

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Institut Armand-Frappier

INTERACTION DES NANOPARTICULES D'OR DE 20 NM ET 70 NM SUR LES NEUTROPHILES HUMAINS

Par
Claudie Noël

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maître es Sciences, M.Sc.
en sciences expérimentales de la santé

Jury d'évaluation

Examineur externe	Dr L'Hocine Yahia Polytechnique Montréal
Examineur interne	Dr Jacques Bernier INRS-Institut Armand-Frappier
Directeur de recherche	Dr Denis Girard INRS-Institut Armand-Frappier

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je voudrais remercier mon directeur de recherche, le Dr Denis Girard sans qui je n'aurais pu vivre cette expérience. Je tiens à le remercier pour tout son soutien, ses idées, sa compréhension, sa confiance, sa disponibilité et son aide tout au long de ma maîtrise. Il a été pour moi un bon conseiller autant d'un point de vue scientifique que personnel.

Je tiens également à remercier mes collègues de travail Francis V, Isabelle, Rafael S., Jean-Christophe, Yannick, Valérie, Rafael D., Kim, Dave, Michèle, Francis A. avec qui j'ai passé de très bons moments. Merci à vous tous pour vos conseils et votre support : je n'aurais pu me retrouver au sein d'un meilleur groupe. Vous êtes devenus ma deuxième famille. Je conserve de mon expérience à l'institut de très bons souvenirs.

Je voudrais remercier ma famille qui malgré la distance m'a toujours appuyée dans mon cheminement en m'apportant aide et soutien.

Un merci tout spécial à mon compagnon de vie Gabriel qui a toujours été là pour moi autant dans mes bons moments que dans les moins bons.

RÉSUMÉ

Les nanoparticules (NP) sont de plus en plus utilisées dans la fabrication de produits d'usage quotidien. Des études ont montré que les NP sont en mesure d'atteindre le sang et d'interagir avec diverses cellules immunitaires. Un des effets toxiques fréquemment associé à ce type d'agent est l'induction de l'inflammation. Toutefois, l'impact des NP sur les neutrophiles, des cellules clés dans l'inflammation, est encore méconnu. Les neutrophiles sont connus pour se diriger spontanément en apoptose. Pendant ce processus, plusieurs modifications surviennent comme l'activation des caspases et la réorganisation du cytosquelette. Nous avons précédemment démontré que certaines protéines du cytosquelette, dont la vimentine et la lamine B1, ainsi que les deux protéines membranaires d'ancrage de liaison à l'actine, l'ezzrine et la moésine, sont clivées et exprimées à la surface cellulaire des neutrophiles apoptotiques. Récemment, nous avons constaté que certaines NP, y compris les NP d'argent (AgNP), peuvent réguler l'apoptose du neutrophile humain en fonction de leur diamètre initial. Puisque le mode d'action des NP sur ces cellules n'est pas entièrement défini, nous avons entrepris cette étude pour déterminer l'effet des NP d'or (AuNP) sur les neutrophiles humains, en plus de déterminer si leur diamètre influence cet effet. Nous avons démontré que les AuNP à des diamètres de 20 et 70 nm engendrent une augmentation de l'apoptose du neutrophile par les caspases. Cette apoptose peut être initiée par le stress du réticulum endoplasmique. De plus, les AuNP conduisent à la dégradation de la gelsoline, la vimentine, la vinculine et la lamine B1, mais aucune de ces protéines ne semble être exprimée à la surface cellulaire. Sachant que les AuNP représentent des candidats intéressants dans le traitement d'une variété de maladies, notre projet permet de mieux comprendre le mode d'action de ces particules envers une cellule immunitaire importante dans l'inflammation.

Mots clés : nanoparticule d'or, neutrophile, apoptose, caspases, cytosquelette

ABSTRACT

Nanoparticles (NP) are being increasingly used in the manufacture of daily's products. Studies have shown that nanoparticles are able to reach the blood and interact with various immune cells. A toxicological effect frequently associated with this type of agent is induction of inflammation. However, the impact of NP on neutrophils, a key cell in inflammation, is still unknown. Neutrophils are known to spontaneously undergo apoptosis. During this process, several changes occur, including caspase activation and cytoskeletal reorganization. We have previously demonstrated that some cytoskeletal proteins, including vimentin and lamin B1, and two membrane proteins binding to anchoring actin, ezrin and moesin, are cleaved and expressed on the cell surface of apoptotic neutrophils. Recently, we found that silver NP (AgNP) can regulate apoptosis of human neutrophils according to their initial diameter. Because the mode of action of NP on neutrophils is not fully understood, we initiated this study to determine the effect of gold nanoparticles (AuNP) on human neutrophils. We demonstrated that the AuNP with a diameter of 20 and 70 nm induce neutrophil apoptosis by the activation of caspases. This apoptosis may be initiated by the endoplasmic reticulum stress-induced cell apoptotic pathway. In addition, AuNP lead to the degradation of gelsolin, vimentin, vinculin and lamin B1, but none of these proteins appear to be expressed on the cell surface of apoptotic neutrophils. Knowing that AuNP represent interesting candidates in the treatment of a variety of diseases our project is to better understand the mode of action of these particles on a key cell of the inflammation.

Keywords: Gold nanoparticles, neutrophils, apoptosis, caspases, cytoskeleton

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	1
SECTION 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE	3
CHAPITRE 1 : LES NANOPARTICULES (NP)	4
1.1 DEFINITIONS.....	4
1.2 VOIES D'EXPOSITION.....	6
1.3 CARACTERISTIQUES INFLUENÇANT LA NANOTOXICITE.....	8
1.3.1 <i>Composition chimique</i>	8
1.3.2 <i>Taille</i>	8
1.3.3 <i>Surface de contact</i>	9
1.3.4 <i>Charge de surface</i>	9
1.3.5 <i>Molécules de surface</i>	10
1.3.6 <i>Interaction avec le milieu biologique</i>	10
1.4 NANOPARTICULES ET L'INFLAMMATION.....	11
1.5 LES NANOPARTICULES D'OR.....	13
1.5.1 <i>L'internalisation des nanoparticules d'or</i>	14
1.5.2 <i>Les nanoparticules d'or et l'inflammation</i>	15
1.5.3 <i>Les nanoparticules d'or et la cytotoxicité</i>	16
1.5.4 <i>Les nanoparticules d'or et le cytosquelette</i>	17
CHAPITRE 2 : SYSTÈME IMMUNITAIRE, INFLAMMATION ET NEUTROPHILE	19
2.1 LE SYSTEME IMMUNITAIRE.....	19
2.2 L'INFLAMMATION.....	19
2.3 LES NEUTROPHILES.....	21
2.3.1 <i>Différenciation</i>	21
2.3.2 <i>Recrutement des neutrophiles au site inflammatoire</i>	22
2.3.3 <i>Dégranulation</i>	23
2.3.4 <i>Phagocytose</i>	24
2.3.5 <i>Production de dérivés réactifs de l'oxygène</i>	25
2.3.6 <i>Production de cytokines</i>	26
2.3.7 <i>Apoptose</i>	26
2.3.8 <i>Régulation de l'apoptose</i>	29
CHAPITRE 3 : CYTOSQUELETTE	31
3.1 ROLE.....	31
3.1.1 <i>Microfilaments</i>	32
3.1.2 <i>Microtubules</i>	32

3.1.3	<i>Filaments intermédiaires</i>	33
3.2	IMPLICATION DU CYTOSQUELETTE DANS L' APOPTOSE	33
SECTION 2 : ARTICLE		35
SECTION 3: DISCUSSION ET CONCLUSION		69

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Liste des figures

FIGURE 1 : VOIES D'EXPOSITION DE L'HOMME AUX NANOPARTICULES ET LEUR DEVENIR (MODIFIEE DE BUZEA, PACHECO ET COLL. 2007).....	7
FIGURE 2 : MALADIES ASSOCIEES A L'EXPOSITION AUX NANOPARTICULES (INSPIREE DE BUZEA, PACHECO ET AL. 2007).....	11
FIGURE 3 : VOIES DE L'APOPTOSE CHEZ LES NEUTROPHILES (INSPIREE DE (LUO ET AL., 2008)).....	28
FIGURE 4 : DESORDRES CAUSES PAR UNE MAUVAISE REGULATION DE L'APOPTOSE (INSPIREE DE D. GIRARD, 2003).....	30
FIGURE 5 : COMPOSITION DES PROTEINES DU CYTOSQUELETTE.....	31

Liste des tableaux

TABLEAU 1 : PRINCIPALES SOURCES DE NANOPARTICULES (INSPIRE DE OBERDORSTER, OBERDORSTER ET AL. 2005).....	4
--	---

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AgNP	Nanoparticule d'argent
APAF1	<i>Apoptotic protease activation factor 1</i>
ATF6	Activateur du facteur de transcription 6
ATP	Adénosine triphosphate
AuNP	Nanoparticule d'or
BPI	<i>Bactericidal/permeability-increasing protein</i>
CR1	Récepteur du complément de type 1
DAMP	Motifs moléculaires associés aux dégâts cellulaires
DISC	Complexe signalétique inducteur de mort
FasR	Récepteur Fas
G-CSF	Facteur de stimulation des colonies de granulocytes
GM-CSF	Facteur de stimulation des colonies de granulocytes et macrophages
GRO- α	<i>Growth-regulated protein alpha</i>
H ₂ O ₂	Peroxyde
HOCl	Acide hypochloreux
ICAM	Molécules d'adhésion intracellulaire
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IP-10	<i>IFN-γ-inducible protein 10</i>
IRE-1	Enzyme inositol-dépendante-1
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
M-CSF	Facteur de stimulation des colonies de macrophages
MIP-1 α	<i>Macrophage inflammatory protein 1-alpha</i>
MMP-8	Matrix métalloprotéinase-8
MMP-9	Matrix métalloprotéinase-9
MPO	Myéloperoxydase
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NETs	Pièges extracellulaires du neutrophile
NF- κ B	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
NLR	Récepteur NOD -like

NO	Oxyde nitrique
NP	Nanoparticule
O ₂ ⁻	Ion superoxyde
PAMP	Motifs moléculaires associés aux pathogènes
PEG	Polyéthylène glycol
PERK	Kinase du réticulum similaire à PKR
PI3K	Phosphatidylinositol -3 — kinases
P-selectinL1	<i>P-selectin glycoprotein ligand 1</i>
RLR	Récepteur RIG-like
ROS	Dérivés réactifs de l'oxygène
SRC	<i>Sarcome tyrosine kinase</i>
Syk	<i>Spleen tyrosine kinase</i>
TGF-β	Facteurs de croissance transformant bêta
TiO ₂	Dioxyde de titane
TLR	Récepteur Toll -like
TNF-R	Récepteur du facteur de nécrose tumoral
TNF-α	Facteur de nécrose tumorale alpha
TRAIL-R	<i>Receptor tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand</i>
UPR	<i>Unfolded protein response</i>
VAA-I	<i>Viscum album</i> agglutinin-I
VCAM	Molécules d'adhésion cellulaire vasculaire
ZnO	Oxyde de zinc

INTRODUCTION

Les nanoparticules (NP) sont déjà utilisées dans de nombreux objets de la vie quotidienne. Dans un avenir prochain, elles pourraient même être utilisées en médecine (Arvizo *et al.*, 2010, Parida *et al.*, 2012). En effet, les nanoparticules d'or (AuNP), par exemple, ont des caractéristiques intéressantes pour la détection et le traitement de certains types de cancers (Almeida *et al.*, 2014, Bhattacharyya *et al.*, 2011). Malgré ces propriétés bénéfiques, il demeure important de connaître tous leurs effets sur les différents systèmes du corps, d'où l'importance de la nanotoxicologie qui étudie la toxicité des nanomatériaux et des NP sur la santé. À ce jour, la plupart des études sur les effets des AuNP portent sur leurs interactions dans des modèles *in vivo* ou des lignées cellulaires (Arvizo *et al.*, 2010, Ilaria Fratoddi 2014). Il semble important de connaître l'impact de ces NP sur le système immunitaire inné plus particulièrement sur les neutrophiles, les premières cellules présentes au foyer inflammatoire. De plus, la grosseur des NP influence leur comportement dans le corps, comme dans le cas du TiO₂ à des diamètres de 20 et 250 nm dans les voies respiratoires. Des expériences réalisées *in vivo* ont montré que lors d'inhalation, les plus petites particules ont tendance à se retrouver plus loin dans l'arbre respiratoire et causer une plus grande inflammation pulmonaire (Oberdorster *et al.*, 1994). Cependant, peu d'études montrent l'impact du diamètre des NP aux niveaux cellulaires, un paramètre qui peut être très important.

Chez l'humain, les neutrophiles sont les leucocytes observés en plus grand nombre dans la circulation sanguine. Ils ont un rôle important à jouer lors de l'inflammation. Par exemple, ils permettent d'éliminer les agents infectieux par la phagocytose. Afin de s'assurer de maintenir l'homéostasie, le nombre de neutrophiles doit être contrôlé. Ainsi, les neutrophiles entrent spontanément en apoptose, une mort cellulaire programmée. Si cette fonction est influencée à la hausse ou à la baisse par différents agents, divers désordres responsables de certaines maladies peuvent en résulter. Lors de l'apoptose, des protéases vont cliver diverses protéines du neutrophile et engendrer la mort de celui-ci.

L'étude des protéines du cytosquelette, un réseau complexe de filaments dans la cellule, permet de mieux comprendre la physiologie cellulaire. Ces protéines sont parmi les premières à être dégradées lors de l'apoptose. Dans notre laboratoire, nous avons montré que certaines protéines, comme la vimentine, sont clivées lors de l'apoptose puis exposées à la surface de la cellule (Lavastre *et al.*, 2005, Lavastre *et al.*, 2002, Moisan *et al.*, 2006). Elles représentent un bon indice précoce de la mort imminente du neutrophile.

Le projet décrit dans ce mémoire présente les effets des AuNP de diamètres respectifs de 20 nm et 70 nm sur l'apoptose des neutrophiles. Comme mentionné précédemment, la régulation de l'apoptose est intimement liée au maintien de l'homéostasie et à la prévention de divers types de maladies. L'observation de la réorganisation des protéines du cytosquelette sera également abordée.

L'objectif de ce mémoire est de déterminer l'effet des AuNP sur le comportement des neutrophiles humains, donc de voir si ces NP ont un effet sur la morphologie, l'apoptose et les protéines du cytosquelette. Sachant que les AgNP créent des réactions différentes lors de l'apoptose chez les neutrophiles selon leur diamètre respectif (Poirier *et al.*, 2014), notre hypothèse est qu'il serait possible de croire que les AuNP pourraient réagir de la même manière, c'est-à-dire qu'elles auraient un effet différentiel selon leur diamètre. De plus, lors de l'apoptose, certaines protéines du cytosquelette sont dégradées puis exprimées à la surface du neutrophile. Nous croyons que cet effet sera induit lors de l'apoptose créée par les NP.

Lors de cette étude, nous avons observé une induction de l'apoptose des neutrophiles lorsqu'ils étaient mis en contact avec les AuNP à 20 et 70 nm, sans toutefois voir une différence entre ces deux diamètres. L'implication de diverses caspases ainsi que de protéines impliquées dans la voie du stress du réticulum endoplasmique a été constatée. En ce qui concerne les protéines du cytosquelette, il y a eu effectivement une dégradation de certaines protéines, cependant celles-ci n'étaient pas exprimées à la surface des cellules apoptotiques.

Les travaux de ce mémoire, en plus d'apporter de nouvelles informations par rapport au comportement des NP avec les neutrophiles, aident à comprendre que les effets des NP sont propres à leurs caractéristiques physicochimiques respectives. De plus, nos résultats permettent d'acquérir de nouvelles connaissances scientifiques par rapport aux agents pouvant induire l'apoptose des neutrophiles ainsi que leur impact sur certaines protéines du cytosquelette.

SECTION 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE

CHAPITRE 1 : LES NANOPARTICULES (NP)

1.1 Définitions

Il est possible de retrouver dans la littérature diverses définitions du terme NP. Cependant, les organismes de standardisation s'entendent pour définir les NP comme suit : tous matériaux ayant 1 à 100 nm pour ses trois dimensions. Les NP peuvent être produites de manière naturelle, soit dans l'air, la fumée ou les aérosols d'eau, ou de manière non « naturelle », appelée anthropogénique. La production anthropogénique peut être intentionnelle ou non. Par exemple, la congélation de produits ou la coupe de métaux en industries constituent des sources non intentionnelles de production de NP (voir tableau 1) (Buzea *et al.*, 2007, Oberdorster *et al.*, 2005).

Tableau 1 : Principales sources de nanoparticules (Inspiré de Oberdorster, Oberdorster et al. 2005)

Sources		
Naturelles	Anthropogéniques	
	Non intentionnelles	Intentionnelles
Conversion gaz/particules	Combustion des moteurs	Nanomatériaux manufacturés :
Feux de forêt	Centrales électriques	Nanoparticules,
Lave de volcan	Incinérateurs	Nanotubes,
Virus	Avions	Nanofilms,
Ferritine	Fritures, grillades	Métaux, carbone, oxyde métallique

Le terme nanotechnologie fût employé pour définir la production et l'utilisation volontaire de NP. Depuis plusieurs années, ce domaine est en pleine expansion. En effet, des milliers de NP sont produites dans divers domaines : alimentaire, électronique, biomédical, etc. L'échelle nanométrique procure des propriétés uniques à ces particules en influençant entre autres leurs caractéristiques physiques comme la température de fusion, la réactivité chimique, la réactivité biologique, la conductivité électrique et les propriétés fluorescentes. La modification de leurs propriétés s'explique par deux facteurs : leur plus grande surface de contact et le fait que ces particules sont soumises aux forces de la physique classique et quantique (Agency, 2009, Engineering, 2004, Technology, 2014).

D'abord, puisque les NP sont plus petites, l'aire de surface par unité de masse est grande. En effet, plus une particule est petite, plus son aire de surface par unité de masse va augmenter. Ainsi, dans un contexte biologique, une cellule peut être en contact avec bien plus de particules nanoscopiques que macroscopiques pour une même quantité d'unité de masse (Engineering, 2004, Ostiguy *et al.*, 2008, Roduner, 2006, Simon-Deckers, 2008). Les seconds facteurs qui peuvent influencer les caractéristiques des NP sont les forces de la physique. À l'échelle nanométrique, une particule peut être soumise à deux types de forces physiques : les forces classiques, comme la gravité, l'électrostatique, les forces Van der Waals, etc., et les forces quantiques tel le comportement des atomes. Pour des objets de plus grandes tailles, seules les forces de la physique classique s'appliquent. La force quantique est un ensemble de puissances qui agissent sur les objets dont la taille se situe autour de 10^{-9} mètres comme l'ADN. Les NP se situent à la limite des deux types de forces (Agency, 2009, Engineering, 2004, Roduner, 2006, Simon-Deckers, 2008). Puisque la surface de contact par unité de masse ainsi que les types de physiques auxquelles répondent les NP varient par rapport à la taille des particules, il est difficile de prévoir le mode d'action des NP malgré les connaissances obtenues à d'autres échelles métriques (Roduner, 2006).

Les NP sont retrouvées dans divers produits utilisés sur une base quotidienne. Cependant, l'utilisation des NP n'est pas encore réglementée (Agency, 2009, Kessler, 2011, Ostiguy *et al.*, 2008). Ainsi, les industries n'ont pas l'obligation d'inscrire sur leurs produits la présence et la quantité de NP utilisée. De plus, il n'existe aucun moyen fiable de mesurer la présence de celles-ci dans l'environnement. Puisque les effets sur la santé de l'utilisation de ces particules à court et à long terme sont encore méconnus, il devient impératif de s'y intéresser. C'est pourquoi une nouvelle branche en toxicologie fut créée : la nanotoxicologie. La nanotoxicologie est l'évaluation des risques que posent tous les matériaux à l'échelle nanométrique sur les organismes vivants (Donaldson *et al.*, 2004, Oberdorster *et al.*, 2005). Le nombre d'études en nanotoxicologie ne cesse d'augmenter afin de permettre le développement sécuritaire de l'utilisation des NP.

Ce chapitre présente les diverses voies d'exposition et les facteurs qui peuvent influencer l'action des NP. Les effets observés lors de l'exposition des NP dans l'inflammation ainsi que l'action des AuNP seront aussi abordés.

1.2 Voies d'exposition

Il existe plusieurs types de voies d'exposition par lesquelles l'homme peut être en contact avec les NP (voir figure 1).

