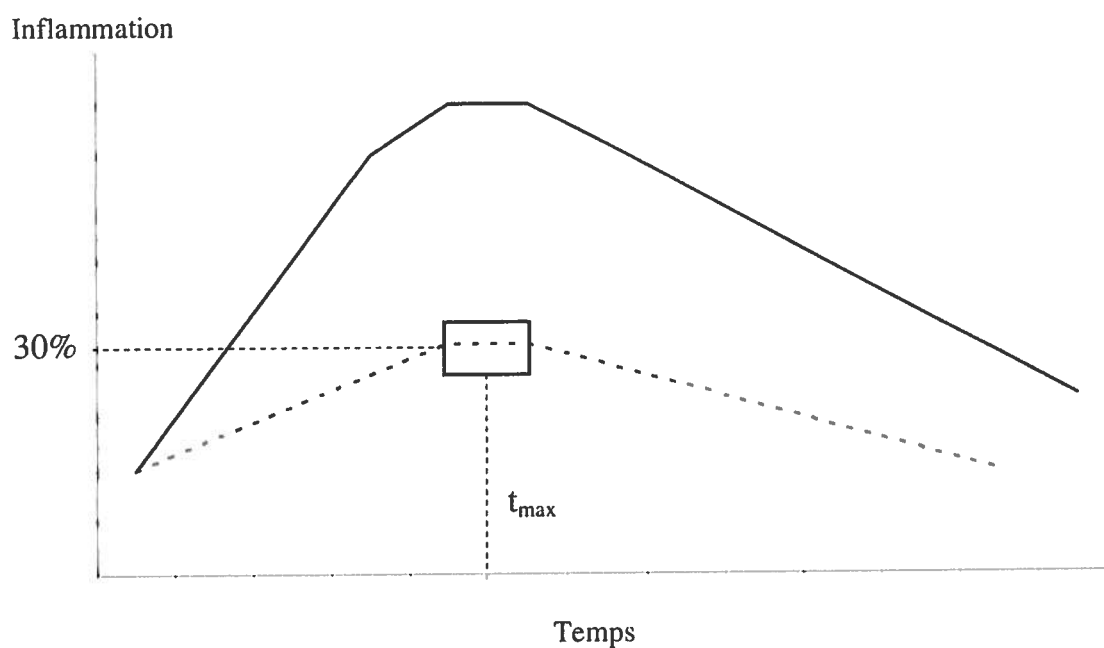


Figure 1: Cinétique inflammatoire pulmonaire de la réaction asthmatique en fonction du temps. La courbe en noir représente la cinétique inflammatoire maximale hypothétique, tandis que la courbe en pointillé bleu représente la cinétique inflammatoire, aussi hypothétique, d'une réponse atténuée de la réaction asthmatique qui était visée lors de la mise au point du modèle animal utilisé dans cette thèse. Le rectangle représente la concentration ciblée pour cette mise au point.

Les résultats ont montré qu'une concentration d'ovalbumine de 1,5% inhalée pendant 15 minutes lors de la provocation se traduisait par une inflammation pulmonaire de 39% du Cmax, obtenue à 5% d'ovalbumine. Cette concentration a donc été retenue pour la suite du projet.

La réaction asthmatique est caractérisée par une augmentation des cellules inflammatoires, dont principalement les éosinophiles, ainsi que de leurs médiateurs mesurables dans les BAL. Il était donc primordial d'effectuer des prélèvements pour le dénombrement des éosinophiles à plusieurs temps suivant la provocation allergénique afin de déterminer i) la phase de développement, ii) le temps de la réponse maximale et iii) la phase de récupération de la réponse pulmonaire inflammatoire. Cette cinétique nous a permis non seulement de déterminer le temps idéal pour effectuer les BAL, mais elle a aussi permis d'identifier la base pour déterminer si des expositions aux contaminants affectent l'influx d'éosinophiles pulmonaires. Cette phase de mise au point systématique fut une approche novatrice quant à l'utilisation de ce modèle pour étudier l'effet de contaminants atmosphériques.

Les observations pour les vapeurs d'éthanol

La comparaison des effets pulmonaires et systémiques de l'inhalation d'éthanol entre les rats Sprague Dawley et les Brown Norway sains fut la première étape importante de cette étude dans le but d'assurer une continuité avec notre étude antérieure, qui avait porté sur les effets de l'éthanol chez le rat Sprague Dawley normal ou déficient en ALDH2 (Scarino et al., 2009). À l'instar de nos observations antérieures, les résultats des BAL et des coupes histologiques chez les rats Brown Norway ont montré une absence de toxicité pulmonaire suivant l'inhalation d'éthanol. Nous avons aussi vérifié si la cinétique sanguine de l'éthanol chez les rats Brown Norway était comparable à celle observée chez les rats Sprague Dawley, et ce autant chez les mâles que chez les femelles, pour avoir une certitude supplémentaire qu'un changement de souche de rat ne se traduise pas par un changement dans la réponse systémique et métabolique de l'éthanol inhalé. Les résultats ont montré que les deux souches ont des profils similaires de cinétique sanguine d'éthanol suivant une exposition à 3000 ppm, les réponses étant plus homogènes pour les mâles entre eux que pour les femelles. Par conséquent, nous avons conclu que l'utilisation des rats BN était appropriée pour cette étude et nous avons retenu les mâles non seulement pour les similarités démontrées entre les

souches, mais aussi pour s'orienter avec la plupart des études combinant asthme allergique et polluants atmosphériques (Wagner et al., 2007; Morishita et al., 2004).

Quoique notre étude ne portait pas sur la réponse asthmatique causée par une exposition à l'alcool, l'absence de toxicité pulmonaire montrée par nos résultats concorde avec ce qui a été suggéré dans la littérature sur l'asthme induit par l'alcool, à savoir que l'éthanol n'est pas la substance propre causant la réponse pulmonaire. En effet, les premiers indices de cette théorie ont été observés il y a plusieurs années à travers des études ~~qui ont montré que~~ l'éthanol réduit les contractions bronchiques induites par un antigène (Fleisch et al., 1976) et inhibe la sécrétion d'histamine (Mongar & Schild, 1957). Récemment, des études chez l'humain ont montré que l'inhalation d'éthanol était associée avec une diminution de la réactivité bronchique (Myou et al., 1993; Myou et al., 1996). En effet, la toxicité pulmonaire de l'éthanol a plutôt été associée à son métabolite, l'acétaldéhyde, lors d'une étude montrant une diminution du VEMS chez les sujets souffrant d'une déficience métabolique les rendant incapables de métaboliser l'acétaldéhyde et que cette diminution était associée à une augmentation de la concentration sanguine d'acétaldéhyde (Takao et al., 1998).

Les observations pour l'inhalation d'ozone

Considérant que l'inhalation d'ozone seul est associée à une augmentation de l'inflammation pulmonaire (Bouthillier et al., 1998; Kierstein et al., 2008), notre hypothèse de départ était que l'inhalation d'ozone allait aggraver la réaction inflammatoire pulmonaire chez les asthmatiques. Les baisses de leucocytes obtenus lors des expositions à 1 ppm d'ozone étaient donc très surprenantes et c'est pourquoi nous avons décidé d'aller plus en profondeur dans l'analyse de ces groupes. Les résultats des coupes histologiques appuient les résultats obtenus pour les BAL en démontrant que les groupes ayant le plus de cellules inflammatoires dans les BAL sont aussi ceux qui montraient les signes d'inflammation pulmonaires les plus importants. Nous nous sommes ensuite tournés vers l'analyse des cytokines, en débutant par celles présentes dans le surnageant des BAL. Quoique qualitative, l'analyse de 29 cytokines a montré que l'inhalation d'ozone chez les rats asthmatiques réduit plusieurs médiateurs reliés au recrutement de leucocytes, tels CINC-1, fractalkine (CXCL1), MIP-3 α (CCL20) et RANTES (CCL5), ainsi que d'autres impliqués dans le maintien de l'inflammation, tels TNF- α , IL-1 α (IL-1F1) et IL-13. De plus, un dosage des cytokines plasmatiques jouant un rôle important dans la réponse inflammatoire asthmatique ont révélé une diminution significative

du MCP-1 chez les animaux asthmatiques suite à l'inhalation d'ozone. Dans l'ensemble ces résultats appuient de façon cohérente le fait que l'ozone peut réduire une réponse inflammatoire induite par un allergène. Les mécanismes précis responsables de cet effet demeurent cependant inconnus. Ainsi, nous ne savons pas pourquoi l'ozone, qui est généralement reconnu comme pro-inflammatoire, peut engendrer de telles baisses des niveaux de cytokines. On peut cependant spéculer que, par exemple, de par ses capacités de peroxydation des membranes, l'ozone pourrait causer une lyse des cellules inflammatoires appelées par la provocation de l'allergène.

Les résultats d'hyperréactivité bronchique ayant montré une tendance à la hausse de la contractilité trachéale chez les rats asthmatiques exposés à l'ozone lorsque comparés aux rats asthmatiques exposés à l'air, un rôle possible de molécules autres que les cytokines est aussi proposé. En effet, plusieurs études ont montré la capacité des cytokines à augmenter la sensibilité des muscles lisses, ce qui se traduirait par une augmentation de la contractilité trachéale (Amrani & Panettieri, 1998; Tliba et al., 2003; Guo et al., 2005). Les leucotriènes et prostaglandines, des médiateurs libérés par les mastocytes lors de la réaction asthmatique, sont reconnus pour leur rôle dans l'hyperréactivité bronchique en augmentant la contractilité des muscles lisses des voies respiratoires. Aussi, l'inhalation de 1 ppm d'ozone étant associée à une augmentation de prostaglandines (Dye et al., 1999), un effet additif de l'ovalbumine et de l'ozone pourrait justifier nos résultats de contractilité trachéale. Enfin, des études ont montré un potentiel anti-inflammatoire de certains médiateurs lipidiques, dont les prostaglandines, ce qui apporte une explication possible à la divergence observée entre nos résultats sur l'inflammation pulmonaire et ceux sur l'hyperréactivité bronchique (Hardy et al., 1984; Brightling et al., 2002; Holgate et al., 2003).

Il est très intéressant d'observer que les vapeurs d'éthanol, en concomitance avec 0,4 ppm d'ozone, ont augmenté le nombre de neutrophiles chez les asthmatiques lorsque comparés aux asthmatiques exposés uniquement à l'ozone, mais qu'une concentration identique d'éthanol (3000 ppm) en concomitance avec 1 ppm d'ozone a diminué le nombre d'éosinophiles chez ces mêmes groupes. Étant donné qu'il n'existe aucune autre étude ayant vérifié l'effet d'une exposition concomitante à ces deux contaminants chez les asthmatiques, il est difficile de proposer un mécanisme pouvant expliquer ces résultats. Vu les différences entre les protocoles d'exposition, c'est-à-dire au niveau de la concentration d'ozone utilisée et les

moments d'exposition, il est probable que ces deux facteurs aient joué un rôle dans la cinétique inflammatoire des neutrophiles et des éosinophiles.