Tout d'abord, la principale responsable de la présence de ces petites particules dans le sang est l'inhalation (Berry *et al.*, 1977). En effet, après l'inhalation, les NP se retrouveront dans les poumons et plus particulièrement dans la région alvéolaire où elles pourront migrer vers la circulation sanguine (Buzea *et al.*, 2007, Donaldson *et al.*, 2004, Ostiguy *et al.*, 2008, Simon-Deckers, 2008). Les NP peuvent être retrouvées dans divers composés inhalés : la fumée, l'évaporation, la poussière, le sable, le « smog », les gaz d'échappement, etc. Lors d'épisodes importants de pollution, il est possible de retrouver jusqu'à 3 000 000 particules par millilitre dans l'air comparativement à un taux normal se situant entre 5000 à 10 000 particules par millilitre. En 1999, une importante présence de NP, soit plus de 1.45×10^{11} particules par millilitre fut enregistrée dans l'air de la Californie. La localisation du prélèvement influence le nombre de particules et la composition de celles-ci. Par exemple, le nombre de particules est beaucoup plus important dans les déserts surtout lors de périodes de tempêtes (Buzea *et al.*, 2007). La seconde voie d'exposition est le contact avec la peau. Certaines lotions et certains vêtements peuvent contenir des NP menant à une exposition cutanée. Par contre, les NP vont rarement atteindre le système sanguin par cette voie. En effet, les couches dermiques jouent un rôle de barrière. Toutefois, les pores folliculaires ou des lésions à la surface de la peau peuvent permettre l'entrée des NP dans la circulation sanguine (Buzea *et al.*, 2007, Cross *et al.*, 2007, Simon-Deckers, 2008). Un troisième moyen permettant aux particules d'entrer dans le système est l'ingestion. Les NP peuvent être retrouvées dans les produits alimentaires, pharmaceutiques, dans l'eau, dans les particules inhalées qui se retrouvent dans la gorge ou même lors du bris de prothèse dentaire. Dans les régions développées, un être humain peut ingérer en moyenne 10^{12} NP par jour, il est même possible d'augmenter de quarante fois cette dose lors de l'utilisation de produits renfermant des NP qui sont blanchissantes (Buzea *et al.*, 2007). La plupart des NP sont éliminées dans les fèces ou dans l'urine, mais certaines parviennent à traverser la barrière gastro-intestinale et se retrouvent alors dans la circulation sanguine (Bergin *et al.*, 2013). Les NP peuvent également être directement injectées dans le sang lorsqu'elles sont utilisées comme agent de livraison pour un médicament ou pour l'imagerie de tumeurs. Pour chacune des voies d'exposition, le nombre de NP qui réussira à atteindre la circulation sanguine varie selon différentes caractéristiques de la NP : grosseur, forme, charge de surface, etc. (Buzea *et al.*, 2007, Simon-Deckers, 2008).

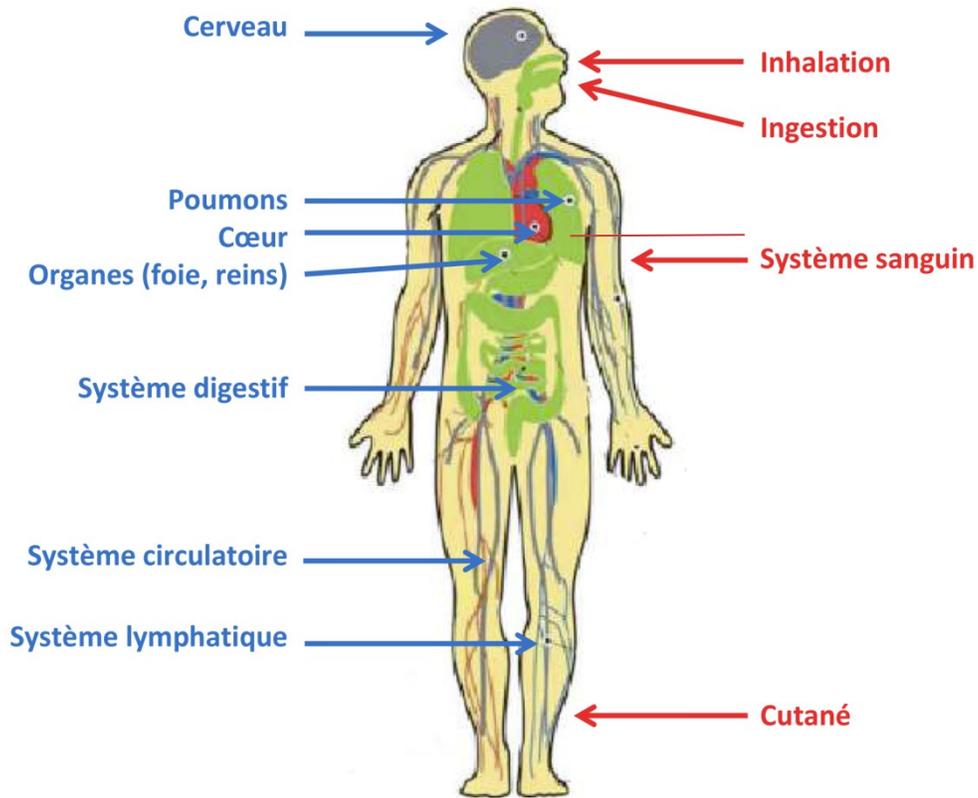


Figure 1 : Voies d'exposition de l'homme aux nanoparticules et leur devenir (modifiée de Buzea, Pacheco et coll. 2007).

L'homme peut se retrouver en contact avec les NP par divers moyens. Les voies d'exposition qui permettent l'entrée des NP dans la circulation sanguine sont l'inhalation, l'ingestion, la peau et les injections intraveineuses (représentées en rouge). Une fois dans le sang, les NP peuvent s'accumuler dans divers endroits dans le corps (représentés en bleu) ou être éliminées.

Lorsque les NP se retrouvent dans le sang, elles peuvent être diffusées dans divers organes et même s'y accumuler (voir figure 1). Dans le sang, les NP peuvent également interagir avec les cellules présentes étant donné leur taille similaire à celle des constituants cellulaires. L'interaction des cellules sanguines avec les NP peut causer la formation de caillots sanguins, de l'inflammation et des thromboses (Buzea *et al.*, 2007, Nemmar *et al.*, 2002). De plus, autant dans le sang que dans les ganglions lymphatiques, les NP vont être en contact avec les cellules du système immunitaire (Buzea *et al.*, 2007, Yen *et al.*, 2009, Zolnik *et al.*, 2010). Puisque ces cellules ont un rôle important à jouer dans la protection du corps, il s'impose de connaître l'effet des NP sur celles-ci.

1.3 Caractéristiques influençant la nanotoxicité

Les analyses toxicologiques permettent de vérifier l'impact d'un produit sur les systèmes vivants. Dans le cas des NP, il faut tenir compte des propriétés physicochimiques afin de connaître l'impact d'une particule précise. La composition chimique, la taille, la surface de contact, le nombre de particules, la charge à la surface, les molécules de surface, l'interaction avec le milieu biologique, et bien sûr la dose peuvent influencer la toxicité d'une particule. Il est difficile de déterminer si une caractéristique a un effet plus important qu'une autre (Buzea *et al.*, 2007, Hubbs *et al.*, 2013, Oberdorster *et al.*, 2005). C'est pourquoi il est primordial de connaître les effets d'une NP précise et de ne pas présumer que les effets seront tous semblables pour les NP ayant des caractéristiques similaires.

1.3.1 Composition chimique

Les NP peuvent être créées à partir de divers composés chimiques. En effet, il existe une grande variété de composés pouvant constituer les NP : des métaux comme l'or ou l'argent, des composés à base de carbone ou même des assemblages de groupements chimiques tels les dendrimères (Agency, 2009, Simon-Deckers, 2008). Dans plusieurs études, il est possible de voir une différence de toxicité entre deux types de NP utilisés dans des conditions semblables. Par exemple, lors de tests réalisés sur des cellules endothéliales, il a été montré que les NP d'oxyde de zinc (ZnO) étaient plus toxiques par rapport à celles de carbone ou de dioxyde de titane (TiO₂) (Mikkelsen *et al.*, 2013). De plus, chaque composé chimique possède des caractéristiques qui lui sont propres : l'or ne s'oxyde pas contrairement à l'argent. La nature de la NP est donc le premier élément à prendre en considération en ce qui a trait à son innocuité chez l'humain (Bhattacharyya *et al.*, 2011).

1.3.2 Taille

La taille des NP peut également faire varier le mécanisme d'action des NP. En effet, les particules plus petites ont tendance à avoir des effets inflammatoires plus importants (Buzea *et al.*, 2007, Donaldson *et al.*, 2004, Pan *et al.*, 2007). Notre laboratoire a démontré que la taille pouvait influencer les effets des NP sur les neutrophiles humains. Les AgNP d'un diamètre de 20 nm ont un effet pro-inflammatoire tandis que ces mêmes NP à 70 nm de diamètre induisent une réaction anti-inflammatoire (Poirier *et al.*, 2014). Des expériences réalisées *in vivo* ont

montré que lors d'inhalation de TiO_2 de 20 et 250 nm, les plus petites particules causaient une plus grande inflammation pulmonaire (Oberdorster *et al.*, 1994). Il est possible que les NP de petites tailles (<100 nm) aient une plus grande influence dans un système puisqu'elles peuvent plus facilement se diriger vers le sang à partir des poumons, atteindre les ganglions lymphatiques ou même pénétrer les membranes cellulaires. En outre, les plus grosses particules courent un risque accru d'être détectées et éliminées par les phagocytes, plus particulièrement les macrophages (Buzea *et al.*, 2007, Peters *et al.*, 2006).

1.3.3 Surface de contact

La taille influence également la surface de contact qui peut agir sur la toxicité. En effet, les plus petites NP ont une plus grande surface de contact permettant alors une plus grande capacité d'interaction avec les molécules biologiques : pour une même masse de NP, les NP de plus petites tailles vont se retrouver en plus grand nombre ce qui va également permettre une plus grande interaction avec les cellules. Il fut ainsi démontré qu'une plus grande surface de contact augmentait la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) ainsi que les dommages causés à l'ADN (Donaldson *et al.*, 2003, Risom *et al.*, 2005). Il est à noter que l'utilisation de NP de différents grosseurs employées à des concentrations différentes afin d'avoir un ratio de surface de contact avec les molécules biologiques similaires présente des résultats semblables démontrant que ce facteur est très important à prendre en considération lors d'études nanotoxicologiques (Engineering, 2004, Roduner, 2006).

1.3.4 Charge de surface

La charge de surface d'une NP peut provenir de sa composition chimique ou lui être ajoutée grâce à des molécules à la surface. La charge influence l'action des NP envers les cellules : elles peuvent se repousser davantage à cause des charges ou même s'attirer. Une charge positive en surface des NP permet aux particules d'interagir avec des composantes de charges négatives de la cellule, comme l'ADN. L'inverse est observé avec les particules négatives qui vont interagir avec des composantes positives telle la surface cellulaire. Ces interactions peuvent alors faire varier le comportement des cellules avec lesquelles les NP sont en contact et causer des effets totalement différents. Par exemple, les NP chargées positivement peuvent provoquer un caillot sanguin lorsqu'elles vont être en contact avec les plaquettes. Tandis que celles chargées négativement vont avoir un effet inverse et diminuer les thromboses ou caillots

créés. La prise d'une mesure, appelée potentiel Zeta, peut être envisagée pour détecter la charge de surface d'une NP (Buzea *et al.*, 2007, Donaldson *et al.*, 2004, Simon-Deckers, 2008).

1.3.5 Molécules de surface

Les protéines et biomolécules contenues dans l'environnement d'une NP peuvent se lier à la particule et lui offrir de nouvelles caractéristiques. Par exemple, lors de la présence de sérum, les NP peuvent se lier avec les protéines qu'il contient. Cette couche formée à la surface porte le nom de corona (Agency, 2009, Borregaard *et al.*, 1997). En laboratoire, il est également possible d'ajouter des molécules à la surface des NP afin de lui conférer un nouvel effet. Par exemple, lors de l'imagerie, il est possible de coupler des anticorps à la surface des AuNP (Arvizo *et al.*, 2010, Fratoddi *et al.*, 2014, Gerber *et al.*, 2013). Cependant, à la suite de l'internalisation des NP, les éléments chimiques retrouvés à la surface peuvent se retrouver modifiés. La présence d'oxygène ou de métal de transition sur la surface de la NP peut mener à la création de ROS. Par exemple, il fut montré que les particules de ferrite de nickel ne sont pas cytotoxiques, mais le deviennent lorsque de l'acide oléique est retrouvé à leur surface (Donaldson *et al.*, 2003, Risom *et al.*, 2005). Dans certains cas, des éléments seront ajoutés à la surface des NP afin de les rendre moins toxiques, comme c'est le cas avec des boîtes quantiques de séléniure de cadmium (Derfus *et al.*, 2004). Puisque la surface d'une NP est le premier élément en contact avec les cellules, il s'agit d'un facteur qu'il ne faut pas négliger.

1.3.6 Interaction avec le milieu biologique

Afin de comprendre le mode d'action d'une NP, il est important de tenir compte des différentes conditions biologiques dans lesquelles elle peut se retrouver. Dans un milieu biologique, la solution de NP peut subir divers phénomènes telles l'agrégation, la dissolution, l'absorption de protéine et d'ions (Monopoli *et al.*, 2012). Ces phénomènes peuvent changer totalement les caractéristiques de la NP comparées à la solution stock. C'est pourquoi il faut toujours s'assurer d'analyser une NP dans un environnement imitant autant que possible celui dans lequel elle est utilisée. Il faut également s'assurer que les caractéristiques physicochimiques soient les mêmes tout au long des études car un simple changement peut avoir de grandes répercussions sur la toxicité de la NP (Buzea *et al.*, 2007, Monopoli *et al.*, 2012).

1.4 Nanoparticules et l'inflammation

Les NP peuvent avoir divers effets sur la santé, autant positifs que négatifs (voir figure 2). Il est à noter que plusieurs des effets néfastes sont liés à l'inflammation. Il existe deux réponses du système immunitaire face à la présence des NP : une immunostimulation ou une immunodéficience (Zolnik *et al.*, 2010).

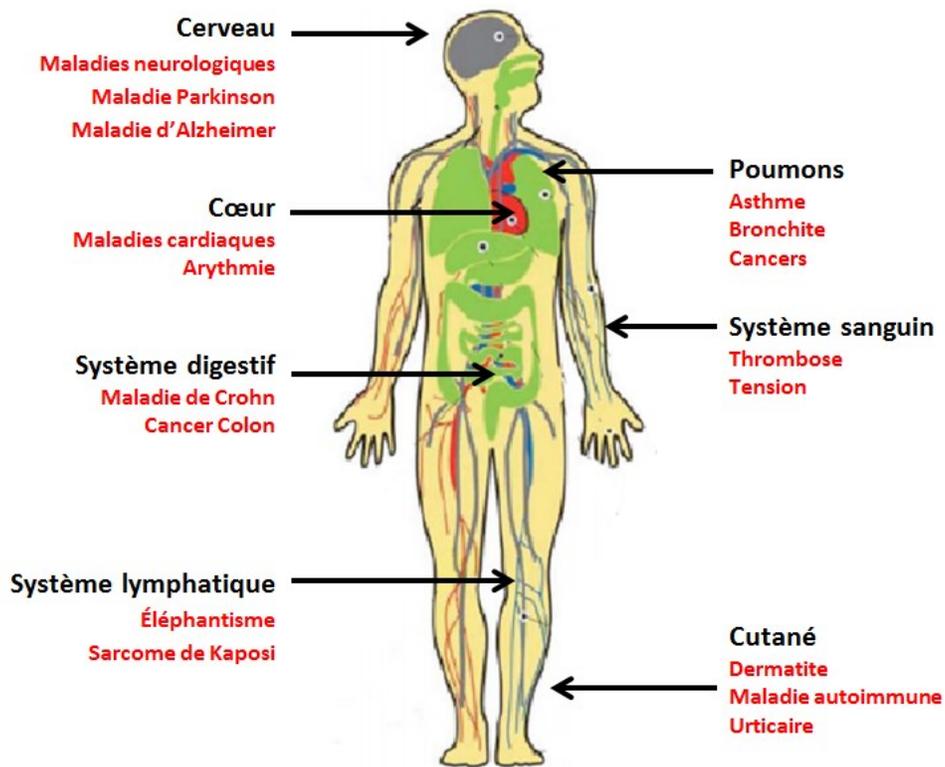


Figure 2 : Maladies associées à l'exposition aux nanoparticules (inspirée de Buzea, Pacheco et al. 2007).

Une fois dans le système, les NP peuvent induire divers effets selon l'endroit où elles vont se retrouver. La plupart des maladies détectées sont liées à l'inflammation.

Une immunosuppression correspond à une diminution de la réponse immunitaire. Face à une infection ou dans un cas de cancer, cela peut s'avérer néfaste. Par exemple, lors d'un cancer, le système immunitaire va être affaibli pour permettre la progression de la tumeur et l'évolution de métastases (Janeway *et al.*, 2009, Kim *et al.*, 2006). Le corps devient alors incapable de se protéger et la maladie ou l'infection s'amplifie pouvant même conduire jusqu'à la mort. Dans le cas des allergies, de maladies auto-immunes ou des rejets de greffes, la diminution de

l'efficacité du système est souhaitée. En effet, dans ces situations, les cellules du système immunitaire attaquent les composantes du soi et causent des dommages importants. Différentes études ont démontré l'induction de l'immunosuppression par les NP. Par exemple, les nanotubes de carbone, lorsqu'ils sont inhalés, peuvent induire une diminution de la fonction des lymphocytes B ainsi que l'expression de facteurs de croissance transformant bêta (TGF- β) par les macrophages alvéolaires (Mitchell *et al.*, 2009). Cet effet diminue l'efficacité du corps à combattre lors d'infection. Un autre exemple est les NP d'acide polylactique qui peuvent créer une immunosuppression. Cette propriété pourrait en faire de bons candidats pour le traitement de l'arthrite, une maladie impliquant une surstimulation des neutrophiles dans les joints articulaires (Higaki *et al.*, 2005).

Les NP peuvent également induire une immunostimulation c'est-à-dire une activation de la réponse immunitaire. Cette surstimulation peut s'avérer nocive lorsqu'elle implique l'activation du complément dans la circulation systémique. Le complément permet habituellement d'agir contre les pathogènes, les cellules cancéreuses ou des cellules mortes en favorisant la phagocytose et les destructions (Janeway *et al.*, 2009). Dans le cas d'un cancer, elle permet de réagir contre les tumeurs mais si le complément est suractivé les cellules immunitaires peuvent être modifiées et devenir tolérantes à la présence des cellules mutées permettant ainsi la propagation du cancer (Markiewski *et al.*, 2009). Certaines NP peuvent causer une inflammation de la peau après une application cutanée. C'est le cas de certains types de dendrimères qui peuvent induire des dermatites (Toyama *et al.*, 2008). Des réactions allergiques peuvent également survenir lors de l'inhalation de NP. Des études ont montré que l'utilisation d'un produit mis à l'échelle nanométrique pour le rendre plus efficace entraîne souvent la production de réactions allergiques (Zolnik *et al.*, 2010). D'un aspect plus positif pour la santé, les NP peuvent augmenter l'antigénicité c'est-à-dire la réponse immunitaire contre des antigènes qui habituellement créent une faible réaction. Cet effet permet d'augmenter l'immunisation contre des antigènes qui habituellement pourraient déjouer la défense immunitaire (Pan *et al.*, 2007, Zolnik *et al.*, 2010). Cependant, il faut s'assurer que cette réponse n'est pas contre un antigène du soi pouvant ainsi induire une réponse auto-immune.

Dans le cas de la réaction des NP avec le système immunitaire, il est important de savoir que l'action des NP va être influencée par les diverses propriétés physicochimiques comme discuté précédemment. En effet, la grosseur d'une NP peut déterminer le type de cytokines qui seront sécrétées lors de son interaction avec les cellules, donc quelle réaction inflammatoire sera induite. Bref, l'impact sur la santé de l'effet des NP sur l'immunité est dépendant du contexte; de

la voie d'exposition, des différentes caractéristiques physicochimiques des NP ainsi que de l'état de santé de la personne exposée (Buzea *et al.*, 2007).

1.5 Les nanoparticules d'or

L'or est un métal utilisé principalement pour ses propriétés colorimétriques, mais plusieurs autres caractéristiques le rendent intéressant : ce métal ne s'oxyde pas, il résiste aux divers acides, il est malléable et il permet une très bonne conductibilité thermique et électrique (Bhattacharyya *et al.*, 2011, Parida *et al.*, 2012). Au 5^e siècle av. J.-C., l'or était déjà utilisé pour ses propriétés médicales. En effet, en Égypte et en Chine, une solution d'or était utilisée pour des traitements médicaux. Du Moyen-âge au début du 20^e siècle, cet « or buvable » permettait le traitement de maladies comme l'arthrite, la syphilis, l'épilepsie et même des problèmes cardiaques. De nos jours, l'utilisation des AuNP est prometteuse, particulièrement dans le domaine de la médecine (Bhattacharyya *et al.*, 2011). De manière commerciale, les AuNP sont actuellement utilisées pour des applications catalytiques, électriques et optiques. Cependant, dans un avenir prochain, il serait souhaitable de pouvoir utiliser ces NP pour la détection et le traitement de certains types de cancers ou la livraison de divers médicaments (Arvizo *et al.*, 2010, Sumbayev *et al.*, 2013).

Diverses propriétés rendent l'utilisation des AuNP intéressante. Tout d'abord, celles-ci peuvent être liées à différents ligands, via des thiols ou des amines, afin de permettre la reconnaissance de divers biomarqueurs. Par exemple, il est possible de coupler un anticorps à la surface des AuNP pour cibler la présence d'une protéine précise. Une autre propriété des AuNP : ses capacités optiques. Les AuNP ont une forte opacité qui les rend bien visibles au rayon X, une propriété intéressante pour l'imagerie médicale. De plus, selon le type de groupe fonctionnel à la surface de la particule, plusieurs applications peuvent être obtenues : biosenseur, diagnostic de maladies, expression de gènes, livraison de médicaments, imagerie biologique, régulation de gènes, etc. Les AuNP ont également des capacités photothermiques, c'est-à-dire qu'elles ont la capacité de capter l'énergie de la lumière et de la transformer en chaleur, ce qui en font de bons candidats pour le traitement de certains types de cancers (Arvizo *et al.*, 2010, Bhattacharyya *et al.*, 2011). En effet, grâce à des marqueurs contre les cellules cancéreuses, il serait possible de marquer les AuNP puis, à l'aide d'une source lumineuse, de cibler ces NP pour qu'elles puissent transformer la lumière en chaleur et ainsi tuer les cellules atteintes (Almeida *et al.*, 2014, Arvizo *et al.*, 2010, Hainfeld *et al.*, 2010). Cependant avant de pouvoir utiliser les AuNP sur l'être humain, il est important de comprendre les effets de celles-ci

sur les cellules ainsi que leur comportement dans un milieu biologique complexe. C'est pourquoi des analyses toxicologiques *in vitro* et *in vivo* ont été réalisées à l'aide de différentes AuNP.

1.5.1 L'internalisation des nanoparticules d'or

Tout d'abord, il faut savoir si les NP sont internalisées par les divers types cellulaires. Chez les fibroblastes, les macrophages, les neutrophiles, les monocytes, les cellules dendritiques et la lignée cellulaire Hela, il fut montré que les NP de 14 nm pouvaient être internalisées par les cellules. Une fois dans la cellule, elles ont tendance à se retrouver à l'intérieur de vacuoles. Ces vacuoles n'affectent pas les cellules, mais peuvent s'avérer nocives si elles éclatent (Gosens *et al.*, 2010, Mironava *et al.*, 2010). Chez les NP ayant des diamètres d'environ 15 nm, les NP sont internalisées par phagocytose (Bartneck *et al.*, 2010a). Pour des diamètres d'environ 45 nm, l'internalisation se fait par endocytose via les clathrines (Gosens *et al.*, 2010). Chez les cellules Hela, les NP couvertes de citrate de diamètre avoisinant 50 nm sont les particules internalisées en plus grand nombre, soit environ 500 à 6000 particules par cellule comparé aux mêmes nanoparticules de diamètres de 14 et 75 nm (Chithrani *et al.*, 2006).

Les tests chez les animaux permettent de mieux comprendre le « devenir » d'une NP, c'est-à-dire de connaître les endroits où elle est susceptible de se retrouver et s'accumuler avec le temps dans le corps. Lors de l'injection intraveineuse chez des rats de NP de différentes grosseurs (10, 50, 100 et 250 nm), il est possible de remarquer, après 24 heures d'exposition, une accumulation des NP à différents endroits selon leur taille. Les AuNP de plus petite taille vont avoir tendance à s'accumuler dans les différents tissus et elles ont montré davantage d'effets toxiques que celles plus grosses (De Jong *et al.*, 2008). Chez les souris, les AuNP ont tendance à s'accumuler dans la rate, les reins et le foie. Le pourcentage de NP retrouvé dans les organes varie selon la grosseur des particules. Les coupes histologiques ne montrent aucune lésion aux tissus (Lasagna-Reeves *et al.*, 2010).

Les molécules de surface peuvent également influencer la capacité des NP à être capturées par les cellules. Il est possible d'utiliser le polyéthylène glycol (PEG) pour recouvrir les AuNP, cependant après 6 semaines d'injections intraveineuses chez les souris de ces AuNP, il y a une diminution de l'internalisation des particules comparée aux AuNP non couvertes. Puisque les NP perdent de leur capacité à être internalisées, ce type de NP devient moins intéressant pour l'usage en milieu thérapeutique. Le remplacement de la molécule de PEG par du glutathionne change cet effet. Il offre une bonne internalisation, même à long terme, en plus de ne pas causer de problèmes de santé ou de morbidité (Simpson *et al.*, 2013).

1.5.2 Les nanoparticules d'or et l'inflammation

Parmi les fonctions qui peuvent être altérées par la présence des AuNP et qui sont associées à la réponse de l'immunité innée, notons la régulation de la production de cytokines. Une étude a montré que le contact d'AuNP avec des cellules de la lignée THP-1 induisait une diminution de l'action de l'IL-1 β , une cytokine pro-inflammatoire. Ceci résulte d'une diminution de la production de TNF- α et de l'activation de la voie du phosphatidylinositol -3-kinases (PI3K) (Sumbayev *et al.*, 2013). En prévenant l'action de l'IL-1 β , les NP réduisent l'ampleur de la réponse inflammatoire. Cette action est accrue lorsque les particules ont des diamètres plus petits. Cet effet peut être efficace dans le cas de la persistance d'une inflammation, mais peut s'avérer négatif si la réponse inflammatoire est souhaitée afin de combattre un agent inflammatoire (Sumbayev *et al.*, 2013). Une modification de la réponse immunitaire est également observée lors de tests réalisés chez les cellules dendritiques de souris ayant été mises en contact avec les NP. La réponse immunitaire va être perturbée puisqu'il y aura une diminution des différentes cytokines sécrétées, l'IL-6 et l'IL-12, à la suite d'une stimulation au LPS (Villiers *et al.*, 2010). De plus, d'autres facteurs de la réponse immunitaire peuvent être affectés par la présence de particules d'or. Une diminution de la présentation de certains antigènes va réduire la réaction immune, mais dans le cas présent, cet effet s'avère positif puisque les antigènes produits par les cellules sont des antigènes du soi (Pan *et al.*, 2007). Il reste un grand nombre de fonctions à étudier pour connaître leur interaction avec les AuNP.

Les modèles animaux permettent de recréer des réactions du système comme l'inflammation. Chez les rats ayant inhalé des AuNP à des diamètres respectifs de 50 et 250 nm, il y a un grand nombre de neutrophiles recruté dans les poumons. Cette augmentation de neutrophiles est un bon indicateur de l'induction d'une réponse inflammatoire. L'étude de Gosens a démontré une inflammation causée par les AuNP. La présence de certaines cytokines au pouvoir pro-inflammatoire est également un bon indice de la réponse biologique. Lors de l'inhalation des NP, il y a une augmentation des cytokines appelées facteur de nécrose tumorale alpha (TNF - α) et interleukine-6 (IL-6) qui ont des propriétés pro-inflammatoires (Gosens *et al.*, 2010).

L'étude de Pompa *et al.*, a démontré l'effet des AuNP sur la vie et la fertilité de l'espèce *Drosophila melanogaster*. Il fut remarqué que la vie et la fertilité des insectes étaient affectées négativement par la présence des NP à des concentrations de 12 μ g/g par jour. Les NP d'un diamètre de 15 nm alors utilisées avaient aussi comme caractéristique d'être couvertes de citrate (Vecchio *et al.*, 2012). Cette même molécule de surface cause également une

augmentation de l'inflammation et du recrutement des granulocytes et des macrophages lorsque les NP sont inhalées par des souris. De plus, lors de cette procédure, d'autres effets ont été observés : les souris exposées peuvent souffrir de problèmes aux poumons telles une hyperactivité des voies aériennes ou une réaction asthmatique (Hussain *et al.*, 2011).

L'exposition aux AuNP permet de mieux comprendre leur mode d'action en cas d'infection. En effet, des tests ont permis d'observer la participation des AuNP dans le cas d'une infection par *E. coli*. Pour ce faire, des rats Wistar ont été exposés par voie intrapéritonéale à des lipopolysaccharides (LPS) ainsi qu'à des AuNP couvertes de chitosan durant 8 jours. Différentes grosseurs de NP ont été testées, les résultats ont montré que les NP de plus petits diamètres offraient une meilleure protection contre les effets toxiques des composantes bactériennes (Stefan *et al.*, 2013).

1.5.3 Les nanoparticules d'or et la cytotoxicité

Les AuNP ont différents effets sur la cytotoxicité des cellules, elles peuvent s'avérer toxiques ou non selon la situation. Dans la littérature, il est possible de voir une tendance par rapport aux NP ayant des diamètres de près de 1 nm. Ces particules induisent un effet cytotoxique tels la nécrose ou des dommages à la mitochondrie. Cet effet a été observé chez les fibroblastes et des lignées cellulaires tels les macrophages J744A1 et les mélanomes SK-Mel-28 (Pan *et al.*, 2007). Lorsque les particules ont des diamètres plus grands, les effets varient. Chez les fibroblastes, les NP d'un diamètre de plus 10 nm causent une augmentation de l'apoptose. Cet effet toxique va augmenter proportionnellement au contact avec le produit et à sa concentration (Mironava *et al.*, 2010). Il existe des études qui montrent que les NP à 15 nm n'induisent pas d'effet cytotoxique. C'est le cas de l'étude de Gosens qui a montré que les AuNP de 15 nm n'avaient pas d'effet sur la cytotoxicité chez les fibroblastes. Lorsque les NP sont mises en contact avec des lignées cellulaires de cancer, les effets vont également varier. Pour les cellules du cancer du poumon, la présence de la NP va être cytotoxique alors que pour les carcinomes de cancer du foie et de cancer du sein, aucun effet n'est observé (Patra *et al.*, 2007, Salmaso *et al.*, 2009). Un facteur qui affecte grandement la toxicité est la charge de la particule : une charge électro-négative va avoir de graves effets cytotoxiques. C'est ce qui a été démontré dans l'étude de Rivera Gill, ces NP vont lier ADN et ainsi perturber la cellule. En ce qui concerne les cellules de l'immunité innée, les NP n'ont pas ou peu d'effets sur les cellules. En effet, les études qui abordent ce sujet montrent que la vie des phagocytes est peu affectée par la présence des AuNP (Bartneck *et al.*, 2010b).

En plus de pouvoir affecter les composantes des cellules, les NP peuvent avoir un effet sur les diverses fonctions des cellules. Tout d'abord, lors de la présence des particules avec les fibroblastes dermiques, il y a diminution de la prolifération des cellules. En effet, les études de Perdonet et de Mironava ont montré que lorsque les cellules étaient mises en présence de NP de 14 et 45 nm, le nombre de cellules était inférieur à celui des cellules qui n'ont pas été mises en contact avec le produit (Mironava *et al.*, 2010, Pernodet *et al.*, 2006).

1.5.4 Les nanoparticules d'or et le cytosquelette

Les AuNP ont un effet sur le cytosquelette des différents types cellulaires testés. Dans la plupart des cas, les filaments d'actine vont être les principales cibles des AuNP. Chez les fibroblastes, les AuNP, entre 1 nm et 45 nm, qui ont à leur surface du citrate ou aucune molécule, causent une construction anormale du réseau d'actine et même dans certains cas, sa disparition. Un autre complexe associé aux filaments d'actine est la matrice extracellulaire (Mironava *et al.*, 2010). Dans les mêmes conditions décrites pour l'actine, il y a une diminution de l'expression des matrices extracellulaires plus particulièrement de certaines de ses composantes : le collagène et la fibronectine (Mironava *et al.*, 2010). Ces composantes jouent un rôle dans l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire et la résistance mécanique des cellules. L'altération des composantes de la membrane extracellulaire entraîne une perte d'élasticité des cellules en plus de diminuer la tension entre les cellules ce qui permet leur adhésion.

Étant donné, l'impact de l'AuNP sur les filaments d'actine, il est compréhensible que certaines fonctions cellulaires soient altérées. En effet, les filaments d'actine sont les protéines responsables de ce type de mouvement de la cellule, donc une altération de celles-ci affecte grandement la motilité. Les dommages aux filaments d'actine affectent également l'adhésion cellulaire. Ces liens entre les divers types de cellules nécessitent la présence de l'actine qui dans le cas présent est diminuée (dos Remedios *et al.*, 2003, Rogers *et al.*, 1992, Torres *et al.*, 1999).

En conclusion, les effets des AuNP peuvent varier selon les caractéristiques présentées précédemment. Cependant, il semble y avoir une constance par rapport à un effet inflammatoire de ces NP. Il est important de souligner que les effets présentés dans ces paragraphes sont uniquement pour les AuNP ayant une forme ronde, il existe une grande variété de formes qui n'agissent pas toutes de la même façon avec les cellules. De plus, ces études démontrent que le diamètre des AuNP semble avoir un impact sur les effets qu'elles peuvent créer au niveau du

système, mais également du point de vue cellulaire. Ce mémoire permet de mieux comprendre l'interaction des AuNP de 20 et 70 nm avec les neutrophiles humains.

CHAPITRE 2 : SYSTÈME IMMUNITAIRE, INFLAMMATION ET NEUTROPHILE

2.1 Le système immunitaire

Le système immunitaire permet au corps humain de se défendre contre différents types d'envahisseurs. Ce système biologique est divisé en deux systèmes de défense : la réponse innée et la réponse acquise. La réponse innée comporte autant des facteurs physiques, comme la peau, que des facteurs biologiques tels que les cellules phagocytaires ou les enzymes du sang. Les principales cellules impliquées tenteront ainsi de détruire les envahisseurs à l'aide de différentes actions antimicrobiennes comme la phagocytose. L'immunité innée est rapide et n'est pas spécifique au type d'agent infectieux présent. L'immunité acquise, au contraire, prend davantage de temps à s'instaurer puisque les cellules créent une réponse adaptée et spécifique au corps étranger. À la suite d'une infection, une mémoire est généralement acquise et permet au système immunitaire d'agir plus rapidement lors d'un prochain contact avec ce même agent infectieux (Janeway *et al.*, 2009, Serhan, 2010).

Dans ce chapitre, l'immunité innée sera davantage définie, plus particulièrement le processus inflammatoire. De plus, nous discuterons du neutrophile, l'une des cellules clés dans ce processus. Un portrait global de ses fonctions principales dans la réponse innée ainsi que dans la réponse inflammatoire sera abordé.

2.2 L'inflammation

L'inflammation est un processus biologique normal qui permet de combattre une agression. Elle se caractérise par divers symptômes : la chaleur, la rougeur, la douleur, l'œdème et peut même en résulter une perte de fonction du tissu. La réponse inflammatoire est induite par la présence de motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP), tels des composés bactériens comme les LPS, ou par des motifs moléculaires associés aux dégâts cellulaires (DAMP) qui sont libérés lors d'une blessure stérile comme une brûlure. La plupart des cellules ont à leur surface divers récepteurs qui permettent de reconnaître ces molécules. Parmi ces récepteurs, on retrouve les récepteurs Toll-like (TLR), les récepteurs de lectine de type c, les récepteurs NOD-like (NLR) et les récepteurs RIG-like (RLR). Le facteur de transcription *nuclear factor-kappa B* (NF-κB) va

alors transloquer vers le noyau et stimuler l'expression de gènes pro-inflammatoires. Ceux-ci vont causer une augmentation de l'apport sanguin à la source et par le fait même le recrutement de leucocytes. Les neutrophiles sont les premières cellules à être recrutées sur le site inflammatoire. Les monocytes sont ensuite recrutés et se différencient rapidement en macrophages. En fonction du type d'inflammation, les cellules B et T peuvent également être recrutées permettant une réaction plus spécifique (Janeway *et al.*, 2009, Serhan, 2010).

Dans la plupart des cas, l'inflammation va se résorber par elle-même afin de rétablir une homéostasie tissulaire. La première série de réponses tissulaires et cellulaires représente l'inflammation aiguë. Selon le type d'infection, la durée de la réponse peut varier allant de quelques heures à quelques jours. Au départ, il y aura un recrutement important de leucocytes puis, peu à peu, avec l'élimination de l'agent infectieux, l'inflammation va progressivement se résorber jusqu'à sa résolution complète (Janeway *et al.*, 2009, Serhan, 2010).

Il existe un autre type d'inflammation dite chronique. Malgré ce que laisse croire son nom, cette réponse ne correspond pas à la durée de l'inflammation, mais au type cellulaire présent au site. En effet, cette inflammation est présente lorsque l'inflammation aiguë est trop importante et ne peut être contrôlée uniquement par les cellules de l'immunité innée : des cellules mononuclées, comme les lymphocytes, sont alors recrutées (Medzhitov, 2008). Ce type d'inflammation est le type d'inflammation retrouvé dans plusieurs maladies, telles l'arthrite rhumatoïde ou la maladie de Crohn (Janeway *et al.*, 2009, Lowe *et al.*, 2011, Serhan, 2010).

La résolution de l'inflammation est une étape importante afin d'éviter une persistance de l'inflammation ainsi que des dommages tissulaires associés à la suractivation des neutrophiles. Cette étape est réalisée par la suppression des stimuli inflammatoires. Pour ce faire, il y aura une diminution des médiateurs pro-inflammatoires, une sécrétion de stimuli anti-inflammatoires, un retrait des signaux de survie ainsi qu'une normalisation du gradient chimiotactique. L'efferocytose, c'est-à-dire l'élimination des cellules apoptotiques, est une étape clé de la résolution de l'inflammation. Les macrophages, qui sont recrutés au site, permettent la phagocytose des neutrophiles apoptotiques, de l'agent causal et des débris cellulaires. La diminution de facteurs pro-inflammatoires, comme TNF- α , l'augmentation de facteurs anti-inflammatoires, comme l'IL-10, et de facteurs pro-résolution comme la lipoxine, la protectine et la résolvine, causent un arrêt du recrutement des neutrophiles. Les cellules endothéliales retrouveront alors leur état de repos donc l'expression des molécules d'adhésion permettant le recrutement des neutrophiles au site d'inflammation sera diminuée. Une mauvaise résolution de l'inflammation peut causer une persistance de celle-ci ou engendrer des bris tissulaires. En effet,

par leurs actions telles les ROS, les granules ou les pièges extracellulaires du neutrophile (NETs), les neutrophiles peuvent endommager les cellules du corps (Janeway *et al.*, 2009, Medzhitov, 2008, Serhan, 2010).

2.3 Les neutrophiles

Les neutrophiles, ou leucocytes polymorphonucéaires sont des cellules caractérisées par la présence de granules dans leur cytoplasme et par leur noyau multilobé. Outre les globules rouges et les plaquettes, il s'agit des cellules immunitaires les plus abondantes dans le sang humain. Elles représentent environ 60 % des leucocytes présents dans la circulation sanguine. Ce type cellulaire possède un temps de vie relativement court, soit entre 8 à 24 h (Akgul *et al.*, 2001, Janeway *et al.*, 2009, Witko-Sarsat, 2000). La mort des neutrophiles est régulée par une mort cellulaire programmée appelée apoptose. Cette mort permet de réguler le nombre de neutrophiles contenu dans le sang et de rétablir une certaine homéostasie durant la réponse inflammatoire (Akgul *et al.*, 2001, Simon, 2003, Witko-Sarsat, 2000).

2.3.1 Différenciation

Les neutrophiles sont produits continuellement dans la moelle osseuse à partir des précurseurs myéloïdes. La différenciation des neutrophiles prend en moyenne 14 jours et se déroule en 6 étapes. Tout commence par la cellule souche hématopoïétique présente dans la moelle osseuse. Celle-ci peut se diviser et former une seconde cellule souche ainsi qu'une cellule progénitrice. Cette cellule permet d'engendrer deux lignées cellulaires : la lignée lymphocytaire et la lignée myéloïde. Les cellules issues de lignée myéloïde peuvent être différenciées en myéloblastes, puis en promyélocytes. Lors du passage du myéloblaste vers le promyélocyte, il y a création d'un premier type de granules, les granules azurophiles. Par la suite, les cellules promyélocytaires se différencient en myélocytes et c'est à cette étape qu'un deuxième type de granules fait son apparition : les granules spécifiques. Ce dernier type de granules apparaît lors de la différenciation des cellules myélocytaires en métamyélocytes. Lors de cette étape, le noyau de la cellule se restructure et adopte une forme de fer à cheval. Le neutrophile atteint sa maturité lorsque son noyau possède de claires segmentations séparant les différents lobes (Borregaard *et al.*, 1997, Borregaard *et al.*, 1993, Richards *et al.*, 2003, Serhan, 2010).

Habituellement, chez une personne saine, le corps produit environ 2×10^{11} neutrophiles par jour (Janeway *et al.*, 2009). Cependant, le nombre de neutrophiles peut varier selon la présence de

certaines cytokines produites par les cellules immunitaires. Par exemple, l'IL-17A, produite par les lymphocytes T auxiliaires CD4, active les facteurs de stimulation des colonies de granulocytes (G-CSF). Le G-CSF permet, entre autres, de réguler la production de neutrophiles, la différenciation des cellules myéloïdes, la libération des neutrophiles de la moelle osseuse et stimule la prolifération des cellules précurseurs des granulocytes (Richards *et al.*, 2003).