Bien que la réaction asthmatique affecte principalement les poumons, le système cardiovasculaire pourrait aussi être affecté. En effet, les niveaux plasmatiques d'endothéline (ET-1), un puissant vasoconstricteur, sont augmentés dans la réaction asthmatique (Finsnes et al., 2000). Chalmers et al. (1997) ont d'ailleurs montré la capacité de ce peptide à induire une bronchoconstriction chez les sujets asthmatiques. De plus, plusieurs études ont montré que l'ET-1 est aussi augmentée suite à l'exposition à des contaminants atmosphériques, tels l'ozone (Bouthiller et al., 1998; Calderón-Garcidueñas et al., 2007) et les particules (Ulrich et al., 2002; Thomson et al., 2005). Nous avons donc jugé pertinent de mesurer les niveaux d'ET-1 plasmatique dans notre modèle animal d'asthme allergique exposé à divers contaminants. Étonnamment, les résultats n'ont révélé aucune différence significative entre les différents groupes à l'étude lors des expériences portant sur l'inhalation de nano-TiO₂ (article 1) ou d'ozone (annexe 1).

Les observations pour l'inhalation des nano-TiO₂

Quoique certains aient montré que l'inhalation de nano-TiO₂ augmente l'inflammation pulmonaire chez les rongeurs asthmatiques (Hussain et al., 2011; de Haar et al., 2006), d'autres ont montré des résultats similaires aux nôtres. En effet, Rossi et al. (2010) ont montré, dans un modèle de souris sensibilisé à l'ovalbumine, que l'inhalation de nano-TiO₂ diminue l'inflammation induite par la provocation allergénique. Dans le même ordre d'idées, Park et al. (2009) ont rapporté, chez la souris sensibilisée à l'ovalbumine, que l'inhalation de la forme rutile de nano-TiO₂ réduit l'inflammation et l'hyperréactivité bronchique causée par l'inhalation d'ovalbumine. À l'instar des observations obtenues avec l'ozone, les résultats des décomptes cellulaires obtenus à partir des BAL ont montré que l'inhalation de nano-TiO₂ chez les asthmatiques s'est traduite par une diminution de l'inflammation pulmonaire, supportée par des résultats cellulaires, moléculaires et histologiques. En plus de différencier les différents types de globules blancs, les analyses au microscope des lames préparées par cyto centrifugeuse nous ont aussi permis de confirmer la réussite de l'exposition aux nanoparticules en vérifiant un rôle connu des macrophages alvéolaires, c'est-à-dire la phagocytose des particules. En effet, lors du décompte cellulaire, nous avons observé

qu'environ 40% des macrophages contenaient des agglomérats de nano-TiO₂ dans leur cytoplasme et que le nombre d'agglomérats variait d'un macrophage à l'autre.

Grassian et al. (2007) ont montré que la voie d'exposition, c'est-à-dire inhalation vs. instillation, peut avoir un impact sur l'état d'agglomération des nano-TiO₂. En effet, Hussain et al., (2011) ont exposé les animaux à des suspensions de nano-TiO₂ de façon oropharyngée, tandis que l'inhalation d'aérosols de nano-TiO₂ a été utilisée par Rossi et al. (2010) et lors de nos expériences. Ces deux voies d'exposition ont fort probablement eu un impact sur la formation d'agglomérats de nano-TiO₂, en plus d'influencer la concentration exacte qui atteint les poumons. Par conséquent, la dose biologique effectrice de nanoparticules (concentration massique déposée et taille des nano-TiO₂ atteignant l'organe cible) était peut-être différente lors de ces études et pourrait être responsable, du moins en partie, pour les divergences observées entre les résultats. De plus, le moment des expositions peut aussi expliquer les différents résultats observés en augmentant l'inflammation lorsque les expositions aux nano-TiO₂ surviennent avant la provocation allergénique (de Haar et al. 2006; Larsen et al., 2010; Hussain et al., 2011) ou en la réduisant lorsque l'exposition survient après la provocation, comme le démontrent nos résultats.

Chez les animaux non asthmatiques, aucune différence significative du nombre de leucocytes n'a été observée entre le groupe exposé aux nano-TiO₂ et le groupe témoin, malgré une exposition de 15,7 mg/m³. Nonobstant la présence d'agglomérats de nano-TiO₂ dans les macrophages, aucun changement significatif du nombre de macrophages et de neutrophiles n'a été observé lorsque comparé aux animaux exposés à l'air. À l'opposé, une étude chez la souris a montré que l'inhalation aiguë de nano-TiO₂ à 7 mg/m³ (taille initiale: 5 nm, dans l'aérosol: 120 nm) pendant 4 heures a augmenté de façon significative le nombre de leucocytes totaux ainsi que le nombre de macrophages présents dans les BAL lorsque ces derniers étaient effectués immédiatement suivant la fin de l'exposition. Les auteurs n'ont observé aucune différence du nombre de neutrophiles (Grassian et al., 2007). De plus, d'autres ont montré que l'inhalation de nano-TiO₂ augmente l'inflammation pulmonaire chez les rongeurs sains et ce, même à des concentrations plus faibles que celles utilisées dans ce protocole (Bermudez et al., 2004; Ma-Hock et al., 2009). Par contre, une étude chez les rats Wistar exposés par inhalation à 10 mg/m³ de nano-TiO₂ (taille initiale: 25 nm, dans l'aérosol: 200 nm), 6 heures par jour pendant 5 jours consécutifs, a montré une augmentation significative seulement pour le nombre de neutrophiles lorsque les BAL étaient effectués

immédiatement suivant la dernière exposition (Ma-Hock et al., 2009). Ces études, ainsi que d'autres (Warheit et al., 2006; Warheit et al., 2007), mettent en évidence les résultats contradictoires en ce qui concerne la réponse inflammatoire pulmonaire chez les rongeurs exposés aux nano-TiO₂ par voie d'inhalation.

Les différents types de nano-TiO₂ utilisées, les protocoles d'expositions, les différents types et souches de rongeurs utilisés, le moment des sacrifices et les détails de la caractérisation des particules (souvent incomplète) peuvent tous être des facteurs reliés à la divergence des résultats observés par divers groupes de recherche. Par exemple, la forme anatase de nano-TiO₂, utilisée dans notre projet de recherche, est reconnue comme étant plus toxique que la forme rutile (Kakinoki et al., 2004); l'état d'agglomération, qui détermine la grosseur de la particule qui entre en contact avec le poumon, peut influencer la toxicité d'une même molécule étant donné que les particules ayant un diamètre plus petit présentent une toxicité plus élevée (Oberdörster et al., 1992; Renwick et al., 2004); l'inflammation pulmonaire est aussi dépendante de la durée et de la concentration d'exposition (Warheit et al., 1997); comme le témoigne la figure 3 du premier article de cette thèse, le moment des sacrifices suivant la provocation allergénique détermine le stade de la réaction asthmatique et peut donc influencer l'intensité d'un effet observé. Donc, l'harmonisation des protocoles de recherche en nanotoxicologie est cruciale dans la détermination d'effets potentiels reliés à l'inhalation de nano-TiO₂.

Les mécanismes possibles de la réduction de l'inflammation par les polluants atmosphériques chez le rat asthmatique

Dans une revue de littérature publiée en 2010, un groupe de chercheurs suédois (Persson & Uller, 2010) ont proposé une hypothèse qui pourrait offrir une explication mécanistique à la diminution de l'inflammation allergique causée par l'inhalation de nano-TiO₂ ou d'ozone. Ils ont suggéré que les cellules présentes dans les BAL ne représentaient pas la réalité de l'état pulmonaire, c'est-à-dire que les lavages captaient seulement les cellules qui migraient vers la lumière des voies respiratoires, car elles ne jouaient plus de rôle dans l'inflammation, et que les « vraies » cellules effectrices de la réponse allergique se trouvaient toujours au niveau interstitiel dans les poumons. Nous avons donc effectué des coupes histologiques des poumons dans le but de vérifier cette possibilité en déterminant si les cellules recueillies dans les BAL représentaient bel et bien ce qui se passait dans les poumons, autrement dit la baisse

observée est-elle artéfactuelle ou non ? Effectivement, Les résultats obtenus ont montré que, autant au niveau des coupes histologiques que des BAL, la diminution est d'une intensité comparable, ce qui nous a permis d'une part de valider les conclusions tirées à partir des BAL, mais plus important de rejeter l'application de l'hypothèse de Persson & Uller comme mécanisme des baisses observées.

Les résultats des médiateurs de l'inflammation permettent de spéculer un rôle possible des macrophages dans cette atténuation de l'inflammation. En effet, l'ozone a montré une diminution de MCP-1 (CCL2), une chimiokine puissante qui attire les monocytes vers le site d'inflammation. Une diminution de MCP-1 pourrait donc être à l'origine de la diminution du nombre de macrophages dans les poumons suivant l'exposition aux contaminants. Cette chimiokine étant produite, entre autres, par les macrophages, une diminution de ces derniers se traduirait par une diminution potentielle de MCP-1 et ainsi créer une cascade d'entraînement (de Boer et al., 2000; Traves et al., 2002). Deux autres chimiokines importantes produites par les macrophages ont été diminuées suite à l'exposition aux contaminants, soit la MIP-1 α et la MIP-3 α . Ces médiateurs jouent un rôle important dans l'activation des granulocytes. En effet, une diminution de l'activité du MIP-3 α a été associée à une diminution du nombre d'éosinophiles (Lukacs et al., 2001). Les éosinophiles étant parmi les cellules clés de l'augmentation de l'inflammation de la réaction asthmatique, comme mentionné à la première section, une diminution de MIP-3 α résultant possiblement d'une diminution de macrophages présents dans les poumons suivant les expositions pourrait expliquer la réduction d'éosinophiles observés. Ces trois médiateurs importants des macrophages font partie de la famille CC des chimiokines, qui sont reconnues pour leur implication dans la migration de cellules clés chez les asthmatiques, tels les lymphocytes, les basophiles, les monocytes et les éosinophiles (Matsui et al., 2001). Les macrophages alvéolaires étant des leucocytes présents en grand nombre dans les poumons, un effet supprimeur sur ces derniers pourrait avoir un effet inhibiteur sur la réponse inflammatoire générale à travers une diminution de la sécrétion de chimiokines de la famille CC. Les résultats des expositions à l'ozone chez les rats asthmatiques ont aussi montré une réduction importante de l'IL-13, une cytokine produite entre autres par les macrophages, dans les BAL. L'IL-13 étant impliquée dans la production d'éotaxine au niveau des cellules épithéliales (Matsukura et al., 2001), il est possible qu'une réduction du nombre de macrophages s'est traduite par une réduction d'IL-13, affectant ainsi la production d'éotaxine de la part des cellules épithéliales et donc, réduisant la migration des éosinophiles. Les macrophages étant

aussi une source importante de $\text{TNF-}\alpha$, une réduction du nombre de macrophages pourrait aussi affecter la migration des neutrophiles et, par conséquent, se traduire par une réduction du nombre de neutrophiles dans les poumons. La figure 2 représente un schéma de la possibilité d'une atténuation de l'inflammation à travers une diminution du nombre de macrophages.