2.3.2 Recrutement des neutrophiles au site inflammatoire

Lors de l'infection d'un tissu, les neutrophiles vont être recrutés afin de pouvoir contenir l'agent infectieux et l'éliminer. Au site d'infection, les cellules endothéliales vont être activées afin de recruter les neutrophiles qui circulent librement dans les vaisseaux sanguins. Une fois les cellules endothéliales activées, ces dernières vont présenter à leur surface diverse molécules telles les sélectines P et les sélectines E (Petri *et al.*, 2008, Witko-Sarsat, 2000). Celles-ci vont s'associer aux *P-selectin glycoprotein ligand 1* (P-selectinL1) présentes à la surface des neutrophiles et permettre à ceux-ci de rouler lentement sur la surface des cellules endothéliales pour, par la suite, se lier à d'autres molécules avant de s'immobiliser complètement (Zarbock *et al.*, 2011). Les molécules d'adhésion intracellulaire (ICAM) et les molécules d'adhésion cellulaire vasculaire (VCAM) sont responsables de l'arrêt du neutrophile sur l'endothélium. Cette étape est impossible sans l'activation du neutrophile par les cytokines inflammatoires et leur attraction par les chimioattractants présents au site inflammatoire (Serhan, 2010, Witko-Sarsat, 2000). L'activation du neutrophile va causer un changement de conformation de ses intégrines qui vont se retrouver à l'extérieur permettant une ferme adhésion. Le déplacement des neutrophiles vers une jonction serrée est possible grâce à une réorganisation de son cytosquelette formant un pseudopode qui peut s'allonger tout en restant fermement lié aux cellules endothéliales (Dewey *et al.*, 1981, Ley *et al.*, 2007).

Une fois que le neutrophile a rampé à une jonction serrée, celui-ci va pouvoir transmigration vers le site inflammatoire. Pour ce faire, le neutrophile va réarranger son cytosquelette afin de pouvoir passer dans la jonction serrée comprise entre deux cellules endothéliales. Ce type de diapédèse se nomme paracellulaire. Il existe un autre type de diapédèse dit transcellulaire (Ley *et al.*, 2007). Celui-ci se déroule lorsque le neutrophile transmigration à travers la cellule endothéliale. Le type de diapédèse va dépendre de l'agent inflammatoire présent (Ley *et al.*, 2007, Parsons *et al.*, 2012). Le neutrophile va également dégrader les protéines de la membrane endothéliale basale, avec des enzymes protéolytiques, facilitant ainsi sa diapédèse (Kolaczowska *et al.*, 2013). Les neutrophiles vont être attirés vers le site d'infection grâce au gradient de

concentration des divers chimioattractants produits par les cellules du tissu. Les neutrophiles pourront alors entreprendre une multitude d'actions leur permettant d'éliminer l'agent infectieux présent.

2.3.3 Dégranulation

Tout au long de la différenciation des neutrophiles, divers granules vont être produits. Il existe trois différents types de granules et un type de vésicule qui sont produits à diverses étapes de la maturation du neutrophile tel que décrit précédemment. Ceux-ci vont être libérés en réponse à des stimuli bien précis (Borregaard, 1997, Borregaard *et al.*, 1993, Nauseef, 2007, Segal, 2005).

Les vésicules se nomment vésicules sécrétoires. Ces dernières contiennent des protéines plasmiques ainsi qu'un réservoir de récepteurs cellulaires. La libération des vésicules sécrétoires favorise la migration et l'adhérence des neutrophiles. De plus, elle favorise l'expression de récepteurs tel le récepteur du complément de type 1(CR1) nécessaire aux cellules pour réaliser la phagocytose (Segal, 2005, Serhan, 2010).

Parmi les granules, on retrouve des granules gélatinases et spécifiques. Ils sont principalement constitués de protéines telles les gélatinases (MMP-9) et les collagénases (MMP-8) qui permettent la dégradation des tissus et favorisent par le fait même la migration des cellules. Cette dégradation va favoriser la migration d'autres leucocytes vers le site d'inflammation. La sécrétion de ces enzymes doit être régulée, puisque celles-ci peuvent endommager les cellules de l'hôte (Borregaard, 1997, Borregaard *et al.*, 1997, Borregaard *et al.*, 1993, Faurschou *et al.*, 2003, Segal, 2005, Serhan, 2010, Simard *et al.*, 2010).

Le dernier type de granules est formé principalement d'enzymes ayant des propriétés microbicides. Ce groupe se nomme granules azurophiliques. Ces granules ont pour rôle la destruction de l'agent infectieux. Des enzymes telles la myéloperoxydase (MPO), la protéinase-3, la cathepsine et la *Bactericidal/permeability-increasing protein* (BPI) permettent aux neutrophiles de détruire les pathogènes. Tout comme la MMP-9 et la MMP-8, la dégranulation de la MPO doit être régulée afin d'éviter d'endommager les tissus sains. En effet, la MPO permet la production de ROS. Ces composés peuvent être utiles pour combattre un agent infectieux grâce à la transformation du peroxyde (H_2O_2) en acide hypochloreux (HOCl), un antiseptique extrêmement puissant. Cependant, en plus de contribuer à l'inflammation, ces ROS peuvent induire des dommages tissulaires s'ils sont présents en trop grand nombre et trop longtemps dans l'environnement. C'est pourquoi il est important que la dégranulation soit

contrôlée. Cette dernière est dépendante de plusieurs protéines telles la phospholipase C- γ et les mitogens activated protein kinases (MAPK) (Borregaard, 1997, Borregaard *et al.*, 1997, Borregaard *et al.*, 1993, Faurschou *et al.*, 2003, Segal, 2005, Serhan, 2010, Simard *et al.*, 2010).

2.3.4 Phagocytose

Le neutrophile peut également phagocyter les microorganismes afin de les détruire. Ce procédé permet l'internalisation de particules de plus de 0,5 μm . La phagocytose est un processus par lequel le neutrophile reconnaît un agent infectieux pour ensuite l'invaginer dans sa membrane, le digérer et enfin l'éliminer (Underhill *et al.*, 2012). La phagocytose commence lors de la reconnaissance de l'agent infectieux par les récepteurs à la surface des cellules. Les récepteurs peuvent être classés en deux catégories : ceux dépendant de l'opsonisation et ceux indépendants de celle-ci. Les récepteurs Fc γ , dépendant de l'opsonisation, vont reconnaître la portion Fc des IgG. Les fragments du complément C3b sont également des opsonines, mais ceux-ci sont reconnus par les récepteurs du complément. La liaison à ces récepteurs va permettre l'activation de la phagocytose par l'activation de protéines comme *spleen tyrosine kinase* (Syk), *sarcosine tyrosine kinases* (Src) et PI3K (Herre *et al.*, 2004a, Herre *et al.*, 2004b, Shi *et al.*, 2006). Une fois l'activation de la phagocytose enclenchée, l'invagination de l'agent infectieux va commencer. Cette étape dépend des protéines du cytosquelette plus particulièrement de l'actine qui permettent la déformation de la membrane et forment une vésicule qui enferme l'agent infectieux. Afin de digérer les agents infectieux, ceux-ci vont se retrouver dans une vacuole appelée phagosome. Cette vacuole, suite à la fusion avec des lysosomes, va former le phagolysosome. Le phagolysosome contient les particules pouvant détruire l'agent infectieux. Par exemple, il peut y avoir une production de ROS à l'intérieur du phagosome ou le contenu des granules peut être versé dans le phagosome. Cette action est possible grâce à la fusion des membranes du phagosome avec celles des granules (Segal, 2005, Serhan, 2010, Shi *et al.*, 2006).

2.3.5 Production de dérivés réactifs de l'oxygène

Les neutrophiles ont la capacité de produire différents agents antimicrobiens, certains sont indépendants de l'oxygène comme les protéines contenues dans les granules, alors que d'autres résultent de réactions produites par l'oxygène, comme les ROS. Lors de ce processus, le complexe protéique nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase, présent dans les membranes cellulaires, va être activé et permettre le transfert de ses électrons à l'oxygène. Ce transfert va mener à la production d'anions appelés superoxydes (O_2^-) qui pourront à leur tour être transformés en divers ROS hautement toxiques : le H_2O_2 et l' $HOCl$ (Babior, 1999, Clark *et al.*, 2013). Le NADPH oxydase n'est pas le seul complexe moléculaire qui permet la production de ces ROS. En effet, ce rôle revient aussi aux mitochondries. Un autre enzyme responsable d'une réaction similaire est l'oxyde nitrique (NO) synthétase qui permet la production de NO. La création de ROS est causée par la chaîne de transport des électrons lors de la respiration cellulaire au niveau de la mitochondrie. L'un des rôles des ROS est la destruction des microorganismes. Pour ce faire, les divers ROS peuvent interagir avec les protéines, lipides et acides nucléiques des bactéries, causant ainsi leur mort. Les ROS participent également à diverses voies de signalisation de la cellule. Ils participent à la modulation des protéines kinases, des phosphatases, des récepteurs membranaires et de plusieurs facteurs de transcription comme le NF- κ B. Ces voies sont reliées à l'homéostasie, la prolifération, la différenciation cellulaire et les réponses inflammatoires (Babior, 1999, Borregaard *et al.*, 1997, Clark *et al.*, 2013)

La régulation des ROS est importante, car en trop grand nombre, ils s'avèrent dangereux pour le neutrophile et son environnement. En effet, l'action toxique des ROS est souvent rapportée dans diverses maladies inflammatoires. Le nombre de ROS peut être régulé à l'aide d'antioxydants, mais si la capacité des antioxydants est dépassée, cela peut entraîner la mort de la cellule. Cette mort est causée par la modification des biomolécules de la cellule, c'est-à-dire que les ROS peuvent enlever des électrons aux molécules, les rendant ainsi dysfonctionnelles (Nauseef, 2007, Witko-Sarsat, 2000).

2.3.6 Production de cytokines

Le neutrophile joue un rôle important dans la régulation de l'inflammation. En effet, le neutrophile peut produire diverses cytokines qui peuvent affecter le processus biologique. Les différentes cytokines pourront stimuler le recrutement des différentes cellules des deux types d'immunité. Cette sécrétion de cytokines est engendrée par divers stimuli bactériens et viraux (Gasperini *et al.*, 1999, Serhan, 2010).

Certaines chimiokines permettent l'activation des neutrophiles ainsi que leur recrutement. L'IL-8 et Growth-regulated protein alpha (GRO- α) sont des chimiokines qui peuvent induire cette réponse. Celles-ci peuvent être produites, entre autres, par le neutrophile, suite à son activation par divers agents comme les LPS (Gasperini *et al.*, 1999). Puisque les neutrophiles sont les premières cellules recrutées au site d'inflammation, ils produisent des chimioattractants, comme l'IFN- γ -inducible protein 10 (IP-10), qui peuvent attirer d'autres cellules immunitaires, comme les cellules NK, les monocytes et les lymphocytes T activés (Gasperini *et al.*, 1999). D'autres chimiokines ayant des effets semblables sont les *Macrophage inflammatory protein 1 alpha* (MIP-1 α) et MIP-1 β (Gasperini *et al.*, 1999, Kunkel *et al.*, 1995). Ces chimioattractants permettent le recrutement et l'activation des cellules immunitaires contre les agents infectieux comme les monocytes, les lymphocytes T et les cellules dendritiques. De plus, certaines cytokines produites, de facteur de stimulation de colonie de granulocytes et macrophages (GM-CSF), de facteur de stimulation de colonie de macrophages (M-CSF) et G-CSF, vont permettre une augmentation du développement des cellules immunitaires dans la moelle osseuse (Gasperini *et al.*, 1999, Serhan, 2010).

2.3.7 Apoptose

L'apoptose est une mort programmée dite propre puisqu'elle permet à la cellule de conserver son intégrité membranaire et de ne pas se vider de son contenu cytoplasmique, pouvant être toxique, dans l'environnement cellulaire. Lors de l'apoptose, la cellule va subir quelques modifications : son volume diminuera, la cellule sera plus dense, son ADN va se fragmenter et la chromatine va se rétracter ce qui résultera en un noyau pycnotique. De plus, une exposition des phosphatidylsérines à la surface de la cellule et un clivage des récepteurs de surface CD16 sont d'autres signes de l'apoptose chez le neutrophile (Akgul *et al.*, 2001, Simon, 2003, Witko-Sarsat, 2000). D'autres protéines seront clivées, comme les protéines du cytosquelette dont il sera question dans le prochain chapitre.

Il existe plusieurs voies biochimiques décrites chez le neutrophile : la voie extrinsèque médiée par un récepteur de surface, la voie intrinsèque médiée par la mitochondrie et la voie du stress du réticulum endoplasmique régulée par les senseurs du réticulum endoplasmique. Ces voies semblent isolées les unes des autres cependant il existe des interactions entre celles-ci. En effet, les voies peuvent se réguler entre-elles.

L'apoptose engendrée via la **voie extrinsèque** est médiée par l'activation des récepteurs de mort à la surface de la cellule à l'aide de signaux extracellulaires (voir figure 3). Les récepteurs de mort exprimés par les neutrophiles sont les récepteurs du facteur de nécrose tumoral (TNF-R), *Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand receptor* (TRAIL-R) et récepteurs Fas (FasR). Suite à l'activation de l'un de ces récepteurs, le complexe signalétique inducteur de mort (DISC) est formé. Celui-ci est constitué d'une protéine adaptatrice *Fas-associated death domain*, *Tumor-associated death domain* et de la procaspase 8 (Akgul *et al.*, 2001, Luo *et al.*, 2008). La procaspase 8 subira, par la suite, une autoprotolyse afin de libérer la forme active, la caspase 8. Cette caspase initiateur va à son tour activer la caspase 10 puis la caspase 3, responsables du clivage des substrats à l'intérieur de la cellule tels certains types de protéines du cytosquelette (Fox *et al.*, 2010).

Une seconde voie apoptotique est la **voie intrinsèque**. Cette voie est activée via un stress intracellulaire, comme un dommage à l'ADN provoqué par des rayons ultraviolets ou un choc thermique, qui va entraîner une dépolarisation de la mitochondrie (voir figure 3). Ce changement de potentiel transmembranaire mitochondriale va entraîner une translocalisation de protéines proapoptotiques, Bid et Bax, au niveau de la membrane externe de la mitochondrie et il y aura une diminution de l'expression des protéines anti-apoptotiques, comme Bcl-2 (Akgul *et al.*, 2001, Moulding *et al.*, 2001, Santos-Beneit *et al.*, 2000). Des pores seront alors formés et différentes protéines mitochondriales, dont des facteurs proapoptotiques, seront libérées. Le cytochrome C sera également libéré de la mitochondrie où il va s'associer avec APAF1 (*apoptotic protease activation factor 1*) et de l'ATP afin de former l'apoptosome. Celui-ci va recruter la procaspase 9 qui va s'autoactiver par protéolyse (Kroemer, 2007, Luo *et al.*, 2008, Simon, 2003). Lorsque l'apoptosome est activé, il peut à son tour activer des caspases effectrices telle la caspase 3 qui, comme lors de la voie extrinsèque, va cliver différents substrats comme les protéines du cytosquelette (Fox *et al.*, 2010).

La dernière voie et la plus récemment découverte chez le neutrophile est la **voie du réticulum endoplasmique** (voir figure 3). Cette réponse est généralement engendrée par une accumulation de protéines mal repliées excédant la capacité de repliement des protéines

chaperonnes. Ce stress du réticulum endoplasmique va enclencher une cascade d'actions correctives appelée *unfolded protein response* (UPR). Parmi ces actions correctives, il y a l'augmentation de la production de protéines chaperonnes. De plus, la caspase inflammatoire 4 sera activée par cette voie et une augmentation de l'expression de diverses molécules comme l'activateur du facteur de transcription 6 (ATF6), l'enzyme inositol-dépendante-1 (IRE-1) et la kinase du réticulum similaire à PKR (PERK) sera engendrée (Binet, 2010, Ron *et al.*, 2007).

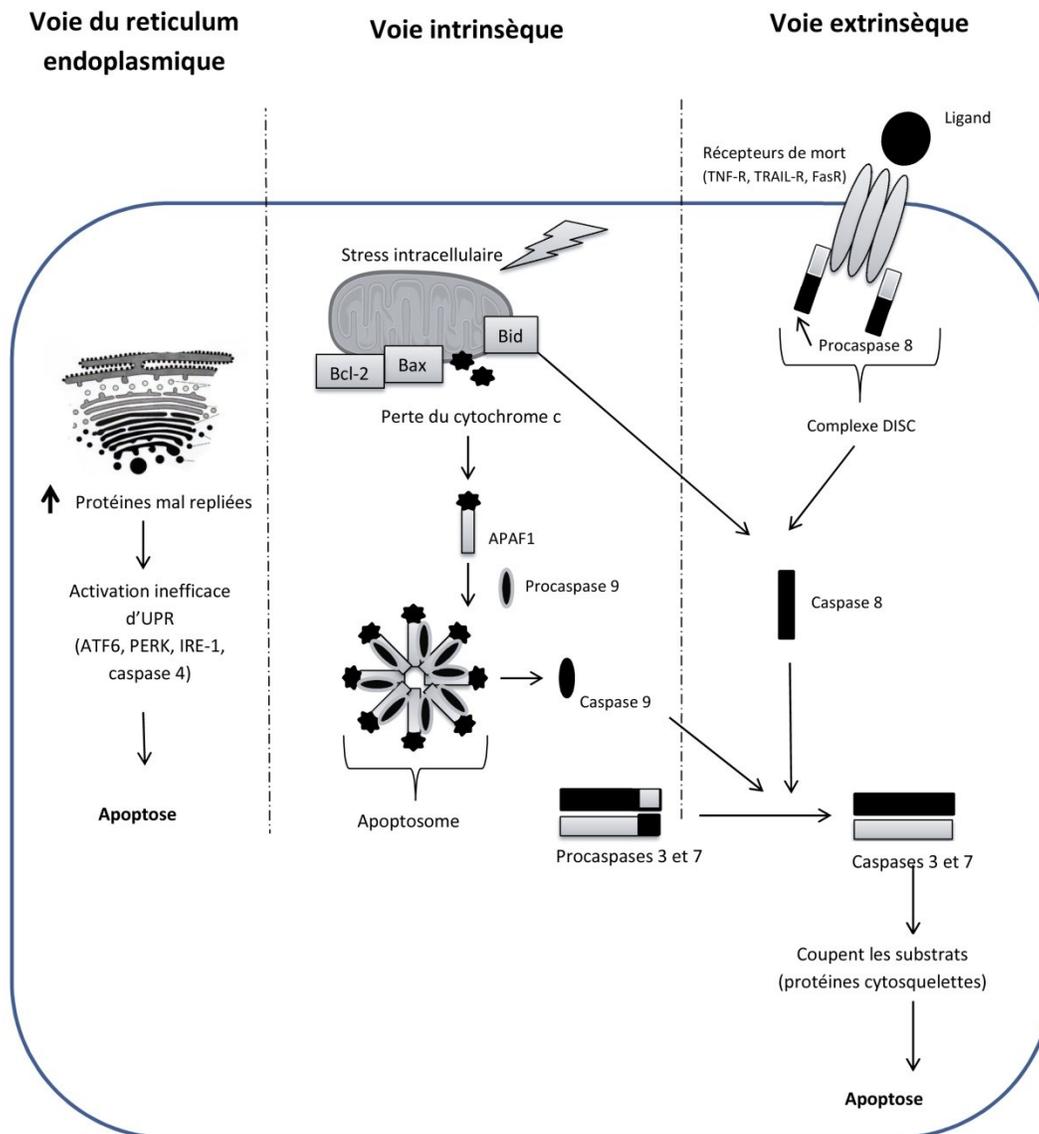


Figure 3 : Voies de l'apoptose chez les neutrophiles (inspirée de Luo *et al.*, 2008)

La mort programmée qu'est l'apoptose peut être enclenchée par trois voies biochimiques différentes. Il y a la voie du réticulum endoplasmique (à gauche), engendrée par un grand nombre de protéines mal repliées, la voie intrinsèque (au centre) causée par un stress intracellulaire et la voie extrinsèque (à droite) qui débute lors de la liaison d'un agent extracellulaire à un récepteur de mort de la cellule. Ces trois voies ne sont pas indépendantes les unes des autres, les voies peuvent se réguler entre elles.

Lors de l'apoptose, les caspases, une famille de protéases, sont clivées en leur forme active. Leur nom provient du terme de *cysteine aspartic acid specific proteases* puisqu'elles coupent leurs substrats au niveau de l'acide aspartique. Les caspases se retrouvent sous formes inactives, les procaspases. Les caspases peuvent s'autoactiver ou une autre caspase peut les activer. Les caspases sont divisées en différentes familles selon leur structure. Il y a des caspases initiatrices comme les caspases 8 et 10 qui commencent la réaction de mort cellulaire en activant d'autres caspases. On retrouve également les caspases effectrices, comme les caspases 3 et 7 qui vont dégrader diverses protéines ou même l'ADN. Finalement, les caspases inflammatoires qui en plus de jouer un rôle dans l'apoptose, permettent l'activation de cytokine inflammatoire. Chez le neutrophile, il est possible de retrouver les caspases 1,3, 4,6, 7,8, 9,10 et 14 (Goepel *et al.*, 2004, Murphy *et al.*, 2003, Santos-Beneit *et al.*, 2000).

2.3.8 Régulation de l'apoptose

L'apoptose permet de revenir à l'homéostasie après une réaction inflammatoire. Ainsi, il est important de maintenir un niveau constant de neutrophiles dans le sang afin d'éviter divers problèmes. Un niveau d'apoptose trop élevé cause une diminution du nombre de neutrophiles. Cet effet peut être nocif en présence d'un agent infectieux. En effet, si le nombre de cellules est trop bas, l'organisme ne sera pas capable de se défendre contre l'envahisseur qui pourra alors prendre le dessus. Ce type de déficience du nombre de neutrophiles porte le nom de neutropénie. Ce phénomène n'est pas le seul risque associé à un nombre trop grand d'apoptose. L'apoptose peut causer la production démesurée d'autoanticorps. En trop grand nombre, ces autoantigènes peuvent engendrer une réponse auto-immune (Akgul *et al.*, 2001, Simon, 2003, Witko-Sarsat, 2000).

Lorsqu'il n'y a pas assez d'apoptoses, le nombre de neutrophiles sera trop élevé et des problèmes différents peuvent être observés. Les cellules restent présentes sur le site d'infection et continuent leurs actions : production de ROS, d'enzymes bactéricides ou même de cytokines inflammatoires. Ces actions auront comme résultats d'endommager les tissus et d'exacerber l'inflammation (Akgul *et al.*, 2001, Simon, 2003, Witko-Sarsat, 2000).

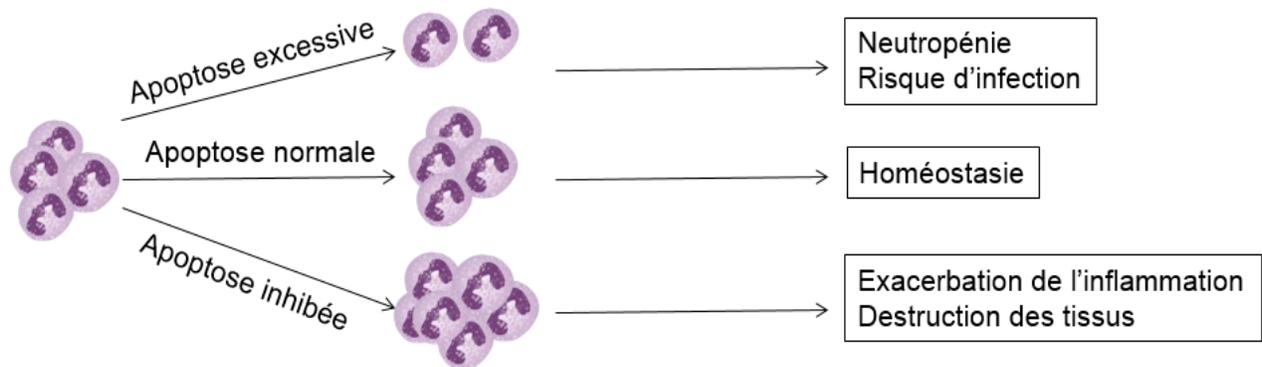


Figure 4 : Désordres causés par une mauvaise régulation de l'apoptose (inspirée de D. Girard, 2003).

L'apoptose bien régulée permet de revenir à l'homéostasie tissulaire après une réaction inflammatoire puisque le nombre de neutrophiles revient à la normale. Dans certains cas, il peut y avoir des dérégulations de l'apoptose et cela peut provoquer divers désordres. Lorsque l'apoptose est excessive, il y aura une diminution du nombre de neutrophiles. Cette diminution va s'appeler neutropénie et va augmenter les risques d'infection. Dans le cas où il y a une apoptose d'inhibée, l'inflammation va persister et il peut y avoir alors une destruction des tissus.

Le neutrophile va entrer en apoptose spontanée afin de maintenir l'homéostasie. Cependant, il est possible d'activer ou de retarder l'apoptose grâce à divers produits avec lesquels les cellules vont être mises en contact. Par exemple, la lectine de plante *Viscum album agglutinin-I* (VAA-I) permet d'induire une apoptose du neutrophile. Le GM-CSF va, à l'inverse, retarder l'apoptose de la cellule. L'utilisation d'agents pouvant diminuer ou augmenter l'apoptose peut s'avérer utile dans un contexte de maladie. Par exemple, lors d'une neutropénie causée par un taux trop élevé d'apoptose, l'utilisation d'un agent anti apoptotique va permettre de stabiliser le nombre de neutrophiles (Akgul *et al.*, 2001, Luo *et al.*, 2008).

CHAPITRE 3 : CYTOSQUELETTE

3.1 Rôle

Les cellules sont dotées d'un réseau de protéines appelé cytosquelette leur permettant de réagir à leur environnement et de se mouvoir. Ces complexes de filaments jouent un rôle important dans plusieurs fonctions de la cellule : modelage cellulaire, motilité, adhésion, réarrangement du cytoplasme, résistance au stress mécanique et autres. Il existe une grande variété de protéines du cytosquelette qui interagissent entre elles, c'est pourquoi elles ont été divisées en 3 types distincts : les microfilaments, les microtubules et les filaments intermédiaires. Ces catégories sont subdivisées en fonction de la grosseur des filaments et de leurs fonctions (Chang *et al.*, 2004).

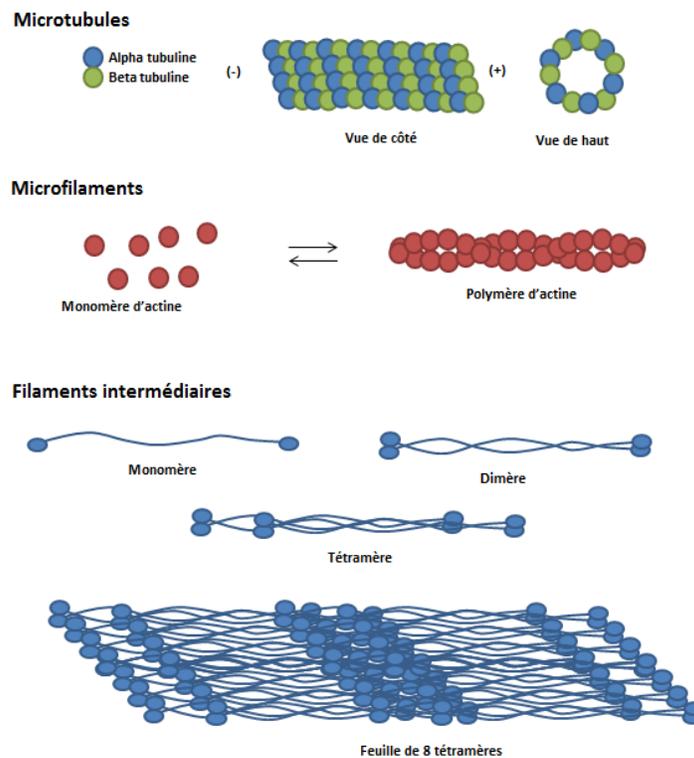


Figure 5 : Composition des protéines du cytosquelette.

Le cytosquelette est composé de trois grandes familles de protéines : les microtubules, les microfilaments et les filaments intermédiaires. Les microtubules sont composés de sous-unités de tubuline, alpha et bêta. Les dimères s'assemblent les uns aux autres via leur extrémité positive pour former un cylindre creux. Les microfilaments sont composés de monomères d'actine qui se lient pour former un polymère. Les filaments intermédiaires pour leur part sont des protéines fibrillaires qui se lient et s'entrelacent les uns aux autres afin de former des feuillets de tétramère assemblés de manière hélicoïdale.

3.1.1 Microfilaments

Les microfilaments sont de fins filaments, entre 4 et 7 nm, principalement constitués de polymères d'actine à laquelle se lient d'autres protéines, par exemple la myosine et la vinculine, afin de former un réseau. Ce groupement est la composante du cytosquelette la plus dynamique (voir figure 5). Il permet à la cellule de se mouvoir et de phagocyter. Chez le neutrophile, l'actine représente de 5 à 8 % de ses protéines totales. Elle peut se retrouver sous forme de monomères solubles ou de filaments. Afin de permettre l'organisation et l'assemblage de ces filaments, l'actine interagit avec d'autres protéines spécialisées du cytosquelette. L'une d'entre elles, qui a suscité notre intérêt lors des travaux de ce mémoire, est une protéine de 84 kDa, la gelsoline. La gelsoline contribue à l'élongation des filaments d'actine en la fragmentant et la coiffant. Ces actions requièrent la présence de sels et d'adénosine triphosphate (ATP). La gelsoline peut se lier au monomère d'actine et former un site propice à l'élongation. Cependant, elle peut également scinder en deux les filaments afin de libérer des monomères. Les filaments d'actine peuvent également être liés les uns aux autres ou à la membrane cellulaire. Ces protéines sont dites adaptatrices et parmi celles-ci, il est possible de retrouver la vinculine, la paxilline et la fodrine (dos Remedios *et al.*, 2003, Rogers *et al.*, 1992, Torres *et al.*, 1999).

3.1.2 Microtubules

Le groupe de microtubules facilite le réarrangement intracellulaire et extracellulaire. Les filaments de ce type sont constitués de dimères de tubulines polarisés, alpha et bêta (voir figure 5). Ils ont un diamètre d'environ 25 nm et partent du centrosome vers la périphérie. C'est par leur extrémité positive qu'ils peuvent s'allonger par polymérisation ou rétrécir par dépolymérisation. Ces événements sont possibles grâce à diverses protéines qui leur sont associées. Un des rôles des microtubules appliqué au neutrophile est le positionnement des organelles et des protéines. En effet, les microtubules peuvent permettre le déplacement de certaines protéines ou les séquestrer via la dynéine, une protéine motrice des microtubules (Chang *et al.*, 2004, Rogers *et al.*, 1992, Torres *et al.*, 1999).

3.1.3 Filaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires sont composés de cytokératines, de la vimentine et des lamines. Les filaments intermédiaires ont des diamètres d'environ 8 à 12 nm et sont concentrés du noyau vers la périphérie (voir figure 5). Ils possèdent une grande stabilité chimique. Leur rôle est de maintenir la forme et la structure tridimensionnelle de la cellule. Chez les neutrophiles, on retrouve uniquement la vimentine et les lamines nucléaires. Elles forment un réseau périnucléaire. Les lamines se retrouvent à l'intérieur de la surface de la membrane nucléaire. Elles peuvent permettre la protéolyse de cette enveloppe nucléaire lorsqu'elles sont clivées. Habituellement, il est possible de retrouver trois types de lamines nucléaires A, B et C, mais chez le neutrophile, uniquement la lamine B est présente. La lamine B est divisée en sous-catégories : B1 et B2. Ces deux types de lamines ont des rôles semblables qui contribuent principalement à la stabilité du noyau. En ce qui concerne la vimentine, son rôle chez les neutrophiles n'est pas clairement défini. Elle joue un rôle essentiel chez certains types cellulaires, par exemple dans le système nerveux périphérique où elle permet la production de la myéline. Dans nos travaux, nous avons observé la présence de la lamine B1 et de la vimentine (Rogers *et al.*, 1992, Torres *et al.*, 1999).

3.2 Implication du cytosquelette dans l'apoptose

Lors de l'apoptose, les divers changements morphologiques et internes de la cellule sollicitent la participation du cytosquelette. En effet, certaines protéines du cytosquelette vont être clivées, signe précoce de l'apoptose. Lors de la condensation de l'ADN, par exemple, les cellules vont réorganiser leur cytosquelette en clivant certaines d'entre elles. C'est le cas de l'actine, la vimentine, la gelsoline et de la vinculine qui sont dégradées lors de l'apoptose spontanée du neutrophile humain. Lors de l'apoptose induite par des agents telle la lectine de plante VAA-I, il fut remarqué qu'il y a également la vimentine, la lamine B1 et la paxilline qui sont dégradées. Cette dégradation est souvent associée avec l'activation des caspases (Lavastre *et al.*, 2005, Lavastre *et al.*, 2002). Cependant, les caspases ne sont pas les seules protéases capables de scinder les protéines du cytosquelette, les calpaines et les protéasomes sont également capables de jouer ce rôle (Muller *et al.*, 2001).

Le rôle de la dégradation des protéines du cytosquelette dans l'apoptose peut être expliqué par la formation de divers complexes de protéines avec des éléments essentiels à la survie cellulaire. Il fut démontré que la vimentine forme un complexe avec la protéine p53, un

suppresseur de tumeur qui induit l'apoptose. Lorsque la cellule est saine, la vimentine séquestre p53 inhibant ainsi l'apoptose, mais lors de l'apoptose, ce complexe est dégradé par la caspase 4 pour permettre à p53 d'agir (Perlson *et al.*, 2006, Yang *et al.*, 2005). Un effet semblable est visible avec la gelsoline. Celle-ci permet de bloquer la libération du cytochrome c lors de l'activation du FasR, chez les cellules Jurkat. L'effet de la gelsoline permet de diminuer le taux d'apoptose et de protéger la cellule (Muller *et al.*, 2001).

De plus, la dégradation des protéines du cytosquelette induit, dans certains cas, l'expression de ces protéines dégradées à la surface de la cellule. Dans notre laboratoire, nous avons montré que les protéines lamine B1 et vimentine sont exprimées par les neutrophiles lors de l'apoptose spontanée. Ce phénomène est encore incompris, mais il serait possible de croire que cette expression en surface permettrait d'envoyer un message aux macrophages afin de favoriser leur phagocytose. De plus, elles pourraient potentiellement mener à la production d'autoanticorps et avoir un rôle à jouer dans certaines maladies inflammatoires telle la polyarthrite rhumatoïde (Lavastre *et al.*, 2002, Moisan *et al.*, 2006, Rogers *et al.*, 1992).

Il existe d'autres moyens par lesquels les protéines du cytosquelette peuvent être impliquées dans l'induction de l'apoptose. Par exemple, les microtubules emprisonnent la protéine Bim afin d'éviter qu'elle ne puisse induire l'apoptose via la libération du cytochrome c de la mitochondrie. Toutefois, en présence de certains agents anticancéreux, Bim peut être libérée et induire l'apoptose. La dynéine permet également, lors de l'apoptose, de transloquer la protéine p53 qui va induire l'expression de gènes, Bax et Bcl-2, qui vont augmenter la perméabilité de la membrane mitochondriale. (Chang *et al.*, 2004, Rogers *et al.*, 1992, Torres *et al.*, 1999).

Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes concentrés sur le réarrangement des protéines du cytosquelette plus particulièrement la dégradation et l'expression en surface lors de l'apoptose des neutrophiles.

SECTION 2 : ARTICLE

ARTICLE

Titre :

Gold nanoparticles induce apoptosis, endoplasmic reticulum stress events and cleavage of cytoskeletal proteins in human neutrophils

Auteurs :

Claudie Noël, Jean-Christophe Simard and Denis Girard

Publié dans la revue :

Toxicology in Vitro

Date de publication :

6 novembre 2015

Contributions personnelles :

J'ai réalisé les expériences de ce papier. J'ai également contribué à la planification des expériences et à la rédaction de l'article.

Contributions des autres auteurs :

Jean-Christophe Simard m'a aidé pour les expériences d'immunobuvardage de type Western en lien avec le stress du réticulum endoplasmique. De plus, il a collaboré à la rédaction de l'article. Denis Girard a participé à la planification des expériences en plus de réaliser la rédaction du papier.

RÉSUMÉ

Les nanoparticules d'or (AuNP) sont des candidats prometteurs pour le développement de nanomédicaments, pour le traitement de différents troubles, notamment les maladies inflammatoires. Elles pourraient modifier la biologie de neutrophiles humains, des cellules clés dans l'inflammation. L'interaction entre ce type de cellules et les AuNP est encore peu connue et il existe peu d'études à ce sujet. Dans cette étude, nous avons constaté que les AuNP de 20 nm (AuNP20) sont internalisées dans les vacuoles cytosoliques alors que les AuNP70 sont plutôt localisées à la membrane cellulaire. Ces deux types de AuNP causent l'apoptose par un mécanisme dépendant des caspases. De plus, les AuNP engendrent la dégradation des protéines du cytosquelette, la vimentine, la lamine B1 et la gelsoline, sans toutefois augmenter leur expression à la surface de la cellule. Lors du traitement aux AuNP, l'activation de la caspase-4 nous signale que la voie du stress du réticulum endoplasmique est activée. L'activation des trois témoins du stress du réticulum endoplasmique, IRE1 (inositol nécessitant la protéine-1), ATF-6 (activation de la transcription factor-6) et PERK (ARN de la protéine kinase (PKR) - comme ER kinase) démontrent également l'activation de la voie par les AuNP. Les AuNP sont de nouveaux agents proapoptotiques pour les neutrophiles humains. Cependant leur incapacité à augmenter l'expression des protéines du cytosquelette à la surface des cellules, une condition qui pourrait conduire à des effets indésirables, limite mais n'exclut pas leur toxicité potentielle.

ABSTRACT

Gold nanoparticles (AuNPs) are promising candidates for developing nanomedicines, for the treatment of different disorders, including inflammatory diseases. However, how AuNPs could alter the biology of human neutrophils, key player cells in inflammation, is a poorly documented area of research. Here we found that, although AuNP of 20 nm (AuNP20) could be internalized in cytosolic vacuoles but that AuNP70 were localized at the cell membrane, both induced apoptosis similarly by a caspase-dependent mechanism. AuNPs induced degradation of the cytoskeletal proteins vimentin, lamin B1 and gelsolin, but, unexpectedly, did not increase their cell surface expression. Consequent with caspase-4 processing, AuNP were found to activate endoplasmic reticulum (ER)- stress, as evidenced by activation of the three ER sensors, IRE1 (inositol-requiring protein-1), ATF-6 (activating transcription factor-6) and PERK (protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase). AuNPs are novel human neutrophil proapoptotic agents indicating that they are toxic to these cells. However, the fact that they do not induce cell surface expression of cytoskeletal proteins could decrease potential adverse effects and toxicity of AuNP by limiting, for example, the production of autoantibody against cytoskeleton components.

INTRODUCTION

Utilization of nanoparticles (NPs) becomes constantly more important in nanomedicine. Because of their size similar to cellular components, NPs can directly interact with the cell and their organelles. Utilization of NPs is of great interest for health care because of their numerous benefits like the ability to specifically target cancerous cells or improve the efficiency of certain drugs (Bharali and Mousa, 2010; Pan et al., 2007; Ventola, 2012). Good candidates in nanomedicine are gold nanoparticles (AuNPs). They are currently being used widely because of their optical and photothermal properties (Daniel and Astruc, 2004; Eustis and El-Sayed, 2006). Indeed, the optical properties of AuNPs allow specific targeting of cancer cells and that could be specifically destroyed because of their photothermal properties (Huang and El-Sayed, 2010; Zhang et al., 2011). Recently, it has been proposed that the use of AuNP carriers can improve the delivery and safety of immunotherapy agents in cancer (Almeida et al., 2014).

Among the adverse effects of NPs described in the literature, inflammation is certainly the most reported one, based especially on exacerbation of in vivo models of airway of inflammation and on the increased proinflammatory cytokine production by different cell types (Aalapati et al., 2014; Brandenberger et al., 2013; Hussain et al., 2011; Skuland et al., 2014). However, in general, the effects of naked AuNPs are antiinflammatory (Sumbayev et al., 2013; Tsai et al., 2007) and when inflammation is reported the effects appear to be only transitory. Moreover, AuNPs were found to have great potential as carriers for local drug delivery and as a primary therapeutic for treatment of inflammation (Labens et al., 2013), including arthritis (Tsai et al., 2007). Of note, it has been showed in vivo that polyethylene glycol-coated AuNPs of 10 nm and 60 nm induced a recruitment of polymorphonuclear neutrophil cells (PMNs) while the same particles at a diameter of 5 nm and 30 nm decreased such recruitment (Zhang et al., 2011).

PMNs, the predominant leukocyte type in human blood, are key player cells in inflammation. They are known to be the first cell type to migrate at an inflammatory site. A huge number of PMNs are released from the bone marrow; this has been estimated at $\sim 5 \times 10^{10}$ cells on a daily basis in a normal adult (Ward et al., 1999). They have a limited life span and have the shortest half-life (~ 12 h in circulation) among all cells of

the immune system. Cell turnover must therefore be rigorously controlled to avoid adverse effects. Fortunately, PMNs undergo constitutive or spontaneous apoptosis explaining why the number of PMNs remains relatively stable in healthy individuals. Importantly, elimination of apoptotic PMNs by professional phagocytes is a major step for the resolution of inflammation (Ward et al., 1999).

Cytoskeleton rearrangement is important for many PMN functions (Torres and Coates, 1999). We have previously shown that some cytoskeletal proteins are cleaved and expressed at the surface of PMNs during spontaneous apoptosis as well as in response to some agents including the potent proapoptotic plant lectin *Viscum album* Agglutinin-I (VAA-I) (Lavastre et al., 2002; Moisan and Girard, 2006; Savoie et al., 2000). Also, it had been shown that cytoskeletal proteins played a role during inflammation. For example, gelsolin, a microfilament-associated protein, is known to regulate PMN apoptosis and induce an inflammatory response (Li et al., 2012). Moreover, the cell surface expression or the secretion of some cytoskeletal proteins is associated with the presence of autoantibodies against these proteins and with several autoimmune inflammatory disorders (Dieudé et al., 2002; Thebault et al., 2002).