L'effet atténuant de l'ozone et des nano- TiO_2 chez les rats asthmatiques pourrait aussi impliquer les « Toll-like receptors », des récepteurs présents sur les leucocytes, dont le rôle est de reconnaître des organismes externes, tels les virus et les bactéries, et induire une réponse immunitaire à la fois innée et adaptative. Une particularité de l'activation de ces récepteurs est que la réponse adaptative générée est de type Th1. Des agonistes de ces récepteurs ont été étudiés comme traitements potentiels pour l'asthme, une maladie à prédominance de type Th2, pour leur capacité à induire un changement de réponse vers une réponse de type Th1 et ainsi réduire la réponse pulmonaire en présence de l'allergène (Kline & Krieg, 2008). Il est donc possible que l'ozone ou les nano- TiO_2 aient modulé l'activité de ces récepteurs pour réduire la réaction asthmatique en favorisant une réponse Th1.

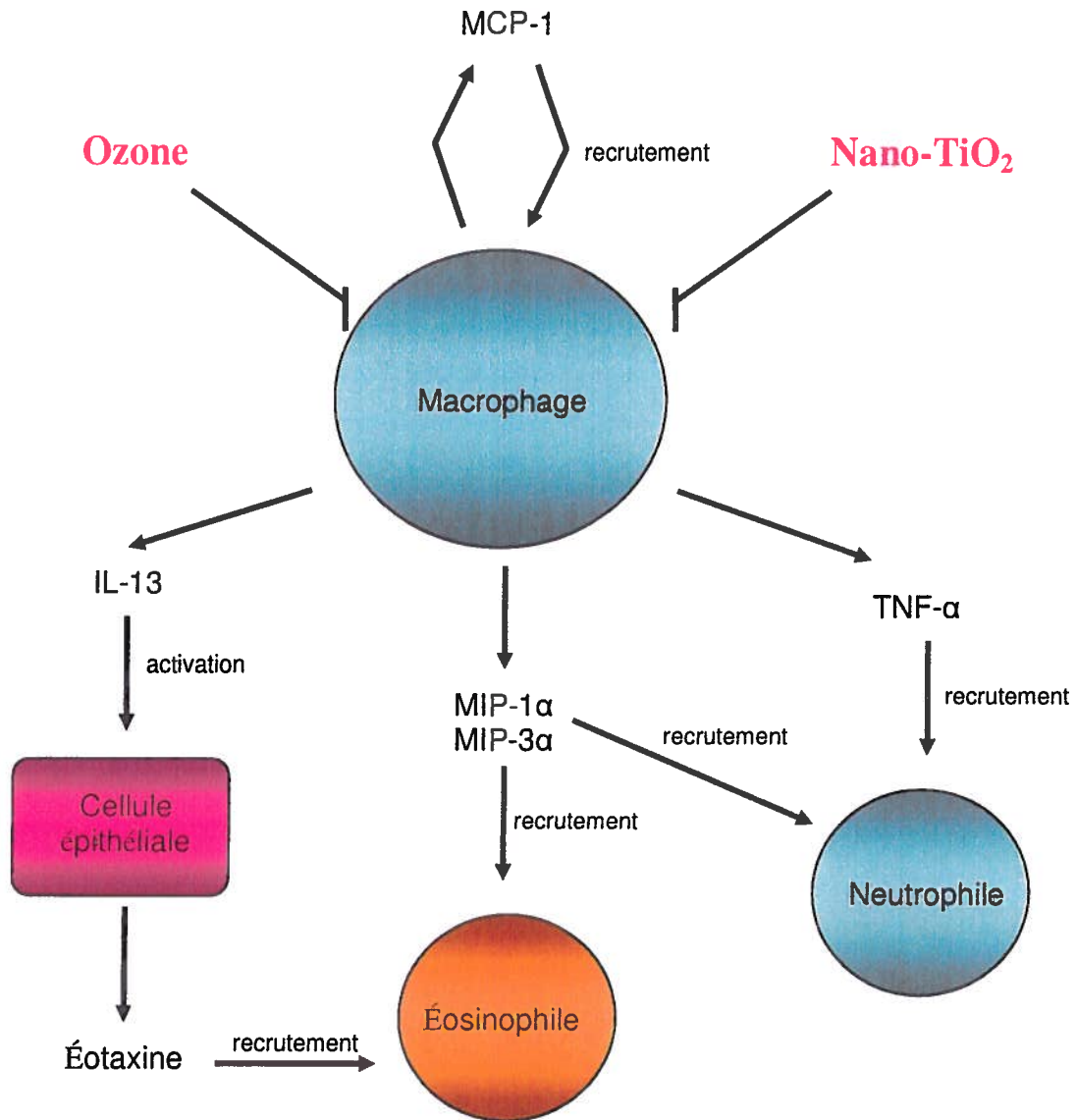


Figure 2: Représentation schématique d'une atténuation de l'inflammation pulmonaire asthmatique à travers une diminution du nombre de macrophages causée par l'exposition à l'ozone ou aux nano-TiO₂.

Conclusion générale

Les travaux ont permis de conclure que l'inhalation de 3000 ppm d'éthanol ne module ni le développement, ni la réponse maximale et ni la récupération de la réponse inflammatoire pulmonaire chez le rat Brown Norway. Les résultats ont cependant démontré, de façon inattendue et sans équivoque, que l'inhalation d'ozone dans ce modèle cause une réduction importante de l'inflammation pulmonaire maximale. De plus, l'ajout d'éthanol à l'ozone dans ces conditions accentue cette diminution. Par ailleurs, l'inhalation de nanoparticules de dioxyde de titane engendre un effet identique de baisse de l'inflammation pulmonaire chez les rats asthmatiques. Les effets réducteurs observés pour deux contaminants augmentent la confiance dans ces observations. Les mécanismes de toxicité cellulaire de l'ozone et des nano-TiO₂ étant similaires, c'est-à-dire qu'ils induisent une oxydation membranaire menant à la sécrétion de plusieurs médiateurs de l'inflammation, un lien pourrait exister entre la diminution de l'inflammation pulmonaire et le stress oxydatif associé à ces deux substances.

Globalement, les résultats permettent d'affirmer qu'aucun des trois contaminants de l'air étudié, soit l'éthanol, l'ozone et les nano-TiO₂, n'augmente le risque toxique aigu chez les sujets asthmatiques, ce qui constitue la question clé pour l'évaluation sanitaire des risques étudiée dans cette thèse.

Retombées et recommandations

Les résultats obtenus indiquent clairement que les vapeurs d'éthanol ne modifient pas l'inflammation pulmonaire résultant d'une condition asthmatique, ce qui pourra permettre aux autorités réglementaires d'assurer à la population que les hausses anticipées d'éthanol atmosphérique en milieu urbain en raison d'une essence à moteur additionnée d'éthanol seront sécuritaires. Une retombée indirecte importante touche les autres sources d'exposition à l'éthanol, notamment les solutions hydroalcooliques, les expositions professionnelles (production de vin et alcools) et l'exposition domestique (produits de nettoyage, etc.) du grand public à l'éthanol. Ainsi, ici aussi les résultats pourront permettre aux autorités réglementaires d'assurer à la population que ces expositions sont sécuritaires. Ce projet a évalué les effets de l'éthanol. Pour compléter l'analyse des risques, il serait important d'étudier les effets des contaminants urbains que sont les produits de combustion de l'éthanol,

tel l'acétaldéhyde, chez des sujets asthmatiques. Il faut noter que certains défis techniques liés à l'exposition sont inhérents à ces études chez l'animal.

Finalement, l'inhalation d'ozone ou de nano-TiO₂, des contaminants de l'air largement reconnus pour leur toxicité pulmonaire, a montré des effets supprimeurs de l'inflammation pulmonaire induite par une provocation allergénique chez les rats asthmatiques. Quoique ces résultats soient encourageants pour la population asthmatique à risque d'être exposée à l'un ou l'autre de ces contaminants, il est important de garder à l'esprit que notre projet de recherche portait sur un modèle animal exposé de façon aiguë à ces substances et que les études expérimentales sur le sujet sont contradictoires. Malgré tout, la diminution de l'inflammation observée dans ce projet de recherche est réelle et supportée au niveau tissulaire, cellulaire et moléculaire. Des études visant à élucider le ou les mécanismes responsables de cette réduction de l'inflammation pulmonaire par l'ozone et les nano-TiO₂ chez les asthmatiques devraient donc être entreprises.

Contribution originale à l'avancement des connaissances

Bien que des effets de l'éthanol chez les sujets asthmatiques aient été étudiés par quelques équipes de recherche, ces études ont uniquement porté sur l'asthme induit par l'alcool, l'observation principale étant que ces sujets développent des réactions asthmatiques suite à une exposition à l'éthanol seul, que ce soit par ingestion ou par inhalation. Les travaux présentés dans cette thèse sont les premiers à évaluer la réponse allergique pulmonaire suite à l'inhalation de vapeurs d'éthanol dans un modèle expérimental animal mimant des sujets asthmatiques en état de crise provoquée par un allergène chez un individu préalablement sensibilisé.

Nous avons aussi été les seuls à avoir évalué la réponse pulmonaire allergique suite à l'inhalation de vapeurs d'éthanol en concomitance avec un contaminant atmosphérique important, l'ozone. Nous avons d'ailleurs obtenu des résultats intéressants et stimulants, c'est-à-dire une diminution de l'inflammation causée par la provocation allergénique chez les rats asthmatiques suite à l'inhalation d'ozone seul ou concomitance avec l'éthanol. En effet, la plupart des études qui utilisent un modèle similaire au nôtre rapportent un effet toxique de l'ozone chez les asthmatiques ou du moins, elles ne montrent pas un effet atténuant au niveau de l'inflammation pulmonaire. Nous avons aussi montré que cet effet est dépendant de la

concentration d'ozone pour l'exposition, à savoir que l'effet de réduction s'observe à 1 ppm, mais pas 0,4 ppm. Cette observation est importante étant donné que Kierstein et al. (2008) ont montré que l'exposition à une concentration 3 fois plus élevée (3 ppm) d'ozone seul se traduit par une augmentation de l'inflammation. Divers scénarios d'exposition utilisés nous ont permis de valider l'effet atténuant selon trois expériences à 1 ppm d'ozone et de déterminer qu'une exposition unique de 4 heures est suffisante pour réduire l'inflammation. La seule autre équipe (Last et al., 2004) à avoir montré un tel effet de réduction causé par l'ozone chez les asthmatiques a utilisé des conditions d'expositions et un modèle animal différent du nôtre, c'est-à-dire des expositions répétées de 4 à 6 semaines d'ovalbumine chez la souris.

À l'instar des observations pour l'inhalation d'ozone, nos expériences sur l'inhalation de nano-TiO₂ chez les rats asthmatiques ont montré qu'une exposition unique atténue la réponse inflammatoire maximale de la réaction asthmatique. Bien que plusieurs aient montré une augmentation de l'inflammation causée par l'inhalation de nano-TiO₂, deux études (Rossi et al., 2010 ; Park et al., 2009) ont généré des résultats qui supportent les nôtres. Ces études différaient cependant de la nôtre à divers niveaux : par exemple, Rossi et al. (2010) ont utilisé un modèle de souris et ils ont sacrifié les animaux à 96 heures suivant la provocation allergénique (contrairement à 48 heures dans notre étude), ils ont utilisé une forme de nano-TiO₂ enrobée de silice, ainsi qu'une durée d'exposition plus longue (4 semaines), différente de notre traitement aigu. Finalement, une différence importante entre ces deux études et la nôtre est l'utilisation de la forme rutile de TiO₂, qui est reconnu comme étant moins toxique que la forme anatase utilisée lors de notre étude.

Au niveau expérimental, une autre contribution importante apportée par cette thèse est la détermination de l'inflammation pulmonaire allergique en fonction du temps dans le modèle de rat Brown Norway sensibilisé et provoqué par l'ovalbumine. À travers une série d'expériences dans lesquelles les animaux ont été sacrifiés à différents temps suivant la provocation allergénique, c'est-à-dire à 6, 16, 24, 36, 48 et 72 h, nous avons pu déterminer que l'inflammation semble augmenter de façon linéaire jusqu'à ce qu'elle atteigne un maximum qui survient à 48 h suivant la provocation. De plus, l'utilisation de plusieurs concentrations d'ovalbumine lors de la provocation a révélé que 1,5% pendant 15 minutes entraîne une inflammation pulmonaire autour de 35% de l'inflammation maximale. Ce modèle sera donc très utile pour tout groupe de recherche voulant étudier le potentiel de

modulation, à la hausse ou à la baisse, de toute substance sur le développement, le Cmax et/ou la récupération de la réaction inflammatoire asthmatique.

BIBLIOGRAPHIE

Abbey DE, Nishino N, McDonnell WF, Burchette RJ, Knutsen SF, Lawrence Beeson W, Yang JX (1999). Long-term inhalable particles and other air pollutants related to mortality in nonsmokers. *Am J Respir Crit Care Med* 159: 373–382.

Adamko D, Odemuyiwa SO, Moqbel R (2003). The eosinophil as a therapeutic target in asthma: beginning of the end, or end of the beginning? *Curr Opin Pharmacol* 3: 227-232.

Afsset (2010). L'éthanol en population professionnelle – Évaluation des risques de l'éthanol en population professionnelle. Rapport publié en juin 2010.

Ahmad S, Ahmad A, McConville G, Schneider BK, Allen CB, Manzer R, Mason RJ, White CW (2005). Lung epithelial cells release ATP during ozone exposure: signaling for cell survival. *Free Radic Biol Med* 39(2): 213-26.

Alessandrini F, Schulz H, Takenaka S, Lentner B, Karg E, Behrendt H, Jakob T (2006). Effects of ultrafine carbon particle inhalation on allergic inflammation of the lung. *J Allergy Clin Immunol* 117(4): 824-30.

Amrani Y, Panettieri RA Jr (1998). Cytokines induce airway smooth muscle cell hyperresponsiveness to contractile agonists. *Thorax* 53(8): 713-6.

ANSES (2011). Évaluation des risques de l'éthanol pour la population générale. Rapport publié en août 2011.

Aronsson D, Aronsson D, Tufvesson E (2005). Allergic rhinitis with or without concomitant asthma: difference in perception of dyspnoea and levels of fractional exhaled nitric oxide, *Clin Exp Allergy* 35(11): 1457–1461.

Avol EL, Gauderman WJ, Tan SM, London SJ, Peters JM (2001). Respiratory effects of relocating to areas of differing air pollution levels. *Am J Respir Crit Care Med* 164: 2067–2072.

Barnes PJ (2002). Current and future therapies for airway mucus hypersecretion, *Novartis Found Symp* 248: 237–249.

Bascom R, Bromberg PA, Costa DA, Devlin R, Dockery DW, Frampton MW, Lambert W, Samet JM, Speizer FE, Utell M (1996). American Thoracic Society, Committee of the Environmental and Occupational Health Assembly, health effects of outside air pollution, part I. *Am J Respir Crit Care Med* 153: 3-50.

Bassett D, Elbon-Copp C, Otterbein S, Barraclough-Mitchell H, Delorme M, Yang H (2001). Inflammatory cell availability affects ozone-induced lung damage. *J Toxicol Environ Health A* 64: 547–565.

Bates DV, Sizto R (1987). Air pollution and hospital admissions in Southern Ontario: the acid summer haze effect. *Environ Res* 317-331.

Bates JH, Rincon M, Irvin CG (2009). Animal models of asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297(3): L401-10.

Batra V, Musani AI, Hastie AT, Khurana S, Carpenter KA, Zangrilli JG, Peters SP (2004). Bronchoalveolar lavage fluid concentrations of transforming growth factor (TGF)-beta1, TGF-beta2, interleukin (IL)-4 and IL-13 after segmental allergen challenge and their effects on alpha-smooth muscle actin and collagen III synthesis by primary human lung fibroblasts. *Clin Exp Allergy* 34: 437-444.

Battaglia S, Sandrini MC, Catalano F (2005). Effects of aging on sensation of dyspnea and health-related quality of life in elderly asthmatics, *Aging Clin Exp Res* 17(4): 287-292.

Bauer H, Kasper-Giebl A, Loflund M, Giebl H, Hitzenberger R, Zibuschka F, Puxbaum H (2002). The contribution of bacteria and fungal spores to the organic carbon content of cloud water, precipitation and aerosols. *Atmospher Res* 64: 109-19.

Beck-Speier I, Dayal N, Karg E, Maier KL, Schumann G, Schulz H, Semmler M, Takenaka S, Stettmaier K, Bors W, Ghio A, Samet JM, Heyder J (2005). Oxidative stress and lipid mediators induced in alveolar macrophages by ultrafine particles. *Free Radic Biol Med* 38(8): 1080-92.

Beeson WL, Abbey DE, Knutsen SF (1998). Long-term concentrations of ambient air pollutants and incident lung cancer in California adults: results from the AHSMOG study. *Environ Health Perspect* 106: 813-823.

Bermudez E, Mangum JB, Asgharian B, Wong BA, Reverdy EE, Janszen DB, Hext PM, Warheit DB, Everitt JI (2002). Long-term pulmonary responses of three laboratory rodent species to subchronic inhalation of pigmentary titanium dioxide particles. *Toxicol Sci* 70(1): 86-97.

Bermudez E, Mangum JB, Wong BA, Asgharian B, Hext PM, Warheit DB, Everitt JI (2004). Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles. *Toxicol Sci* 77(2): 347-57.

Best CA, Laposata M (2003). Fatty acid ethyl esters: toxic non-oxidative metabolites of ethanol and markers of ethanol intake. *Front Biosci* 1;8:e202-17.

Bloemen K, Verstraelen S, Van Den Heuvel R, Witters H, Nelissen I, Schoeters G (2007). The allergic cascade: review of the most important molecules in the asthmatic lung. *Immunol Lett* 113: 6-18.

Borja-Aburto VH, Loomis DP, Bangdiwala SI, Shy CM, Rascon-Pancheco RA (1997). Ozone, suspended particulates, and daily mortality in Mexico City. *Am J Epidemiol* 145: 258-268.

Bouthillier L, Vincent R, Goegan P, Adamson IY, Bjarnason S, Stewart M, Guénette J, Potvin M, Kumarathasan P (1998). Acute effects of inhaled urban particles and ozone: lung morphology, macrophage activity, and plasma endothelin-1. *Am J Pathol* 153(6): 1873-84.

Boyce JA (2007). Mast cells and eicosanoid mediators: a system of reciprocal paracrine and autocrine regulation. *Immunol Rev* 217: 168–185.

Bradding P, Holgate ST (1996). The mast cell as a source of cytokines in asthma. *Ann NY Acad Sci* 796: 272–281.

Brightling CE, Bradding P, Symon FA, Holgate ST, Wardlaw AJ, Pavord ID (2002). Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. *N Engl J Med* 346: 1699–705.

Brown DM, Wilson MR, MacNee W, Stone V, Donaldson K (2001). Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicol Appl Pharmacol* 175(3): 191–9.

Calderón-Garcidueñas L, Vincent R, Mora-Tiscareño A, Franco-Lira M, Henríquez-Roldán C, Barragán-Mejía G, Garrido-García L, Camacho-Reyes L, Valencia-Salazar G, Paredes R, Romero L, Osnaya H, Villarreal-Calderón R, Torres-Jardón R, Hazucha MJ, Reed W (2007). Elevated plasma endothelin-1 and pulmonary arterial pressure in children exposed to air pollution. *Environ Health Perspect* 115(8): 1248–53.

Campbell L, Wilson HK (1986). Blood alcohol concentration following the inhalation of ethanol vapor under controlled conditions. *J Forensic Sci Soc* 26(2): 129–135.

Careau E, Bissonnette EY (2004). Adoptive transfer of alveolar macrophages abrogates bronchial hyperresponsiveness. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31: 22–27.

Casale TB, Costa JJ, Galli SJ (1996): TNF alpha is important in human lung allergic reactions. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15: 35–44.

Cassino C, Ito K, Bader I, Ciotoli C, Thurston G, Reibman J (1999). Cigarette smoking and ozone-associated emergency department use for asthma by adults in New York city. *Am J Respir Crit Care Med* 159: 1773–1779.

Cataldo D, Munaut C, Noel A, Frankenne F, Bartsch P, Foidart JH, Louis R (2000). MMP-2 and MMP-9 linked gelatinolytic activity in the sputum from patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Int Arch Allergy Immunol* 123: 259–267.

Caughey GH (2007). Mast cell tryptases and chymases in inflammation and host defense. *Immunol Rev* 217: 141–154.

Cavaillon JM (1994). Cytokines and macrophages. *Biomed Pharmacother* 48(10): 445–453.