Despite the above observations, the effects of AuNPs on PMN apoptosis and cytoskeleton rearrangements have never been reported. In this study, we demonstrated that AuNPs of 20 nm (AuNP20) and of 70 nm (AuNP70) increased the basal PMN apoptotic rate by a caspasedependent mechanism. Both AuNPs activate endoplasmic reticulum (ER) stress mediated cell death as evidenced by activation of the three ER sensors IRE1, PERK and ATF-6. AuNPs also induced the degradation of some cytoskeletal proteins, but did not induce cell surface expression of cytoskeletal proteins in apoptotic PMNs.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals: The AuNP20 and AuNP70 (PELCO® Tannic BioPure™ Gold Colloids) were purchased from Ted Pella (Redding, CA). The caspase inhibitor N-benzyloxy-carbonyl-V-A-D-O-methylfluoromethyl ketone (z-VADFMK) was purchased from Calbiochem (Pasadena, CA). The plant lectin *V. album* agglutinin-I (VAA-I), trypan blue, tunicamycin, bovine serum albumin (BSA), phosphate buffered saline solution (PBS), monoclonal anti-gelsolin, anti- β -actin and dextran were purchased from Sigma Aldrich Ltd. (St. Louis, MO). Phospho-IRE-1 and total IRE-1 antibodies were purchased from Cell Signaling Technology Inc. (Danvers, MA) and from Pierce (Rockford, IL), respectively. Ficoll-Hypaque was purchased from GE Healthcare (Uppsala, Sweden). RPMI-1640, HEPES, penicillin, streptomycin, Annexin-V-FITC, propidium iodine (PI) and Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) were from Life Technologies (Grand Island, NY, USA). The goat polyclonal anti-lamin B1 (C-20), mouse monoclonal anti-vimentin (clone V9), phospho-PERK, PERK, ATF-6 α , caspase-4 and anti-GAPDH (FL-335) specific antibodies were obtained from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA). FITC-mouse antihuman CD16 mAb was purchased from BD Pharmingen (Mississauga, Ontario, Canada). HRP-labeled goat anti-mouse IgG, HRP-labeled goat anti-rabbit IgG and HRP-labeled rabbit anti-goat IgG antibodies were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). The 30% acrylamide/BIS solution, polyvinylidenedifluoride (PVDF) membrane and Clarity™ Western ECL substrate were purchased from Bio-Rad (Hercules, CA). Rabbit anti-caspase-3, caspase-7 and caspase-9 antibodies were from Cell Signaling Technology Inc. (Danvers, MA). The Hema 3 stain kit was from Fisher Scientific Company L.L.C. (Kalamazoo, MI), dry milk from ©Nestle and propidium iodide (PI) from Life Technologies (Eugene, OR).

Size distribution and zeta potential measurements: The size distribution (intensity) and polydispersity index of AuNP20 and AuNP70 were determined by DLS, and surface charge by zeta potential, using a Malvern Zetasizer Nano-ZS (ZEN3600) (Malvern Instruments Inc., Westborough, MA).

PMN isolation: PMNs were isolated from venous blood of healthy volunteers by dextran sedimentation followed by centrifugation over Ficoll-Hypaque as previously described (Babin et al., 2013; Poirier et al., 2014). Blood donations were obtained from informed and consenting individuals according to institutionally approved procedures.

Cell viability: Freshly isolated human PMNs (10×10^6 cells/mL in RPMI-1640 HEPES-P/S, supplemented with 10% heat-inactivated autologous serum) were treated for 24 h with or without increasing concentrations of AuNPs ranging from 0 to 100 μ g/mL. Cell viability was monitored by trypan blue exclusion and remained $\geq 95\%$ (data not shown).

Assessment of apoptosis by cytology and by flow cytometry: PMNs (10×10^6 cells/mL suspension in RPMI-1640 supplemented with 10% autologous serum) were incubated at 37 °C in 5% CO₂ in 96-well plates for 24 h with the indicated agonists. At this time point, normally 30–50% of cells are in apoptosis (Moisan and Girard, 2006; Poirier et al., 2014). For some experiments, cells were pre-treated 30 min with or without z-VAD-FMK (50 μ M). For cytology, cells were cytocentrifuged on microscope slides, stained with the Hema 3 staining kit and examined by light microscopy at $\times 400$ final magnification. Apoptotic neutrophils were defined as cells containing one or more characteristic darkly stained pyknotic nuclei (Poirier et al., 2014). Results were expressed as the percentage of PMNs in apoptosis. For the flow cytometric procedure, PMNs were stained with FITC annexin-v or FITC anti-human CD16. Ten thousand cells were analyzed by FACSscan (Becton-Dickinson, San Jose, CA) using CellQuest program (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

Cell morphology and cellular uptake of AuNPs: Freshly isolated human PMNs (10×10^6 cells/mL in RPMI-1640 HEPES-P/S, supplemented with 10% heat-inactivated autologous serum) were treated for 24 h with or without increasing concentrations of AuNPs ranging from 0 to 100 μ g/mL. The morphological cell shape changes were observed under light microscopy ($\times 400$ magnification), and photomicrographs were taken using a Nikon Eclipse TS100 camera (Melville, NY) as previously published (Girard et al., 1997). Evaluation of cell size and inner complexity was determined by flow cytometry (Suzuki et al., 2007). Briefly, freshly isolated human PMNs (10×10^6 cells/mL in RPMI-1640 HEPES-P/S) were treated with or without 100 μ g/mL AuNPs for 30 min

and data for cell size (forward scattered light height (H)) and inner complexity (side scattered light height (H)) were acquired by flow cytometry using a FACScan (BD Biosciences, San Jose, CA) as we documented previously (Poirier et al., 2014).

Transmission electron microscopy: To visualize potential cell internalization of the NPs, freshly isolated PMNs were incubated (10×10^6 cells/mL) with 100 μ g/mL of AuNP20 or AuNP70 or with the equivalent volume of HBSS for 1 h or 24 h. Cells were then fixed overnight with 2.5% glutaraldehyde in PBS. After several washes in PBS with 3% sucrose, cells were fixed with 1.3% OsO₄ for 2 h and embedded in Spurr resin. Thin slices were prepared with an ultramicrotome and stained with 5% uranyl acetate and filtered lead citrate. Examinations of ultrathin sections (total of 50–70 cells/sample) were examined using a Hitachi H-7100 transmission electron microscope as described (Poirier et al., 2014; Simard et al., 2015a).

Western blot analysis: Cells (10×10^6 cells/mL) were incubated with the indicated agonists for the specified periods of time and then harvested for the preparation of cell lysates in Laemmli's sample buffer. Aliquots corresponding to 500,000 cells were loaded and subjected to 7.5–10% SDSpolyacrylamide gel electrophoresis and transferred from the gel to PVDF or nitrocellulose membranes. The membranes were blocked for 1 h at room temperature in 5% milk in TBS-Tween (25 mM Tris–HCl, pH 7.8, 190 mM NaCl, 0.15% Tween-20). After washing, a dilution of 1:1000 was used for vimentin, gelsolin, caspase-3, caspase-4, caspase-7 and caspase-9, IRE1 and p-IRE1 antibodies and 1:500 for lamin B1, ATF-6, PERK and p-PERK in TBS-Tween 0.15%. The membranes were kept overnight at 4 °C, then washed with TBS-Tween, and incubated for 1 h at room temperature with HRP-labeled goat anti-mouse IgG antibody (1:25,000) or a HRP-labeled goat anti-rabbit IgG antibody (1:25,000) followed by several washes. Protein expression was revealed using Clarity™ Western ECL (Bio-Rad). Membranes were stripped with ReBlot Plus Strong (Millipore) and reprobed with anti-GAPDH, anti- β -actin or other indicated antibodies to confirm equal loading of proteins. Chemiluminescence was revealed with a chemiDoc™ MP Imaging system from Bio-Rad.

Cell surface expression of cytoskeletal proteins by flow cytometry: PMNs (10×10^6 cells/mL RPMI-HEPES–P/S) were incubated at 37 °C, 5% CO₂, in the presence of the

indicated agonist for 24 h and cell surface expression of vimentin, gelsolin and lamin B1 was determined as previously documented (Moisan and Girard, 2006). 2.10. Statistical analysis The data are reported as mean \pm SEM and were analyzed by one-way ANOVA (repeated measures ANOVA) and differences of each treatment vs. control were assessed by the Dunnett post-test using GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA). For experiments containing 2 groups, data are reported as mean \pm SEM and were analyzed with a two-way ANOVA and differences between each treatment vs. vehicle were assessed with Bonferroni post-test. Differences were considered significant as follows: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ vs control or appropriate diluent.

RESULTS

Characterization of AuNPs

TEM images from the manufacturer revealed that the average diameter of AuNP20 was 18.6 nm and AuNP70 was 67.5 nm. For DLS analyses, AuNPs were suspended in RPMI-1640 containing 10% human serum, the medium used throughout all experiments. A bimodal distribution of 5.6 nm (3.6%) and 106.4 nm (96.4%) for AuNP20 was observed, indicating that these NPs form aggregates in the experimental conditions used. However, a unimodal distribution with a size of 75.3 nm (100%) was observed for AuNP70. Both AuNPs had very similar zeta potential of -8.6 ± 0.3 and -8.6 ± 0.9 mV for AuNP20 and AuNP70, respectively, while the polydispersity index (PDI) was 0.43 and 0.098, in the same order. We have also determined these parameters when the NPs were suspended in water only and observed again a bimodal distribution with a size of 34.9 ± 1.5 (99.2%) and 11000 nm (0.8%) for AuNP20. An unimodal distribution with a size of 73.7 ± 0.2 nm (100% of intensity) was observed for AuNP70. However, the zeta potential values were -41.3 ± 1.7 and -50.0 ± 0.6 mV for AuNP20 and AuNP70, respectively. In the same order, the PDI values were 0.17 ± 0.006 and 0.18 ± 0.01 .

Effect of AuNPs on PMN apoptosis

Fig. 1A illustrates that AuNP20 significantly increases PMN apoptosis at a concentration of 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$ while such effect was observed with treatment of 25, 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$ AuNP70. From these results, we selected the concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$ AuNPs for the rest of the study, a concentration also used with other NPs previously found to alter the biology of human PMNs (Babin et al., 2013; Goncalves et al., 2010; Goncalves and Girard, 2014; Poirier et al., 2014). Typical images of normal (arrowheads) and apoptotic (arrows) PMNs are illustrated in **Fig. 1B**.

We next wanted to confirm the proapoptotic activity of AuNPs by two other classical assays using flow cytometry by determining the number of annexin-v positive cells and by monitoring CD16 shedding at the surface of apoptotic PMNs. Also, we were interested to determine if the proapoptotic effect of AuNPs could be observed earlier than 24 h. As illustrated in **Fig. 2A**, both AuNP20 and AuNP70 increase the apoptotic rate after 12 h when tested by cytology (also after 24 h, as expected (**Fig. 2D**)), although

significance was observed only with AuNP70. Intriguingly, both AuNPs did not significantly increase the number of annexin-v positive cells (**Fig. 2B** and **Fig. 2E**) and did not induce CD16 shedding (**Fig. 2C** and **Fig. 2F**) after 12 h and 24 h despite the fact that VAA-I, as expected, increased the number of annexin-v positive cells (Savoie et al., 2000) and induced CD16 shedding (Lavastre et al., 2004). As illustrated in **Fig. 2G**, treatment with z-VAD-FMK (z-VAD) inhibited the proapoptotic effect of both AuNPs, decreasing the apoptotic rate close to the one observed in controls.

Effect of AuNPs on cell morphology and evaluation of the cell size and inner complexity in AuNP-induced human PMNs

We next determined that cell morphology of AuNP70-treated neutrophils remained with a round/spherical cell shape, indicating that cells are not activated (**Fig. 3A**). However, AuNP20-treated cells harbored an elongated phenotype, normally observed in spread or adherent neutrophils, suggesting a sort of activation state (Girard et al., 1997). The inner complexity of the cells after incubation with NPs are usually a good indicator of their cellular uptake (Suzuki et al., 2007). We have then monitored potential uptake of AuNPs by human PMNs using flow cytometry, as we have recently performed with silver nanoparticles (Poirier et al., 2014). However, we did not observe an increase of inner complexity and/or of cell size in PMNs treated with AuNP20 or AuNP70, suggesting no or weakly cellular uptake of AuNPs (**Fig. 3B**). TEM confirmed the presence of few AuNP20 inside small cytosolic vacuoles while AuNP70 were located outside of (but in close contact with) the cellular membrane of PMNs (Fig. 4). However, after 24 h, both AuNP20 and AuNP70 were found inside cells, but only few NPs/cell (5–10) were observed. These NPs could be observed freely in the cytosol, close to the nucleus as well as inside vacuole-like structures (**Fig. 5**).

AuNPs activate processing of caspase-3, -7 and -9 in PMNs

Processing and activation of caspases is a well-documented response occurring during PMN apoptosis (McCracken and Allen, 2014). Knowing that caspases are involved in AuNP20- and AuNP70-induced PMN apoptosis, we next monitored processing of effector caspase-3, -7 and -9. Western blot experiments revealed that both AuNPs

induce processing of all three pro-form of caspases (procaspases) into the corresponding activating fragments (**Fig. 6**).

Activation of caspase-4 processing and ER stress-mediated cell death by AuNPs

Because z-VAD-FMK is known as a caspase-1, -3, -4 and -7 inhibitor, we also determined whether or not AuNPs could activate caspase-4 processing known to be involved during ER stress **Fig. 7A** shows that AuNPs were found to induce processing of procaspase-4 into caspase-4 fragment. In these experiments, tunicamycin (Tuni), an ER stressor known to activate caspase-4 (Oda et al., 2008), was used as a positive control. Next, we verified the capacity of AuNPs to induce ER stress events in human PMNs, a response recently identified to occur in these cells (Binet et al., 2010). Activation of the three sensors of protein folding status in the ER, IRE1, PERK and ATF-6, was determined in AuNP-induced PMNs. As illustrated in **Fig. 7B**, AuNPs activate PERK and IRE1, as evidenced by an increase expression of their respective phosphorylation states. For ATF-6, its cleavage/ processing into the ATF-6 cleaved form was observed in AuNP-induced PMNs.

AuNPs induce degradation of cytoskeletal proteins but not their cell surface expression during PMN apoptosis.

Because caspases induce cytoskeleton breakdown during PMNs apoptosis (Binet et al., 2006; Lavastre et al., 2002; Savoie et al., 2000), we monitored potential degradation of cytoskeletal proteins in AuNPs-treated PMNs. As shown in **Fig. 8A**, AuNP20, but not AuNP70, induces the degradation of vimentin and lamin B1. Both AuNPs, however, induce the degradation of gelsolin. Cell surface expression of cytoskeletal proteins, including vimentin and lamin B1, was recently observed during spontaneous human PMN apoptosis (Moisan and Girard, 2006; Simon et al., 2013). Surprisingly, in contrast to VAA-I, AuNPs had no effect on the cell surface expression lamin B1 (**Fig. 8B**), gelsolin (**Fig. 8C**) and vimentin (**Fig. 8D**).

DISCUSSION

In the present study, we report the direct effect of AuNPs on human neutrophil apoptosis. We found that both AuNP20 and AuNP70 induce PMN apoptosis with a similar potency. Various exogenous agents are also known to regulate positively or negatively PMN apoptosis (Binet et al., 2006; Cox and Austin, 1997; Stringer et al., 1996; Ward et al., 1999), including VAA-I used in the present study as a proapoptotic control (Lavastre et al., 2002). More recently, NPs have emerged as a new class of agents possessing apoptotic modulatory activities in human neutrophils. For example, titanium dioxide and zinc oxide NPs were shown to delay PMN apoptosis, whereas silver nanoparticles induced this biological process (Goncalves et al., 2010; Goncalves and Girard, 2014; Poirier et al., 2014). In the present study, the results demonstrate that AuNP20 and AuNP70 induce PMN apoptosis by a caspase-dependent mechanism. Interestingly, we showed that AuNP-treated PMNs clearly harbored the classical apoptotic phenotype of PMNs (cell shrinkage and pyknotic nucleus). However, based on annexin-v expression, the typical flip-flop process of the phosphatidylserine from the inner to the outer surface of the plasma membrane do not appear to occur in response to AuNPs. Moreover, CD16 shedding from the cell surface normally occurring in human PMNs was absent in AuNP-induced PMNs. This is not without any precedent since a crude hydroalcoholic extract from the Brazilian plant *Esenbeckia leiocarpa* was previously found to be proapoptotic without inducing CD16 shedding (de Liz et al., 2012). However, unlike AuNPs, this plant extract increased binding of annexin-V on apoptotic PMNs, but not the cleavage of the cytoskeletal vimentin protein. Therefore, AuNPs also induce atypical apoptosis in human PMNs. Because of the importance of the production of reactive oxygen species during the PMN apoptotic process, it would be interesting to investigate in future if AuNP70 and/or AuNP20 can induce oxidative stress and if this is involved in apoptosis

Metalloproteases and serine protease are known to be involved in CD16 shedding upon neutrophil cell death (Bazil and Strominger, 1994). It is tempting to speculate that AuNPs might interfere with the degradation of this receptor through an interaction by inhibiting such proteases, but this needs to be confirmed. The clear evidences that AuNP70 is at least in close contact with the cellular membrane as observed by TEM after 1 h are in

agreement with this. It is also possible that AuNP70 interferes with the binding of CD16 specific antibody at the cell surface. This is in agreement with the previous study proposing that AuNPs with a size of 60 nm (close to AuNP70) influence the membrane surface potential (Chekanov et al., 2013) mentioned above. However, unlike AuNP70, AuNP20 does not appear preferentially to 'stick' at the cell membrane of PMNs after 1 h as evidenced by TEM, but acts similarly than AuNP70. These results testify on how complex is the mode of action of NPs in regulating PMN apoptosis. However, after 24 h, both AuNP70 and AuNP20 can be found inside PMNs, but only few NPs (b10) are observed free in the cytosol, close to the nucleus or into vacuolelike structures. This indicates that the cellular uptake of the larger AuNP70 probably required more time to enter the cells than AuNP20.

Cytoskeletal proteins normally remain inside the cells, being sequestered from the immune system. However, several patients suffering from rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, and other autoimmune diseases, possess high level of autoantibodies directed against cytoskeletal proteins (Fhied et al., 2014; Girard and Senecal, 1995; Shrivastav et al., 2002). Curiously, apart important tissue necrosis in an individual that could lead to cell release, a situation that is not necessarily frequent, the origin of such autoantibodies remain elusive. Recently, among different cytoskeletal proteins, we demonstrated that, yet, only a few are expressed at the cell surface of apoptotic PMNs, a conditions that could favor autoantibody formation. These include the intermediate filament proteins vimentin and lamin B1 (Moisan and Girard, 2006) and the two actin-binding membraneanchoring proteins moesin and ezrin (Simon et al., 2013). Here we demonstrated that AuNPs did not lead to cell surface expression of vimentin, lamin B1 and gelsolin in apoptotic PMNs, indicating that the mechanisms underlying AuNP-induced PMN cell death is different than spontaneous or VAA-I-induced apoptosis. On the other hand, similarly to VAA-I, we also observed processing of effector caspases -3, -7 and -9. Interestingly, many cytoskeletal proteins, such as gelsolin and vimentin, are known substrates of caspases (Kothakota et al., 1997; Morishima, 1999).

In addition, we demonstrated that AuNPs activate caspase-4, an ER resident caspase known to be involved in the ER stress-mediated cell death pathway (Hitomi et al., 2004),

a pathway that was recently found by us to be operational in PMNs (Binet et al., 2010). To the best of our knowledge, only two studies have reported the effects of AuNPs on ER stress-mediated cell death, and this was not performed with human primary cells such as PMNs. The first one was not testing the effects of naked AuNPs, but rather the effects of PEGylated nanogel containing AuNPs. Although ER stress-induced cell apoptosis pathway was not studied in depth, the authors reported that their NPs slightly increased the protein expression of IRE1 and the constitutively-expressed resident protein of the ER binding immunoglobulin protein (BiP) also known as 78 kDa glucose-regulated protein (GRP-78) in murine squamous cell carcinoma and in human lung carcinoma A549 cell lines (Yasui et al., 2014). They also reported a weak phosphorylation of PERK in the murine squamous cell carcinoma line. In the other study, using proteomic techniques, Tsai and colleagues described AuNPs as efficient cellular ER stress elicitors (Tsai et al., 2011). The initial size of the three AuNPs used in their study was 1 ± 0.1 , 6.4 ± 1.4 and 29.1 ± 5.4 nm for the NPs considered by the authors as small, medium and large. Only the larger size present some aggregates with a size ~ 150 nm ($\sim 29\%$). Then, they used the AuNPs with medium size for the rest of their study in the human chronic myelogenous leukemia cell line. They found that AuNPs activate caspase-3, but this was observed after several hours of treatment (Tsai et al., 2011), unlike the present study. In addition, they do not verify activation of other caspases, especially caspase-4 normally associated with ER stress. Nevertheless, this interesting study indicates that AuNPs induce ER stress as evidenced by modulation of the protein expression of several ER stress markers. Unlike our study in which we investigated activation of the three ER sensors, they only monitored the phosphorylation of PERK and not that of IRE-1 and they do not determine if ATF-6 was cleaved. In fact, our data are probably the first ones demonstrating that caspase-4 is activated by AuNPs and that these NPs also activate ATF-6, an important ER stress sensor. Activation of ATF-6 by AuNPs is in agreement with our recent study performed in silver NPs-induced human THP-1 monocytes where ATF-6 activation was probably reported for the very first time (Simard et al., 2015b). In fact, activation of ER stress by NPs is a recent area of research. Interestingly, Tsai et al., using TEM, reported that clusters of AuNPs were found to be associated with the cell membrane, in agreement with our results obtained

with AuNP70. Although we did not observe such an association with AuNP20, a size closer to that used by Tsai et al. (Tsai et al., 2011), this could be explained by the fact that the cell types used in both studies are quite different. However, they also reported that K562 cells endocytosed AuNPs, in agreement with our results.