Centre canadien d'hygiène et de sécurité au travail (2003). 4-Comment travailler en toute sécurité avec de l'ozone. [en ligne]

http://www.cchst.ca/oshanswers/chemicals/chem_profiles/ozone/working_ozo.html

Chalmers GW, Little SA, Patel KR, Thomson NC (1997). Endothelin-1-induced bronchoconstriction in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 156(2 Pt 1): 382–388.

- Cho HY, Reddy SP, Kleeberger SR (2006). Nrf2 defends the lung from oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 8: 76–87.
- Choi WS, Murthy GKG, Edwards DA, Langer R, Klibanov AM (2001). Inhalation delivery of proteins from ethanol suspensions. *Proc Natl Acad Sci* 98(20): 11103–07.
- Chrostek L, Jelski W, Szmitkowski M, Puchalski Z (2003). Alcohol dehydrogenase (ADH) isoenzymes and aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity in the human pancreas. *Dig Dis Sci* 48(7): 1230–3.
- Cody RP, Weisel CP, Birnbaum G, Liou PJ (1992). The effect of ozone associated with summertime photochemical smog and the frequency of asthma visits to hospital emergency departments. *Environ Res* 58: 184–194.
- Coëffier E, Joseph D, Vargaftig BB (1991). LTB₄, a potent chemotactic factor for purified guinea-pig eosinophils: interference of PAF-acether antagonists. *Int J Immunopharmacol* 13(2-3): 273–80.
- Cundall M, Sun Y, Miranda C, Trudeau JB, Barnes S, Wenzel SE (2003). Neutrophil-derived matrix metalloproteinase-9 is increased in severe asthma and poorly inhibited by glucocorticoids. *J Allergy Clin Immunol* 112: 1064–1071.
- Dales RE, Cakmak S, Judek S, Dann T, Coates F, Brook JR, et al (2004). Influence of outdoor aeroallergens on hospitalization for asthma in Canada. *J Allergy Clin Immunol* 113: 303–306.
- de Boer WI, Sont JK, van Schadewijk A, Stolk J, van Krieken JH, Hiemstra PS. (2000). Monocyte chemoattractant protein 1, interleukin 8, and chronic airways inflammation in COPD. *J Pathol* 190(5): 619–626.
- de Haar C, Hassing I, Bol M, Bleumink R, Pieters R (2005). Ultrafine carbon black particles cause early airway inflammation and have adjuvant activity in a mouse allergic airway disease model. *Toxicol Sci* 87(2): 409–18.
- de Haar C, Hassing I, Bol M, Bleumink R, Pieters R (2006). Ultrafine but not fine particulate matter causes airway inflammation and allergic airway sensitization to co-administered antigen in mice. *Clin Exp Allergy* 36(11): 1469–79.
- Del Donno M, Bittesnich D, Chetta A (2000). The effect of inflammation on mucociliary clearance in asthma: an overview, *Chest* 118(4): 1142–1149.
- Devlin RB, McDonnell WF, Mann R, Becker S, House DE, Schreinemachers D, Koren HS (1991). Exposure of humans to ambient levels of ozone for 6.6 hours causes cellular and biochemical changes in the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 4(1): 72–81.
- Devlin RB, McDonnell WF, Becker S, Madden MC, McGee MP, Perez R, Hatch G, House DE, Koren HS (1996). Time-dependent changes of inflammatory mediators in the lungs of humans exposed to 0.4 ppm ozone for 2 hr: a comparison of mediators found in bronchoalveolar lavage fluid 1 and 18 hr after exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* 138(1): 176–85.

Donaldson K, Stone V, Seaton A, MacNee W (2001). Ambient particle inhalation and the cardiovascular system: potential mechanisms. *Environ Health Perspect* 109: 523-27.

Donaldson K, Tran CL (2002). Inflammation caused by particles and fibers. *Inhal Toxicol*. 14(1): 5-27.

Dörger M, Krombach F (2000). Interaction of alveolar macrophages with inhaled mineral particulates. *J Aerosol Med* 13(4): 369-80.

Dye JA, Madden MC, Richards JH, Lehmann JR, Devlin RB, Costa DL (1999). Ozone effects on airway responsiveness, lung injury, and inflammation. Comparative rat strain and in vivo/in vitro investigations. *Inhal Toxicol* 11(11): 1015-40.

Eder W, Ege MJ, von Mutius E (2006). The asthma epidemic. *N Engl J Med* 355: 2226-35.

Edwards DA, Valente AX, Man J, Tsapis N (2003). Recent Advances Related to the Systemic Delivery of Therapeutic Molecules by Inhalation. Division of Engineering and Applied Sciences, Harvard University.

Eggleston PA, Malveaux FJ, Butz AM, Huss K, Thompson L, Kolodner K, Rand CS (1998). Medications used by children with asthma living in inner cities. *Pediatrics* 101: 349–354.

Eissa, N, Huston D (2003). Therapeutic Targets in Airway Inflammation. Marcel Dekker, Inc., New York.

Ekici M, Ekici A, Kara T (2006). Perception of dyspnea during exacerbation and histamine-related bronchoconstriction in patients with asthma, *Ann Allergy Asthma Immunol* 96(5): 707–712.

Ennis M (2003). Neutrophils in asthma pathophysiology. *Curr Allergy Asthma Rep* 3(2): 159-65.

Environnement Canada 2012. Particules [en ligne]
<http://www.ec.gc.ca/air/default.asp?lang=Fr&n=2C68B45C-1>
 (page consultée en décembre 2012)

Evans CM, Fryer AD, Jacoby DB, Gleich GJ, Costello RW (1997). Pretreatment with antibody to eosinophil major basic protein prevents hyperresponsiveness by protecting neuronal M2 muscarinic receptors in antigen-challenged guinea pigs. *J Clin Invest* 100(9): 2254-62.

Fakhrzadeh L, Laskin JD, Laskin DL (2002). Deficiency in inducible nitric oxide synthase protects mice from ozone-induced lung inflammation and tissue injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 26: 413–419.

Farraj AK, Boykin E, Ledbetter A, Andrews D, Gavett SH (2010). Increased lung resistance after diesel particulate and ozone co-exposure not associated with enhanced lung inflammation in allergic mice. *Inhal Toxicol* 22(1): 33-41.

- Ferko AP, Bobyock E (1979). Rates of ethanol disappearance from blood and hypothermia following acute and prolonged ethanol inhalation. *Toxicol Appl Pharmacol* 50(3):417-27.
- Finkelman FD (2007). Anaphylaxis: lessons from mouse models. *J Allergy Clin Immunol* 120: 506–515.
- Finsnes F, Skjønberg OH, Lyberg T, Christensen G (2000). Endothelin-1 production is associated with eosinophilic rather than neutrophilic airway inflammation. *Eur Respir J* 15(4): 743-50.
- Fiz JA, Jane R, Izquierdo J (2006). Analysis of forced wheezes in asthma patients, *Respiration* 73(1): 55–56.
- Fleisch, J. H., Calkins, P. J., Troxell, T. C., and Hooker, C. S. (1976). Inhibition of antigen-induced mediator release from guinea pig lung by alcohols. *Am Rev Respir Dis* 114: 1107-1112.
- Frampton MW, Morrow PE, Torres A, Voter KZ, Whitin JC, Cox C, Speers DM, Tsai Y, Utell MJ (1997). Effects of ozone on normal and potentially sensitive human subjects. Part II: Airway inflammation and responsiveness to ozone in nonsmokers and smokers. *Res Rep Health Eff Inst* 78: 39-72.
- Frampton MW, Utell MJ, Zareba W, Oberdörster G, Cox C, Huang LS, Morrow PE, Lee FE, Chalupa D, Frasier LM, Speers DM, Stewart J (2004). Effects of exposure to ultrafine carbon particles in healthy subjects and subjects with asthma. *Res Rep Health Eff Inst* 126: 1–47.
- Frampton MW, Stewart JC, Oberdörster G, Morrow PE, Chalupa D, Pietropaoli AP, Frasier LM, Speers DM, Cox C, Huang LS, Utell MJ (2006). Inhalation of ultrafine particles alters blood leukocyte expression of adhesion molecules in humans. *Environ Health Perspect* 114(1): 51-8.
- Frischer TM, Kuehr J, Pullwitt A, Meinert R, Forster J, Studnicka M, Koren H (1993). Ambient ozone causes upper airways inflammation in children. *Am Rev Respir Dis* 148(4 Pt 1): 961-964.
- Frischer T, Studnicka M, Halmerbauer G, Horak F Jr, Gartner C, Tauber E, Koller DY (2001). Ambient ozone exposure is associated with eosinophil activation in healthy children. *Clin Exp Allergy* 31: 1213–1219.
- Fryer AD, Costello RW, Jacoby DB (2000). Muscarinic receptor dysfunction in asthma. *Allergy Clin Immunol Internat* 12: 63-67.
- Galli SJ, Kalesnikoff J, Grimaldeston MA, Piliponsky AM, Williams CM, Tsai M (2005). Mast cells as ‘tunable’ effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol* 23: 749–786.
- Galli SJ, Grimaldeston MA, Tsai M (2008). Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. *Nature Rev Immunol* 8: 478–486.

- Geiser M, Casaulta M, Kupferschmid B, Schulz H, Semmler-Behnke M, Kreyling W (2008). The role of macrophages in the clearance of inhaled ultrafine titanium dioxide particles. *Am J Respir Cell Mol Biol* 38(3): 371-6.
- Gelfand EW (2004). Inflammatory mediators in allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 114: S135-8.
- George D, Thurston R, Charon Gwynn (1997). Ozone and asthma mortality hospital admissions in New-York city. *Am J Respir Crit Care Med* A426.
- Gilfillan AM, Tkaczyk C (2006). Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nat Rev Immunol* 6: 218-230.
- Goist KC, Sutker PB (1985). Acute alcohol intoxication and body composition in women and men. *Pharmacol Biochem Behav* 22: 811-814.
- Gounni AS, Lamkhioued B, Koussih L, Ra C, Renzi PM, Hamid Q (2001). Human neutrophils express the high-affinity receptor for immunoglobulin E (FcεRI): role in asthma. *FASEB J* 15: 940.
- Gordon S (2003) Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3: 23-35.
- Grahame T, Schlesinger R (2005). Evaluating the health risk from secondary sulfates in eastern North American regional ambient air particulate matter. *Inhal Toxicol* 17: 15-27.
- Grassian VH, Adamcakova-Dodd A, Pettibone JM, O'Shaughnessy PT. and Thorne PS (2007). Inflammatory response of mice to manufactured titanium dioxide nanoparticles: Comparison of size effects through different exposure routes. *Nanotoxicology* 1: 211-226.
- Guo M, Pascual RM, Wang S, Fontana MF, Valancius CA, Panettieri RA Jr, Tilley SL, Penn RB (2005). Cytokines regulate beta-2-adrenergic receptor responsiveness in airway smooth muscle via multiple PKA- and EP2 receptor-dependent mechanisms. *Biochemistry* 44(42): 13771-82.
- Gurgueira SA, Lawrence J, Coull B, Murthy GG, González-Flecha B (2002). Rapid increases in the steady-state concentration of reactive oxygen species in the lungs and heart after particulate air pollution inhalation. *Environ Health Perspect* 110(8): 749-55.
- Hancock A, Armstrong L, Gama R, Millar A (1998). Production of interleukin 13 by alveolar macrophages from normal and fibrotic lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18(1): 60-65.
- Hardy CC, Robinson C, Tattersfield AE, Holgate ST (1984). The bronchoconstrictor effect of inhaled prostaglandin D 2 in normal and asthmatic men. *N Engl J Med* 311: 209-213.
- Hasan AM, Mourtada-Maarabouni M, Hameed MS, Williams GT, Dent G (2010). Phosphoinositide 3-kinase gamma mediates chemotactic responses of human eosinophils to platelet-activating factor. *Int Immunopharmacol* 10(9): 1017-21.

- Heinemann L, Klappoth W, Rave K, Hompesch B, Linkeschowa R, Heise T (2000) Intra-individual variability of the metabolic effect of inhaled insulin together with an absorption enhancer. *Diabetes Care* 23(9): 1343-7.
- Hernandez ML, Lay JC, Harris B, Esther CR Jr, Brickey WJ, Bromberg PA, Diaz-Sanchez D, Devlin RB, Kleeberger SR, Alexis NE, Peden DB (2010). Atopic asthmatic subjects but not atopic subjects without asthma have enhanced inflammatory response to ozone. *J Allergy Clin Immunol* 126(3): 537-44 e1.
- Holgate ST, Peters-Golden M, Panettieri RA, Henderson WR Jr (2003). Roles of cysteinyl leukotrienes in airway inflammation, smooth muscle function, and remodeling. *J Allergy Clin Immunol* 111(1 Suppl): S18-34; discussion S34-6.
- Holguin AH, Buffler PA, Contant CF Jr., Stock TH, Kotchmar D, Hsi BP, Jenkins DE, Gehan BM, Noel LM, Mei M (1985). The effect of ozone on asthmatics in the Houston area. *Air Pollution Control Association* 262-280.
- Horstman DH, Ball BA, Brown J, Gerrity T, Folinsbee LJ (1995). Comparison of pulmonary responses of asthmatic and nonasthmatic subjects performing light exercise while exposed to a low level of ozone. *Toxicol and Industrial Health* 11: 369-385.
- Humbert M (1996). Pro-eosinophilic cytokines in asthma. *Clin Exp Allergy* 26: 123–127.
- Humbles AA, Lloyd CM, McMillan SJ, Friend DS, Xanthou G, McKenna EE, Ghiran S, Gerard NP, Yu C, Orkin SH, Gerard C (2004). A critical role for eosinophils in allergic airways remodeling. *Science* 305: 1776–1779.
- Hussain S, Vanoirbeek JA, Luyts K, De Vooght V, Verbeken E, Thomassen LC, Martens JA, Dinsdale D, Boland S, Marano F, Nemery B, Hoet PH (2011). Lung exposure to nanoparticles modulates an asthmatic response in a mouse model. *Eur Respir J* 37(2): 299-309.
- Hylkema MN, Hoekstra MO, Luinge M, Timens W (2002). The strength of the ova-induced airway inflammation in rats is strain dependent. *Clin Exp Immunol* 129: 390–6.
- IARC (International Agency for Research on Cancer) (1988). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Alcohol Drinking. Vol. 44. pp. 251-259. France: Lyon. World Health Organisation.
- Imrich A, Ning YY, Kobzik L (1999). Intracellular oxidant production and cytokine responses in lung macrophages: evaluation of fluorescent probes. *J Leukoc Biol* 65(4): 499-507.
- INSERM (Institut national de la santé et de la recherche médicale) (2001). Alcool : Effets sur la santé. pp. 1-9. France: Paris
- Jones AW, Hahn R, Stalberg HP (1990). Distribution of ethanol and water between plasma and whole blood ; inter and intra individual variations after administration of ethanol by intravenous infusion. *Scand J Clin Lab Invest* 50: 775-780.

Ishi Y, Shirato M, Nomura A, Sakamoto T, Uchida Y, Ohtsuka M, Sagai M, Hasegawa S (1998). Cloning of rat eotaxin: ozone inhalation increases mRNA and protein expression in lungs of brown Norway rats. *Am J Physiol* 274(1 Pt 1): L171-6.

Jaques PA, Kim CS (2000). Measurement of total lung deposition of inhaled ultrafine particles in healthy men and women. *Inhalation Toxicology* 12, 715-731.

Jatakanon A, Uasuf C, Maziak W, Lim S, Chung KF, Barnes PJ (1999). Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 160(5 Pt 1): 1532-9.

Jones AW, Hahn R, Stalberg HP (1990). Distribution of ethanol and water between plasma and whole blood ; inter and intra individual variations after administration of ethanol by intravenous infusion. *Scand J Clin Lab Invest* 50: 775-780

Jones AW, Hahn R, Stalberg HP (1992). Pharmacokinetics of ethanol in plasma and whole blood; estimation of total body water by the dilution principle. *Eur J Clin Pharmacol* 42: 445-448.

Kaiko GE, Horvat JC, Beagley KW, Hansbro PM (2008). Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology* 123: 326-338.

Kakinoki K, Yamane K, Teraoka R, Otsuka M, Matsuda Y (2004). Effect of relative humidity on the photocatalytic activity of titanium dioxide and photostability of famotidine. *J Pharm Sci* 93(3): 582-589.

Kierstein S, Krytska K, Sharma S, Amrani Y, Salmon M, Panettieri RA Jr, Zangrilli J, Haczku A (2008). Ozone inhalation induces exacerbation of eosinophilic airway inflammation and hyperresponsiveness in allergen-sensitized mice. *Allergy* 63(4): 438-46.

Kita H, Adolphson CR, Gleich GJ (1998). Biology of eosinophils, in: Middleton EJr, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF, Yunginger JW, Busse WW, eds. *Allergy : Principles and Practice*. 5th ed. St. Louis: Mosby 240-260.

Kline JN, Krieg AM (2008). Toll-like receptor 9 activation with CpG oligodeoxynucleotides for asthma therapy. *Drug News Perspect* 21(8):434-439.

Kreyling WG, Semmler M, Erbe F, Mayer P, Takenaka S, Schulz H, Oberdörster G, Ziesenis A (2002). Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lungs epithelium to extrapulmonary organs in size dependent but very low. *J Tox Environ Health* 65(20): 1513-1530.

Kruhoffer PW (1983). Handling of inspired vaporized ethanol in the airways and lungs (with comments on forensic aspects). *Forensic Sci Int* 21(1): 1-17.

Laj P, Sellegrì K (2003). Les aérosols atmosphériques: impacts locaux, effets globaux. *Revue française des laboratoires* 349: 23-34.

Lands WE (1998). A review of alcohol clearance in humans. *Alcohol* 15(2):147-60.

Larsen ST, Roursgaard M, Jensen KA, Nielsen GD (2010). Nano titanium dioxide particles promote allergic sensitization and lung inflammation in mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 106(2): 114-7.

Last JA, Ward R, Temple L, Pinkerton KE, Kenyon NJ (2004a). Ovalbumin-induced airway inflammation and fibrosis in mice also exposed to ultrafine particles. *Inhal Toxicol* 16(2): 93-102.

Last JA, Ward R, Temple L, Kenyon NJ (2004b). Ovalbumin-induced airway inflammation and fibrosis in mice also exposed to ozone. *Inhal Toxicol* 16(1): 33-43.

Le Conseil canadien des ministres de l'environnement (2000). Standard Pancanadien relatif aux particules (PM) et à l'ozone.

Lee JJ, Dimina D, Macias MP, Ochkur SI, McGarry MP, O'Neill KR, Protheroe C, Pero R, Nguyen T, Cormier SA, Lenkiewicz E, Colbert D, Rinaldi L, Ackerman SJ, Irvin CG, Lee NA (2004). Defining a link with asthma in mice congenitally deficient in eosinophils. *Science* 305: 1773-1776.

Lester D, Greenberg LA (1951). The inhalation of ethyl alcohol by man. *Quart J Stud Alcohol* 12:167-178.

Li N, Hao M, Phalen RF, Hinds WC, Nel AE. Particulate air pollutants and asthma (2003). A paradigm for the role of oxidative stress in PM-induced adverse health effects. *Clin Immunol* 109: 250-265.

Li N, Nel AE (2006). Role of the Nrf2-mediated signaling pathway as a negative regulator of inflammation: implications for the impact of particulate pollutants on asthma. *Antioxid Redox Signal* 8: 88-98.

Lin F, Nguyen CM, Wang SJ, Saadi W, Gross SP, Jeon NL (2004). Effective neutrophil chemotaxis is strongly influenced by mean IL-8 concentration. *Biochem Biophys Res Commun* 319(2): 576-581.

Lohmann-Matthes ML, Steinmuller MC, Franke-Ullmann G (1994). Pulmonary macrophages. *Eur Respir J* 7: 1678-1689.

Lukacs NW, Standiford TJ, Chensue SW, Kunkel RG, Strieter RM, Kunkel SL (1996). C-C chemokine-induced eosinophil chemotaxis during allergic airway inflammation. *J Leukoc Biol* 60(5): 573-578.

Lukacs NW, Prosser DM, Wiekowski M, Lira SA, Cooka DN (2001). Requirement for the Chemokine Receptor Ccr6 in Allergic Pulmonary Inflammation. *J Exp Med* 194(4): 551-556.

Ma-Hock L, Burkhardt S, Strauss V, Gamer AO, Wiench K, van RB, Landsiedel R (2009). Development of a short-term inhalation test in the rat using nano-titanium dioxide as a model substance. *Inhal Toxicol* 21: 102-118.

Malik F, Wickramasinghe SN (1986). Haematological abnormalities in mice continuously exposed to ethanol vapour. *Br J Exp Pathol* 67:831-838.

Marietta CA, Jerrells TR, Meagher RC, Karanian JW, Weight FF, Eckardt MJ (1988). Effects of long-term ethanol inhalation on the immune and hematopoietic systems of the rat. *Alcohol Clin Exp Res* 12(2): 211-214.

Matsui T, Akahoshi T, Namai R, Hashimoto A, Kurihara Y, Rana M, Nishimura A, Endo H, Kitasato H, Kawai S, Takagishi K, Kondo H (2001). Selective recruitment of CCR6-expressing cells by increased production of MIP-3 alpha in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 125(1): 155-61.