AuNP70 and AuNP20 were characterized by DLS under the same experimental conditions (i.e. in the presence of 10% autologous serum) used to investigate PMN apoptosis. AuNP70 appears homogeneously suspended in the medium, whereas AuNP20 forms small aggregates. Similar aggregation of other NPs was reported by us (Babin et al., 2013; Poirier et al., 2014). It is however impossible, at this point, to determine the respective effects of the NP itself or its aggregates on PMNs, considering the presence of both in each experiment. One study reported that the agglomeration state of gold nanosized particles had no significant effect on pulmonary inflammation (Gosens et al., 2010). It is however possible to speculate that smaller particles are internalized more easily by cells. Indeed, at least one study reported a better internalization of smaller AuNPs (Cho et al., 2010). In this study, the authors have examined the effects of size, shape, and surface chemistry of Au nanospheres of 15 or 45 nm and Au nanocages of 33 or 55 nm on their uptake by human breast cancer SK-BR-3 cells. Interestingly, in some cases, they found that the uptake of Au nanostructures by the cells was influenced not only by size and shape, but that the dependency, especially for shape could also vary when the surface of the NP was covered by different functional groups (Cho et al., 2010). Different studies reported a size-dependent toxicity of AuNPs where smaller particles were more toxic in various cell lines and in rodents (Mironava et al., 2010; Pan et al., 2007; Zhang et al., 2011). In contrast to other reports, our results indicate that AuNPs do not induce cell necrosis after 24 h of treatment (Pan et al., 2007; Villiers et al., 2010). However, in agreement with our data, other studies previously reported a proapoptotic effect of AuNPs in dermal fibroblasts and HeLa cells, but ER stress events were not studied (Mironava et al., 2010; Pan et al., 2007; Villiers et al., 2010). The importance of investigating how a given agent could modulate apoptosis and by which cell apoptotic pathway is of biological importance. For example, Du et al., demonstrated that a mixture of the anticancer drug arsenic trioxide (an ER stressor) with the tyrosine kinase inhibitor, imatinib mesylate, induced markedly

more cell apoptosis than imatinib mesylate alone in chronic myeloid leukemia cells (Du et al., 2006). This was explained by the fact that imatinib mesylate induce mainly the intrinsic pathway of cell apoptosis, whereas arsenic trioxide induces the ER stress-mediated pathway of cell apoptosis. Therefore, a combination of the two agents results in a more effective and efficient induction of programmed cell death in K562 cells. Knowing that AuNPs alone can activate the ER stressmediated apoptotic pathway in human PMNs, and knowing the importance of these cells in inflammation, the capacity of combining a given proapoptotic agent with AuNPs opens the possibility for the development of new therapeutic strategies not only in cancer, but also in inflammation. Moreover, such a strategy of mixing different drugs/ agents could lead to a medication with less adverse effects, since the concentration of each compound could be decreased as much as possible as long as the proapoptotic effect is preserved.

In summary, this study provides new insights in the comprehension of the cytotoxicity of AuNPs in human PMNs. We report, for the first time, that AuNPs are important ER stressors of human PMNs. Although we observed degradation of a few cytoskeletal proteins, their expression was not found at the cell surface, indicating a mechanism of action different than classical proapoptotic agents. This was also supported by the fact that PMNs were CD16 positive and annexin-v negative even if they harbored the classical hallmarks of PMN apoptosis, cell shrinkage and pyknotic nucleus. The fact that AuNPs did not induce cell surface expression of cytoskeletal proteins on apoptotic PMNs could decrease potential adverse effects and toxicity of AuNPs by limiting the production of autoantibody against cytoskeleton components. Moreover, their ability to activate ER stress events in PMNs could be advantageously used with other agents for the coordination of intrinsic, extrinsic, and ER stress-induced apoptosis pathways resulting in a more effective and efficient induction of apoptosis

ACKNOWLEDGMENTS

The study was partially supported by grants from the Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST 2010–0021) and from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC: RGPIN–2015–04894).

FIGURE LEGENDS

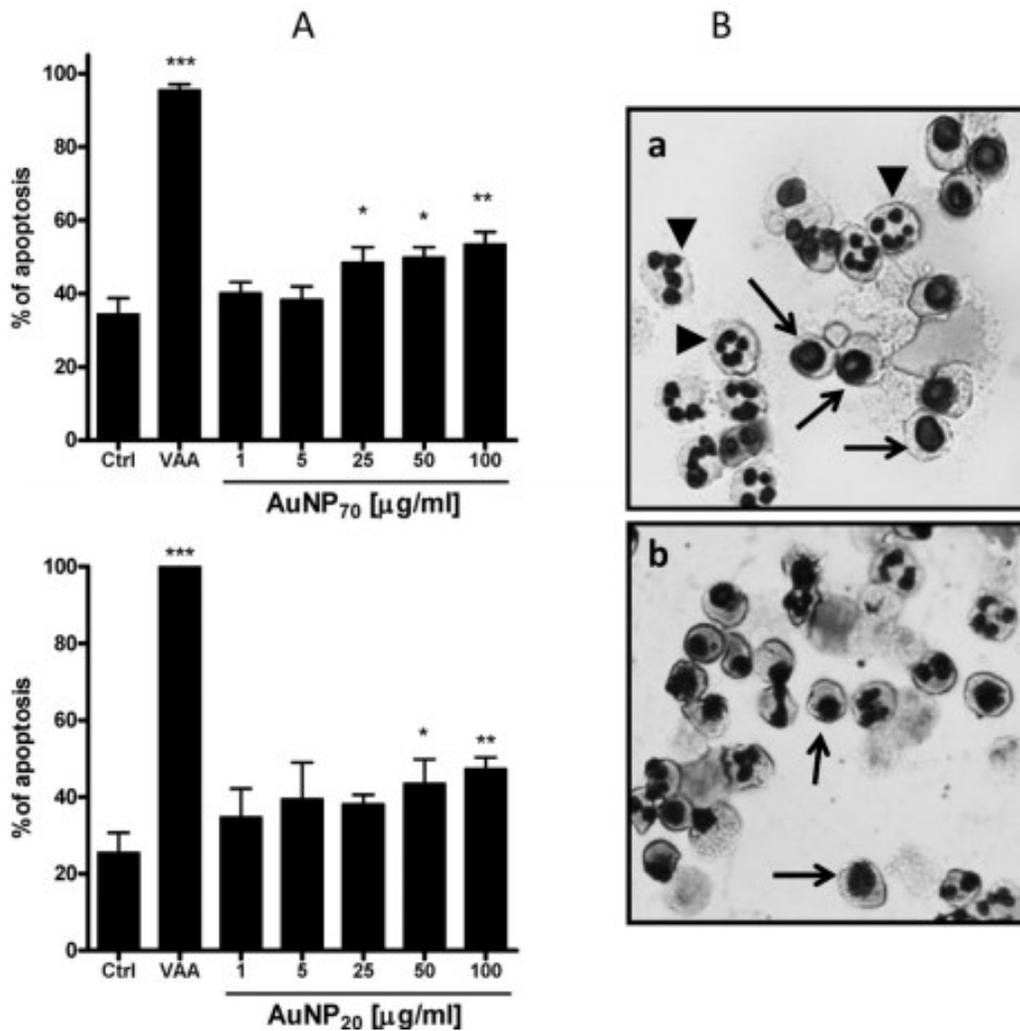


Fig. 1. AuNPs induce PMN apoptosis in a dose-dependent manner. Cells (10×10^6 cells/mL) were treated for 24 h with buffer (Ctrl), an increasing concentration of AuNP70 (A, top panel) or AuNP20 (A, bottom panel) or with 1 $\mu\text{g/ml}$ VAA-I (VAA). Apoptosis was evaluated by cytology by counting the number of PMNs harboring a pyknotic nucleus as described in Materials and methods section. Representative images of neutrophils treated with buffer (Ctrl) or with 100 $\mu\text{g/ml}$ AgNP₂₀ are shown in panel B. Arrows, apoptotic cells; arrowheads, normal cells. A, data are means \pm SEM ($n \geq 3$); B, images are from one representative blood donor out of six.

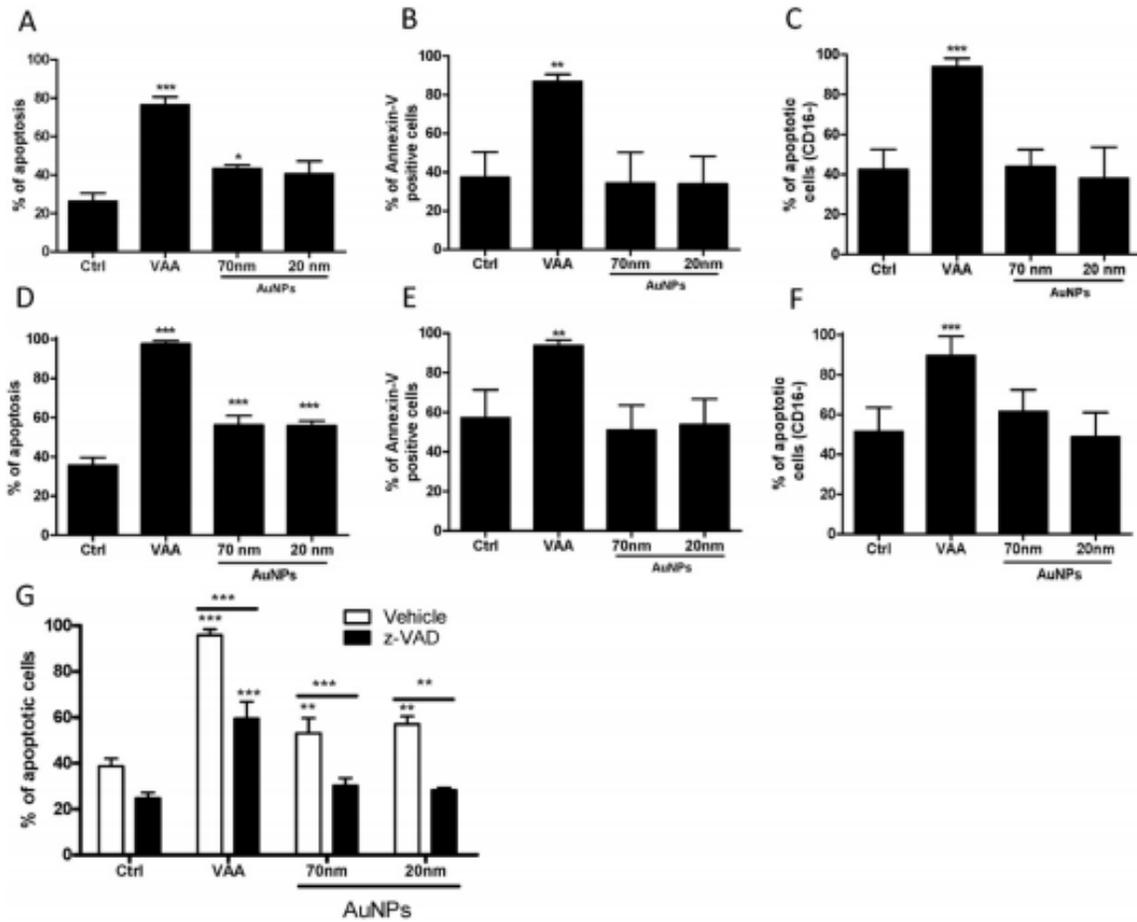


Fig. 2. AuNPs induce PMN apoptosis by a caspase-dependent mechanism. Cells (10×10^6 cells/mL) were treated for 12 h (A–C) or 24 h (D–G) with buffer (Ctrl), $1 \mu\text{g/mL}$ of VAA-I (VAA) or $100 \mu\text{g/mL}$ of AuNP70 or AuNP20. Apoptosis was assessed by cytology (A,D,G) or flow cytometry (B,C,E,F) by evaluating the number of annexin-v positive (B,E) or CD16 negative (C,F) cells as described in Materials and methods section. In panel G, cells were pretreated 30 min with the corresponding diluent (vehicle) or $50 \mu\text{M}$ of the pan caspase inhibitor z-VAD-FMK (z-VAD) before being treated with the indicated agonists and apoptosis was evaluated by cytology. Data are means \pm SEM ($n \geq 3$).

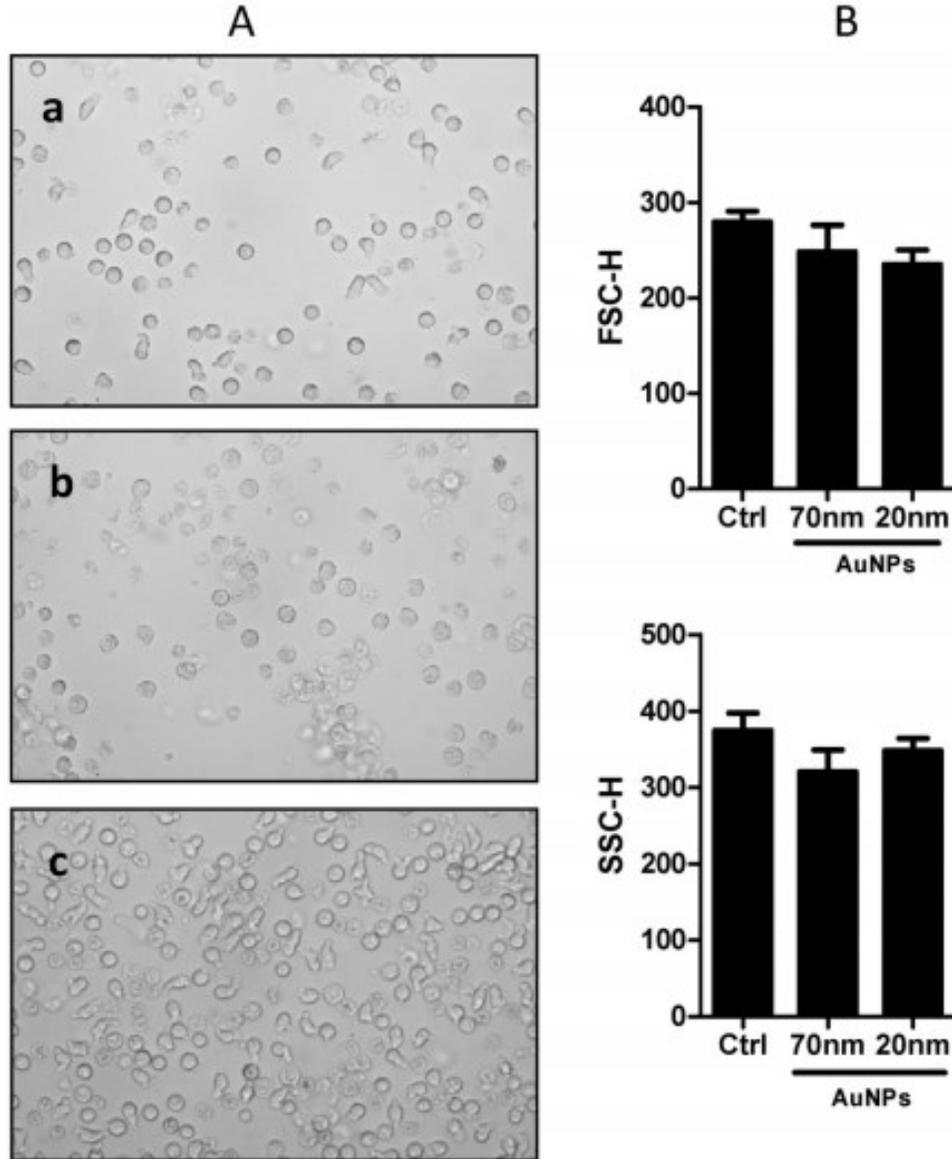


Fig. 3 . Effect of AuNPs on cell morphology and evaluation of the cell size and inner complexity in AuNP-induced human PMNs. The cell morphology was evaluated by light microscopy at a 400× final magnification in buffer-, AuNP70- or AuNP20-induced PMNs (A, panels a–c, respectively). Cell size (FSC) and inner complexity (SSC) were determined by flow cytometry (B) as detailed in Materials and methods section. Data are means \pm SEM (A, top: n = 3; bottom: n = 5; C, top and bottom n = 5). B, data are from one representative experiment out of 3.

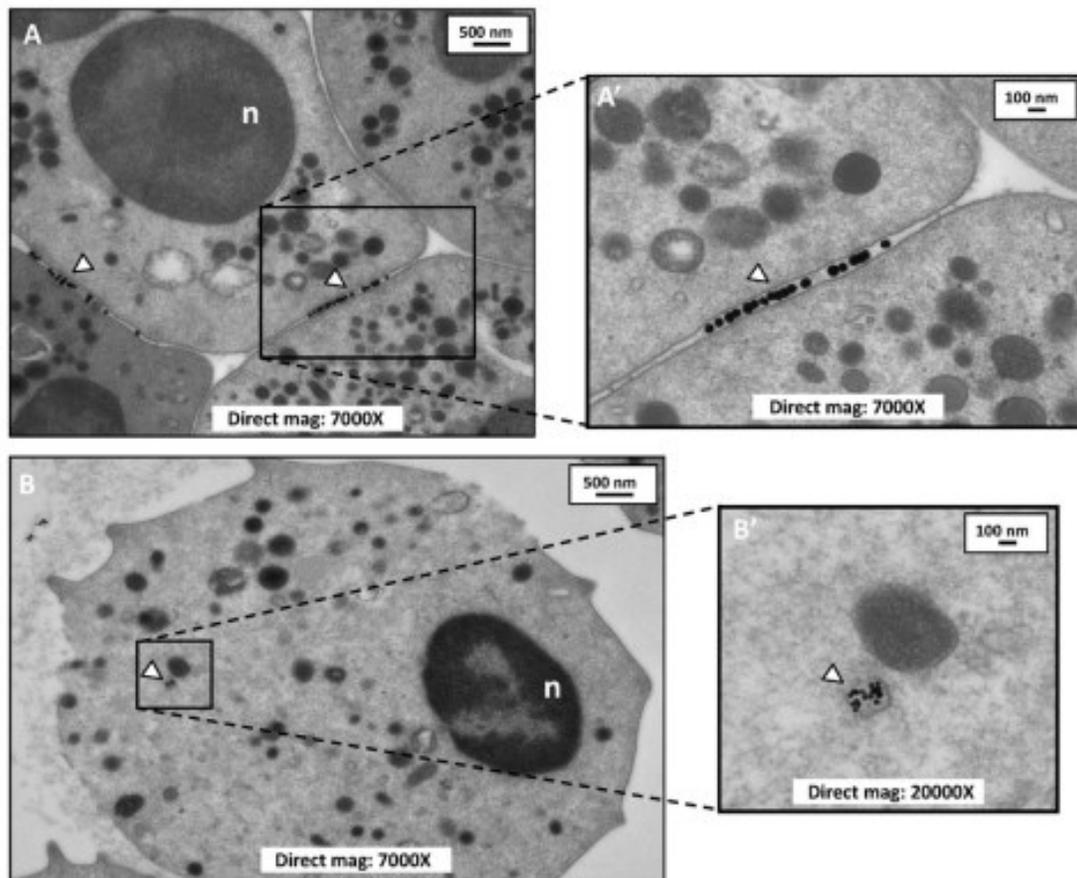


Fig. 4. Cellular uptake of AuNP70 and AuNP20 by PMNs as determined by TEM. Presence of AuNP70 and AuNP20 was evaluated by TEM, as described in Materials and methods section. Cells (10×10^6 cells/mL) were treated for 1 h with the $100 \mu\text{g/mL}$ of AuNP70 (A–A') or AuNP20 (B, B') and then prepared for TEM analysis. Data are from one representative blood donor out of three. n, nucleus.