Matsukura S, Stellato C, Georas SN, Casolaro V, Plitt JR, Miura K, Kurosawa S, Schindler U, Schleimer RP (2001). Interleukin-13 upregulates eotaxin expression in airway epithelial cells by a STAT6-dependent mechanism. *Am J Respir Cell Mol Biol* 24(6): 755-61.

Matsuse H, Fukushima C, Shimoda T, Sadahiro T, Sadahiro A et Kohno S (2007) Effects of acetaldehyde on human airway constriction and inflammation. Novartis Found. Symp. 285:97-106; discussion 106-9, 198-9.

Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM (2000). M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol* 164: 6166-6173.

Mongar JL, Schild HO (1957). Inhibition of the anaphylactic reaction. *J Physiol* 135: 301-319.

Monteiller C, Tran L, MacNee W, Faux S, Jones A, Miller B, Donaldson K (2007). The pro-inflammatory effects of low-toxicity low-solubility particles, nanoparticles and fine particles, on epithelial cells in vitro: the role of surface area. *Occup Environ Med* (9): 609-15.

Morcillo EJ, Cortijo J (2006). Mucus and MUC in asthma, *Curr Opin Pulm Med* 12(1): 1-6.

Morishita M, Keeler G, Wagner J, Marsik F, Timm E, Dvonch J, Harkema J (2004). Pulmonary retention of particulate matter is associated with airway inflammation in allergic rats exposed to air pollution in urban Detroit. *Inhal Toxicol* 16(10): 663-74.

Morrow PE (1988). Possible mechanisms to explain dust overloading of the lungs. *Fundam Appl Toxicol* 10: 369-384.

Muller M., Bartsch P (1997). Maladies de l'environnement, maladies du 21ème siècle : asthme et pollution atmosphérique. *Rev méd Liège* 52 : 768-775.

Mullin LS, Krivanek ND (1982). Comparison of unconditioned reflex and conditioned avoidance tests in rats exposed by inhalation to carbon monoxide, 1,1,1-trichloroethane, toluene or ethanol. *Neurotoxicology* 3: 126-37

Munitz A, Levi-Schaffer F (2004). Eosinophils: "new" roles for "old" cells. *Allergy* 59: 268-75.

Myou S, Fujimura M, Nishi K, Ohka T, Matsuda T (1993) Aerosolized acetaldehyde induces histamine-mediated bronchoconstriction in asthmatics. *Am Rev Respir Dis* 148: 940-3.

Myou S, Fujimura M, Nishi K, Watanabe K, Matsuda M, Ohka T, Matsuda T (1996) Effect of ethanol on airway caliber and nonspecific bronchial responsiveness in patients with alcohol-induced asthma. *Allergy* 51: 52-5.

Nel A, Xia T, Madler L, Li N (2006). Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311: 622–627.

Nobata K, Fujimura M, Tsuji H (2006). Longitudinal changes of pulmonary function and bronchial responsiveness in cough-variant asthma treated with bronchodilators alone, *Allergy Asthma Proc* 27(6): 479–485.

Nygaard UC, Hansen JS, Samuelsen M, Alberg T, Marioara CD, Løvik M (2009). Single-walled and multi-walled carbon nanotubes promote allergic immune responses in mice. *Toxicol Sci* 109(1): 113-23.

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

Oberdörster G, Ferin J, Lehnert BE (1994). Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. *Environ Health Perspect* 102 Suppl 5: 173-179.

Oberdörster G, Maynard A, Donaldson K, Castranova V, Fitzpatrick J, Ausman K, Carter J, Karn B, Kreyling W, Lai D, Olin S, Monteiro-Riviere N, Warheit D, Yang H; ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Nanomaterial Toxicity Screening Working Group (2005). Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Part Fibre Toxicol* 6;2:8.

Park HS, Cha HR, Lee JE, Park JW, Shin JY, Kim JO, Kim SY, Jung SS (2009). Effect of Titanium Dioxide Inhalation in a Murine Model of Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 179: A2252.

Parkinson, A. (2001). Biotransformation of xenobiotics. In *Casarett and Doull's toxicology. The basic science of poisons*, ed., C.D. Klaassen, 6th ed., pp. 152-156. New York: McGraw-Hill.

Pekkanen J, Sunyer J, Anto JM (2005). European Community Respiratory Health Study. Operational definitions of asthma in studies on its etiology, *Eur Respir J* 26(1): 28–35.

Penttinen P, Timonen KL, Tiittanen P, Mirme A, Ruuskanen J, Pekkanen J. Ultrafine particles in urban air and respiratory health among adult asthmatics (2001). *Eur Respir J* 17(3): 428-35.

Persson CG, Uller L (2010). Resolution of cell-mediated airways diseases. *Respir Res* 11(1): 75.

Peters JM, Avol E, Navidi W, London SJ, Gauderman WJ, Lurmann F, Linn WS, Margolis H, Rappaport E, Gong H, Thomas DC (1999). A study of twelve Southern California communities with differing levels and types of air pollution. I. Prevalence of respiratory morbidity. *Am J Respir Crit Care Med* 159: 760–767.

Pietropaoli AP, Frampton MW, Hyde RW, Morrow PE, Oberdörster G, Cox C, Speers DM, Frasier LM, Chalupa DC, Huang LS, Utell MJ (2004). Pulmonary function, diffusing capacity, and inflammation in healthy and asthmatic subjects exposed to ultrafine particles. *Inhal Toxicol* 16 Suppl 1: 59-72.

Plopper CG, Hatch GE, Wong V, Duan X, Weir AJ, Tarkington BK, Devlin RB, Becker S, Buckpitt AR (1998). Relationship of inhaled ozone concentration to acute tracheobronchial epithelial injury, site-specific ozone dose, and glutathione depletion in rhesus monkeys. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19(3): 387-99.

Pouliot P, Turmel V, Gélinas E, Laviolette M, Bissonnette EY (2005). Interleukin-4 production by human alveolar macrophages. *Clin Exp Allergy* 35(6): 804-10.

Prussin C, Metcalfe DD (2006). 5. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 117: S450-6.

Pryor WA, Squadrito GL, Friedman M (1995). The cascade mechanism to explain ozone toxicity: the role of lipid ozonation products. *Free Radic Biol Med* 19(6): 935-41.

Putaud JP, Raes F, Van Dingenen R, Brüggemann E, Facchini MC, Decesari S. et al (2004). A European aerosol phenomenology- 2: Chemical characteristics of particulate matter at kerbside, urban, rural and background sites in Europe. *Atmos Environ* 38 (16): 2579-95.

Renwick LC, Brown D, Clouter A, Donaldson K (2004). Increased inflammation and altered macrophage chemotactic responses caused by two ultrafine particles. *Occup Environ Med* 61: 442-447.

Ressources naturelles Canada (2010). Éthanol – Avantages [En ligne]
<http://oee.rncan.gc.ca/transports/carburants-remplacement/carburants-faits/ethanol/6084>
 (Page consultée en décembre 2012)

Ricci M, Matucci A, Rossi O (1997). Pathogenetic mechanisms and genetic aspects of bronchial asthma. *Allergy Clin Immunol Internat* 9: 141-148.

Rikans LE, Gonzalez LP (1990). Antioxidant protection systems of rat lung after chronic ethanol inhalation. *Alcohol Clin Exp Res* 14(6):872-7.

Rivera J, Gilfillan AM (2006). Molecular regulation of mast cell activation. *J Allergy Clin Immunol* 117: 1214-1225.

Rogers DF (2004). Airway mucus hypersecretion in asthma: an undervalued pathology? *Curr Opin Pharmacol* 4 (3): 241-250.

Romero P, Wagg J, Green ML, Kaiser D, Krummenacker M, Karp PD (2004). Computational prediction of human metabolic pathways from the complete human genome. *Genome Biology* volume 6, issue 1: R2.

Romieu I, Meneses F, Ruiz S, Sienra JJ, Huerta J, White MC, Etzel RA (1996). Effects of air pollution on the respiratory health of asthmatic children living in Mexico City. *Am J Respir Crit Care Med* 154: 300-307.

Rossi EM, Pylkkänen L, Koivisto AJ, Nykäsenoja H, Wolff H, Savolainen K, Alenius H. 2010. Inhalation exposure to nanosized and fine TiO₂ particles inhibits features of allergic asthma in a murine model. *Part Fibre Toxicol* 25(7): 35.

Rothenberg ME, Hogan SP (2006). The eosinophil. *Annu Rev Immunol* 24: 147–74.

Ryan JJ, Kashyap M, Bailey D, Kennedy S, Speiran K, Brenzovich J, Barnstein B, Oskeritzian C, Gomez G (2007). Mast cell homeostasis: a fundamental aspect of allergic disease. *Crit Rev Immunol* 27: 15–32.

Sampson HA, Muñoz-Furlong A, Bock SA, Schmitt C, Bass R, Chowdhury BA, Decker WW, Furlong TJ, Galli SJ, Golden DB, Gruchalla RS, Harlor AD Jr, Hepner DL, Howarth M, Kaplan AP, Levy JH, Lewis LM, Lieberman PL, Metcalfe DD, Murphy R, Pollart SM, Pumphrey RS, Rosenwasser LJ, Simons FE, Wood JP, Camargo CA Jr. (2005). Symposium on the definition and management of anaphylaxis: summary report. *J Allergy Clin Immunol* 115 : 584–591.

Sano T, Ueda H, Bando H (2004). A preliminary study of PEFr monitoring in patients with chronic cough, *Lung* 182(5): 285–295.

Salvi S, Holgate ST. Mechanisms of particulate matter toxicity (1999). *Clin Exp Allergy* 29: 1187-94

Sayed BA, Christy A, Quirion MR, Brown MA (2008). The master switch: the role of mast cells in autoimmunity and tolerance. *Annu Rev Immunol* 26: 705–739.

Scannell C, Chen L, Aris RM, Tager I, Christian D, Ferrando R, Welch B, Kelly T, Balmes JR (1996). Greater ozone-induced inflammatory responses in subjects with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 154(1): 24-9.

Scarino A, Charbonneau M, Tardif R. Influence of ALDH2 polymorphism on ethanol kinetics and pulmonary effects in male and female rats exposed to ethanol vapors. *Inhal Toxicol* 21(3): 193-9, 2009.

Schelegle ES, Miller LA, Gershwin LJ, Fanucchi MV, Van Winkle LS, Gerriets JE, Walby WF, Mitchell V, Tarkington BK, Wong VJ, Baker GL, Pantle LM, Joad JP, Pinkerton KE, Wu R, Evans MJ, Hyde DM, Plopper CG (2003). Repeated episodes of ozone inhalation amplifies the effects of allergen sensitization and inhalation on airway immune and structural development in Rhesus monkeys. *Toxicol Appl Pharmacol* 191(1): 74-85.

Schleimer RP, Kato A, Kern R, Kuperman D, Avila PC (2007). Epithelium: at the interface of innate and adaptive immune responses. *J Allergy Clin Immunol* 120: 1279–1284.

Schlesinger RB, Ben-Jebria A, Dahl AR, Snipes MB, Ultman J (1997). Disposition of inhaled toxicants, *Handbook of Human Toxicology*, 2^e éd., Taylor and Francis, Washington, DC, 191-224.

- Schulman ES, Liu MC, Proud D, MacGlashan Jr. DW, Lichtenstein LM, Plaut M (1985). Human lung macrophages induce histamine release from basophils and mast cells. *Am Rev Respir Dis* 131: 230–235.
- Schwarze PE, Ovrevik J, Låg M, Refsnes M, Nafstad P, Hetland RB, Dybing E (2006). Particulate matter properties and health effects: consistency of epidemiological and toxicological studies. *Hum Exp Toxicol* 25(10):559–79.
- Shelburne CP, Ryan JJ (2001). The role of Th2 cytokines in mast cell homeostasis. *Immunol Rev* 179: 82–93.
- Shimura S, Sasaki T, Sasaki H (1988). Chemical properties of bronchorrhea sputum in bronchial asthma, *Chest* 94(6): 1211–1215.
- Shimura S, Andoh Y, Haraguchi M (1996). Continuity of airway goblet cells and intraluminal mucus in the airways of patients with bronchial asthma, *Eur Respir J* 9(7): 1395–1401.
- Shin YS, Takeda K, Gelfand EW (2009). Understanding asthma using animal models. *Allergy Asthma Immunol Res* 1(1): 10–8.
- Siegel PD, Saxena RK, Saxena QB, Ma JK, Ma JY, Yin XJ, Castranova V, Al-Humadi N, Lewis DM (2004). Effect of diesel exhaust particulate (DEP) on immune responses: contributions of particulate versus organic soluble components. *J Toxicol Environ Health A* 67(3): 221–31.
- Sitkauskiene B, Johansson AK, Sergejeva S, Lundin S, Sjostrand M, Lotvall J (2004). Regulation of bone marrow and airway CD34+ eosinophils by interleukin-5. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30: 367–378.
- Smith HR, Larsen GL, Cherniack RM, Wenzel SE, Voelkel NF, Westcott JY, Bethel RA (1992). Inflammatory cells and eicosanoid mediators in subjects with late asthmatic responses and increases in airway responsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 89: 1076–1084.
- Stravinskaite K, Malakauskas K, Sitkauskiene B (2005). Perception of dyspnea in asthmatics with normal lung function, *Medicina (Kaunas)* 41(9): 747–753.
- Sutherland ER, Martin RJ (2003). Airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease: comparisons with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 112(5): 819–27.
- Takao A, Shimoda T, Kohno S, Asai S, Harda S (1998) Correlation between alcohol-induced asthma and acetaldehyde dehydrogenase-2 genotype. *J Allergy Clin Immunol* 101: 576–80.
- Takizawa H, Sato M, Ito K (1997). The interactions of eosinophils with bronchial epithelial cells in asthma. *Allergy Clin Immunol Internat* 9: 149–155.
- Tamaoki J, Sekizawa K, Ueki IF, Graf PD, Nadel JA., Bigby TD (1987). Effect of macrophage stimulation on parasympathetic airway contraction in dogs. *Eur J Pharmacol* 138: 421–425.

Tang C, Inman MD, van Rooijen N, Yang P, Shen H, Matsumoto K, O'Byrne PM (2001). Th type 1-stimulating activity of lung macrophages inhibits Th2-mediated allergic airway inflammation by an IFN- γ -dependent mechanism. *J Immunol* 166: 1471–1481.

Teran LM, Carroll M, Frew AJ, Montefort S, Lau LC, Davies DE, Lindley I, Howarth PH, Church MK, Holgate ST (1995). Neutrophil influx and interleukin-8 release after segmental allergen or saline challenge in asthmatics. *Int Arch Allergy Immunol* 107: 374–375.

Thomson E, Kumarathasan P, Goegan P, Aubin RA, Vincent R (2005). Differential regulation of the lung endothelin system by urban particulate matter and ozone. *Toxicol Sci* 88(1): 103–13.

Tliba O, Deshpande D, Chen H, Van Besien C, Kannan M, Panettieri RA Jr, Amrani Y (2003). IL-13 enhances agonist-evoked calcium signals and contractile responses in airway smooth muscle. *Br J Pharmacol* 140(7): 1159–62.

Toward TJ, Broadley KJ (2002). Airway function, oedema, cell infiltration and nitric oxide generation in conscious ozone-exposed guinea pigs: effects of dexamethasone and rolipram. *Br J Pharmacol* 136: 735–745.

Traves SL, Culpitt S, Russell REK, Barnes PJ, Donnelly LE (2002). Elevated levels of the chemokines GRO α and MCP-1 in sputum samples from COPD patients. *Thorax* 57: 590–595.

Triolet J (2005). Panorama de l'utilisation des solvants en France fin 2004. Hygiène et sécurité du travail—Cahiers de notes documentaires 199: 65–97.

Uhlson C, Harrison K, Allen CB, Ahmad S, White CW, Murphy RC (2002). Oxidized phospholipids derived from ozone-treated lung surfactant extract reduce macrophage and epithelial cell viability. *Chem Res Toxicol* 15(7): 896–906.

Ulrich MM, Alink GM, Kumarathasan P, Vincent R, Boere AJ, Cassee FR (2002). Health effects and time course of particulate matter on the cardiopulmonary system in rats with lung inflammation. *J Toxicol Environ Health A* 65(20): 1571–95.

US EPA (2003). Fourth external review draft of air quality criteria for particulate matter, Vol. 2, EPA/600/P-99/002-aD.

US EPA (2009). Integrated review plan for the ozone national ambient air quality standards review: external review draft. Research Triangle Park, NC: National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development and Office of Air Quality Planning and Standards; 2009. US EPA (EPA 452/D-09-001) 1–78.

US EPA (2012). PM research [en ligne]
<http://www.epa.gov/airscience/air-particulatematter.htm>
 (page consultée en décembre 2012)

van Ravenzwaay B, Landsiedel R, Fabian E, Burkhardt S, Strauss V, Ma-Hock L (2009). Comparing fate and effects of three particles of different surface properties: nano-TiO₂, pigmentary TiO₂ and quartz. *Toxicol Lett* 186(3): 152–9.

Wagner JG, Jiang Q, Harkema JR, Illek B, Patel DD, Ames BN, Peden DB (2007). Ozone enhancement of lower airway allergic inflammation is prevented by gamma-tocopherol. *Free Radic Biol Med* 43(8): 1176-88.

Wagner JG, Harkema JR, Jiang Q, Illek B, Ames BN, Peden DB (2009). Gamma-tocopherol attenuates ozone-induced exacerbation of allergic rhinosinusitis in rats. *Toxicol Pathol* 37(4): 481-491.

Warheit DB, Hansen JF, Yuen IS, Kelly DP, Snajdr SI, Hartsky MA (1997). Inhalation of high concentrations of low toxicity dusts in rats results in impaired pulmonary clearance mechanisms and persistent inflammation. *Toxicol Appl Pharmacol* 145(1): 10-22.

Warheit DB, Webb TR, Sayes CM, Colvin VL, Reed KL (2006). Pulmonary instillation studies with nanoscale TiO₂ rods and dots in rats: toxicity is not dependent upon particle size and surface area. *Toxicol Sci* 91(1): 227-236.

Warheit DB, Webb TR, Reed KL, Frerichs S, Sayes CM (2007). Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine-TiO₂ particles: differential responses related to surface properties. *Toxicology* 230: 90-104.

Watanabe T (1991). Mechanism of ethanol-induced bronchoconstriction in Japanese asthmatic patients. *Alerugi* 40(9): 1210-7.

Weisel CP, Cody RP, Liou PJ (1995). Relationship between summertime ambient ozone levels & emergency department visits for asthma in central New Jersey. *Environ Health Perspect* 103: 97-102.

White MC, Etzel RA, Wilcox WD, Lloyd C (1994). Exacerbations of childhood asthma and ozone pollution in Atlanta. *Environ Res* 65: 56-68.

WHO (2005). WHO Air quality guidelines for particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide.

WHO (2008). Asthma [en ligne]

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs307/en/index.html>

Williams CM, Galli SJ (2000). The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 105(5): 847-59.

Wilson BJ (2008). Does GATA3 act in tissue-specific pathways? A meta-analysis-based approach. *J Carcinog* 7:6.

Xia T, Korge P, Weiss JN, Li N, Venkatesen MI, Sioutas C, Nel A (2004). Quinones and aromatic chemical compounds in particulate matter induce mitochondrial dysfunction: implications for ultrafine particle toxicity. *Environ Health Perspect* 112: 1347-1358.

Xia T, Kovochich M, Brant J, Hotze M, Sempf J, Oberley T, Sioutas C, Yeh JJ, Wiesner MR, Nel AE (2006). Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. *Nano Lett* 6: 1794-1807.

- Xiao GG, Wang M, Li N, Loo JA, Nel AE (2003). Use of proteomics to demonstrate a hierarchical oxidative stress response to diesel exhaust particle chemicals in a macrophage cell line. *J Biol Chem* 278: 50781–50790.
- Yamashita H, Kaneyuki T, Tagawa K (2001). Production of acetate in the liver and its utilization in peripheral tissues. *Biochim Biophys Acta* 1532(1-2): 79-87.
- Yang Q, Chen Y, Shi Y, Burnett RT, McGrail KM, Krewski D (2003). Association between ozone and respiratory admissions among children and the elderly in Vancouver, Canada. *Inhal Toxicol* 15(13): 1297-308.
- Yost BL, Gleich GJ, Jacoby DB, Fryer AD (2005). The changing role of eosinophils in long-term hyperreactivity following a single ozone exposure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289: L627-L635.
- Zosky GR, Sly PD (2007). Animal models of asthma. *Clin Exp Allergy* 37(7): 973-88.
- Zuskin E, Bouhuys A, Sarić M (1981). Lung function changes by ethanol inhalation. *Clin Allergy* 11(3):243-8.

ANNEXE 1

Niveaux d'endothéline plasmatique mesurée par « Matrix-assisted laser desorption / ionisation-time of flight » (MALDI-TOF), une méthode de spectrométrie de masse utilisée couramment pour déterminer les niveaux d'oligonucléotides. Les animaux ont été exposés aux contaminants à 1 ppm d'ozone durant trois jours (4 h/d), soit la journée de la provocation à l'ovalbumine, la journée suivant la provocation et deux jours suivant la provocation, c'est-à-dire immédiatement avant les BAL (les animaux ont été sortis de la chambre d'inhalation au terme des 4 heures d'exposition à l'ozone et immédiatement anesthésiés pour effectuer les BAL).