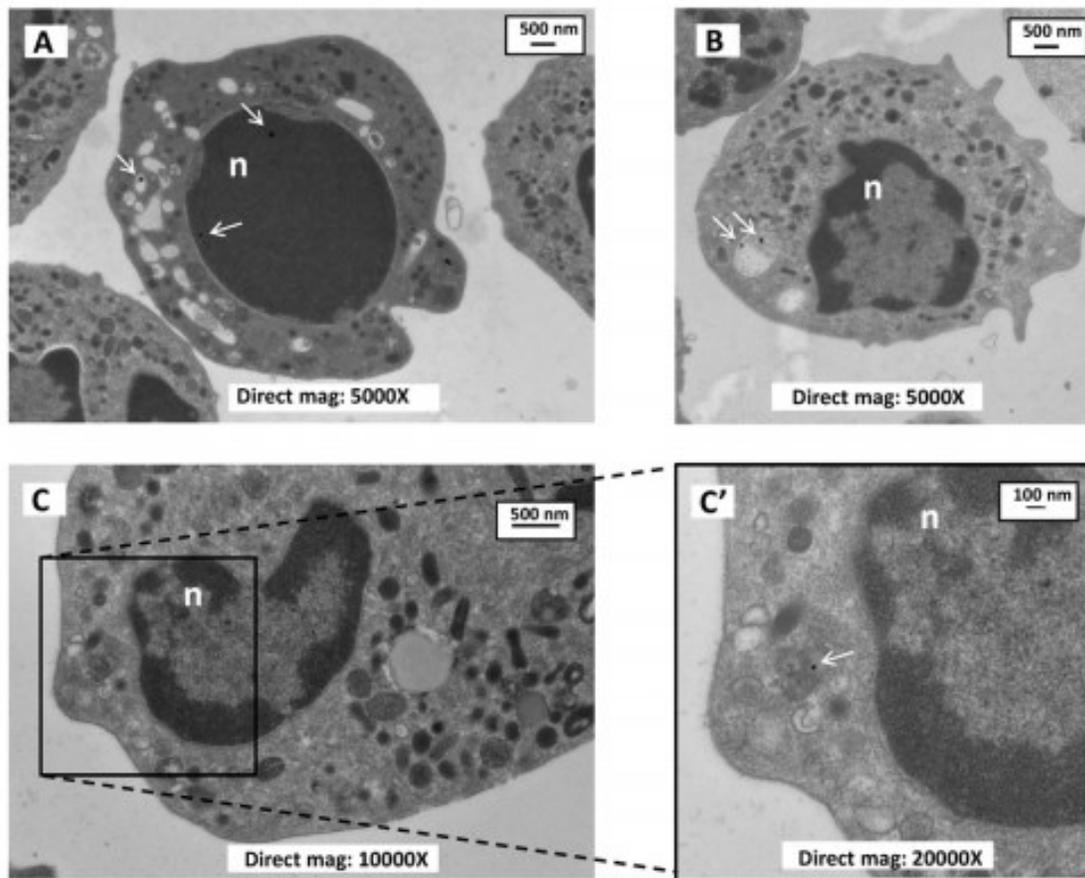


Fig. 5. AuNP70 could be observed inside human PMNs after a longer period of incubation. The cellular uptake of AuNP70 and AuNP20 was evaluated by TEM after a 24 h period of incubation with cells and TEM was performed as described in Materials and methods. Cells (10×10^6 cells/mL) were treated for 24 h with the $100 \mu\text{g/mL}$ of AuNP70 (A and B) or AuNP20 (C, C') and then prepared for TEM analysis. Data are from one representative blood donor out of three. n, nucleus.

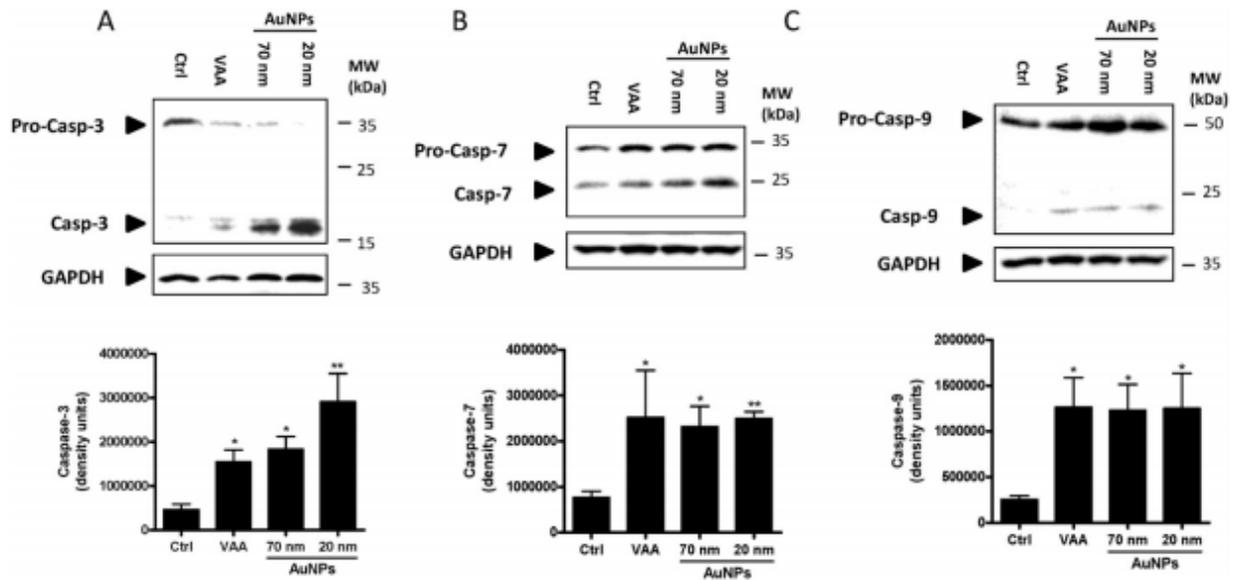


Fig. 6. AuNPs induce processing of caspases-3, -7 and -9 in PMNs. Cells (10×10^6 cells/mL) were treated for 3 h with buffer (Ctrl), $1 \mu\text{g/mL}$ of VAA-I (VAA) or $100 \mu\text{g/mL}$ of AuNP70 or AuNP20. Processing of the procaspase-3, -7, and -9 forms was monitored by western blots as described in the Materials and methods section. Data are from one representative experiment out of three. Graphs represent densitometric analyses of the active fragments of each caspases and are expressed as means \pm SEM ($n = 3$). GAPDH was used as control of protein loading.

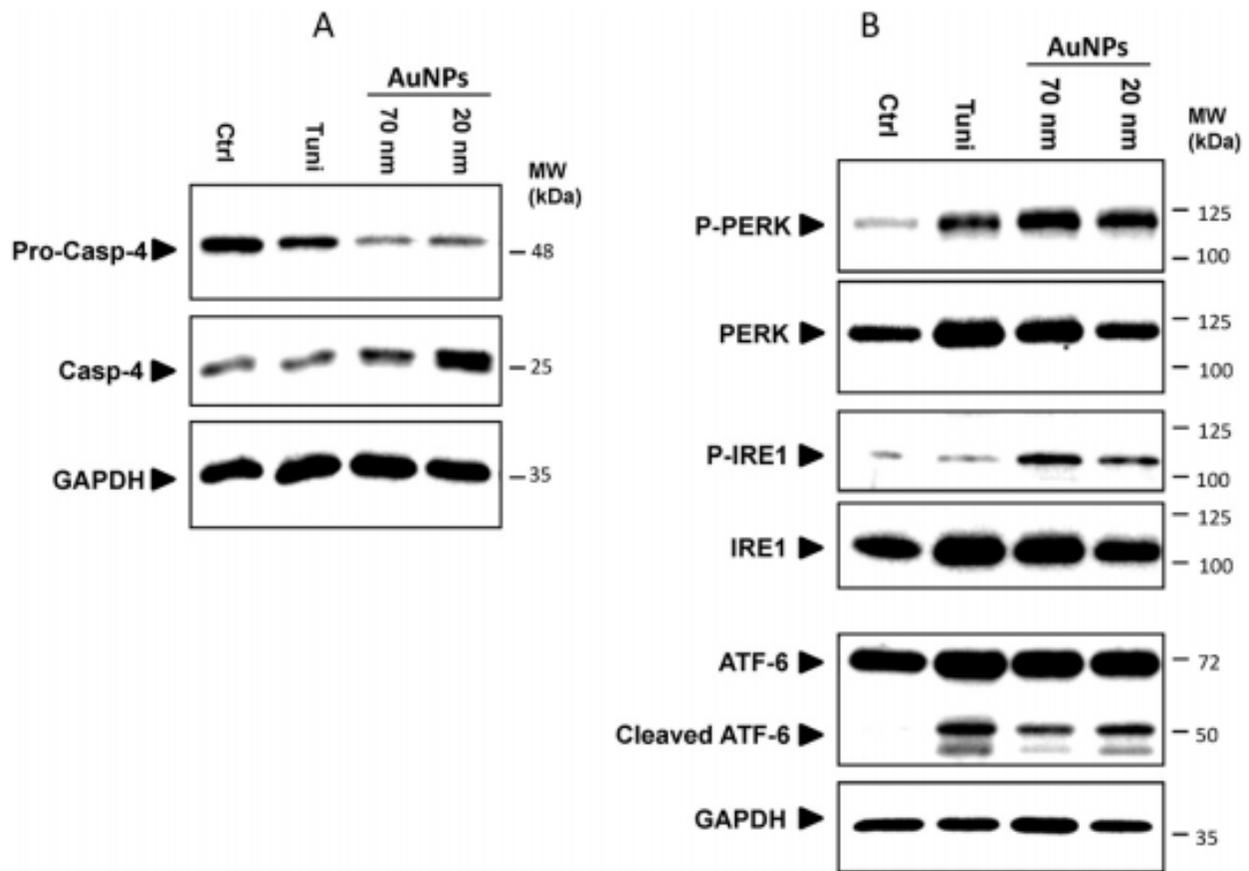


Fig. 7. AuNPs induce caspase-4 processing and activate the ER-stress sensors in PMNs. Cells (10×10^6 cells/mL) were treated for 3 h with buffer (Ctrl), $5 \mu\text{g/mL}$ of the ER stressor tunicamycin (tuni) or $100 \mu\text{g/mL}$ of AuNP70 or AuNP20 and processing of caspase-4 (A) or protein expression of the phosphorylated form of PERK (p-PERK), IRE1 (p-IRE1) and processing of ATF-6 were determined by western blots and β -actin was used as control of protein loading.

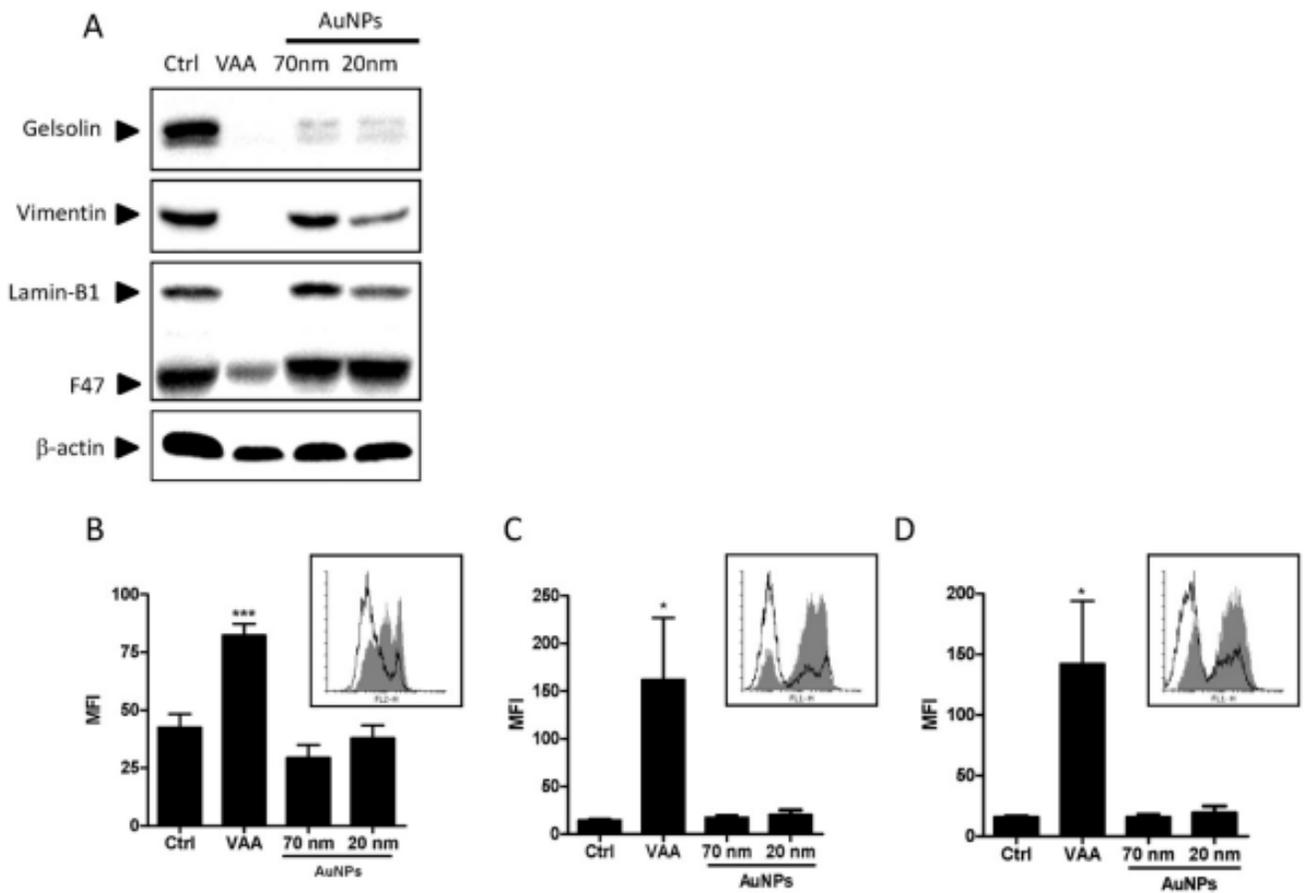


Fig. 8. AuNPs induce degradation but not cell surface expression of cytoskeletal proteins in apoptotic PMNs. Cells (10×10^6 cells/mL) were treated for 24 h with buffer (Ctrl), $1 \mu\text{g/mL}$ of VAA-I (VAA), $100 \mu\text{g/mL}$ of AuNP70 or AuNP20 and cytoskeletal protein degradation was performed by western blots (A) and cell surface expression of lamin B1 (B), gelsolin (C) or vimentin (D) by flow cytometry as described in Materials and methods section. Data are from one representative experiment out of three (A) or were expressed as Mean Fluorescence Intensity (MFI) and are plotted as means \pm SEM ($n = 3$). Inset: representative overlay data of the cell surface expression of cytoskeletal proteins in cells treated with VAA-I (gray) vs control (white).

REFERENCES

- Aalapati, S., Ganapathy, S., Manapuram, S., Anumolu, G., Prakya, B.M., 2014. Toxicity and bio-accumulation of inhaled cerium oxide nanoparticles in CD1 mice. *Nanotoxicology* 8, 786-798.
- Almeida, J.P., Figueroa, E.R., Drezek, R.A., 2014. Gold nanoparticle mediated cancer immunotherapy. *Nanomedicine* 10, 503-514.
- Babin, K., Antoine, F., Goncalves, D.M., Girard, D., 2013. TiO₂, CeO₂ and ZnO nanoparticles and modulation of the degranulation process in human neutrophils. *Toxicol Lett* 221, 57-63.
- Bazil, V., Strominger, J.L., 1994. Metalloprotease and serine protease are involved in cleavage of CD43, CD44, and CD16 from stimulated human granulocytes. Induction of cleavage of L-selectin via CD16. *J Immunol* 152, 1314-1322.
- Bharali, D.J., Mousa, S.A., 2010. Emerging nanomedicines for early cancer detection and improved treatment: current perspective and future promise. *Pharmacol Ther* 128, 324-335.
- Binet, F., Cavalli, H., Moisan, E., Girard, D., 2006. Arsenic trioxide (AT) is a novel human neutrophil pro-apoptotic agent: effects of catalase on AT-induced apoptosis, degradation of cytoskeletal proteins and de novo protein synthesis. *Br J Haematol* 132, 349-358.
- Binet, F., Chiasson, S., Girard, D., 2010. Evidence that endoplasmic reticulum (ER) stress and caspase-4 activation occur in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 391, 18-23.
- Brandenberger, C., Rowley, N.L., Jackson-Humbles, D.N., Zhang, Q., Bramble, L.A., Lewandowski, R.P., Wagner, J.G., Chen, W., Kaplan, B.L., Kaminski, N.E., Baker, G.L., Worden, R.M., Harkema, J.R., 2013. Engineered silica nanoparticles act as adjuvants to enhance allergic airway disease in mice. *Part Fibre Toxicol* 10, 26.
- Chekanov, A.V., Baranova, O.A., Levin, A.D., Solov'eva, E., Fedin, A.I., Kazarinov, K.D., 2013. [Study of the influence of gold nanoparticles on activation of human blood neutrophils]. *Biofizika* 58, 495-500.

Cho, E.C., Au, L., Zhang, Q., Xia, Y., 2010. The effects of size, shape, and surface functional group of gold nanostructures on their adsorption and internalization by cells. *Small* 6, 517-522.

Cox, G., Austin, R.C., 1997. Dexamethasone-induced suppression of apoptosis in human neutrophils requires continuous stimulation of new protein synthesis. *J Leukoc Biol* 61, 224-230.

Daniel, M.C., Astruc, D., 2004. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chem Rev* 104, 293-346.

de Liz, R., Horst, H., Pizzolatti, M.G., Frode, T.S., Girard, D., 2012. Activation of human neutrophils by *Esenbeckia leiocarpa*: comparison between the crude hydroalcoholic extract (CHE) and an alkaloid (Alk) fraction. *J Inflamm (Lond)* 9, 19.

Dieudé, M., Sénécal, J.-L., Rauch, J., Hanly, J.G., Fortin, P., Brassard, N., Raymond, Y., 2002. Association of autoantibodies to nuclear lamin B1 with thromboprotection in systemic lupus erythematosus: Lack of evidence for a direct role of lamin B1 in apoptotic blebs. *Arthritis & Rheumatism* 46, 2695-2707.

Du, Y., Wang, K., Fang, H., Li, J., Xiao, D., Zheng, P., Chen, Y., Fan, H., Pan, X., Zhao, C., Zhang, Q., Imbeaud, S., Gaudens, E., Eveno, E., Auffray, C., Chen, S., Chen, Z., Zhang, J., 2006. Coordination of intrinsic, extrinsic, and endoplasmic reticulum-mediated apoptosis by imatinib mesylate combined with arsenic trioxide in chronic myeloid leukemia. *Blood* 107, 1582-1590.

Eustis, S., el-Sayed, M.A., 2006. Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. *Chem Soc Rev* 35, 209-217.

Fhied, C., Kanangat, S., Borgia, J.A., 2014. Development of a bead-based immunoassay to routinely measure vimentin autoantibodies in the clinical setting. *J Immunol Methods* 407, 9-14.

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

Girard, D., Senecal, J.L., 1995. Anti-microfilament IgG antibodies in normal adults and in patients with autoimmune diseases: immunofluorescence and immunoblotting analysis of 201 subjects reveals polyreactivity with microfilament-associated proteins. *Clin Immunol Immunopathol* 74, 193-201.

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

Goncalves, D.M., Girard, D., 2014. Zinc oxide nanoparticles delay human neutrophil apoptosis by a de novo protein synthesis-dependent and reactive oxygen species-independent mechanism. *Toxicol In Vitro* 28, 926-931.

Gosens, I., Post, J.A., de la Fonteyne, L.J., Jansen, E.H., Geus, J.W., Cassee, F.R., de Jong, W.H., 2010. Impact of agglomeration state of nano- and submicron sized gold particles on pulmonary inflammation. *Part Fibre Toxicol* 7, 37.

Hitomi, J., Katayama, T., Eguchi, Y., Kudo, T., Taniguchi, M., Koyama, Y., Manabe, T., Yamagishi, S., Bando, Y., Imaizumi, K., Tsujimoto, Y., Tohyama, M., 2004. Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death. *J Cell Biol* 165, 347-356.

Huang, X., El-Sayed, M.A., 2010. Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. *Journal of Advanced Research* 1, 13-28.

Hussain, S., Vanoirbeek, J.A., Luyts, K., De Vooght, V., Verbeken, E., Thomassen, L.C., Martens, J.A., Dinsdale, D., Boland, S., Marano, F., Nemery, B., Hoet, P.H., 2011. Lung exposure to nanoparticles modulates an asthmatic response in a mouse model. *EUR Respir J* 37, 299-309.

Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry, T.J., Kirschner, M.W., Kohts, K., Kwiatkowski, D.J., Williams, L.T., 1997. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278, 294-298.

Labens, R., Lascelles, B.D., Charlton, A.N., Ferrero, N.R., Van Wettere, A.J., Xia, X.R., Bliklager, A.T., 2013. Ex vivo effect of gold nanoparticles on porcine synovial membrane. *Tissue Barriers* 1, e24314.

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

Lavastre, V., Pelletier, M., Saller, R., Hostanska, K., Girard, D., 2002. Mechanisms involved in spontaneous and *Viscum album* agglutinin-I-induced human neutrophil apoptosis: *Viscum album* agglutinin-I accelerates the loss of antiapoptotic Mcl-1 expression and the degradation of cytoskeletal paxillin and vimentin proteins via caspases. *J Immunol* 168, 1419-1427.

Li, G.H., Arora, P.D., Chen, Y., McCulloch, C.A., Liu, P., 2012. Multifunctional roles of gelsolin in health and diseases. *Med Res Rev* 32, 999-1025.

McCracken, J.M., Allen, L.A., 2014. Regulation of human neutrophil apoptosis and lifespan in health and disease. *J Cell Death* 7, 15-23.

Mironava, T., Hadjiargyrou, M., Simon, M., Jurukovski, V., Rafailovich, M.H., 2010. Gold nanoparticles cellular toxicity and recovery: effect of size, concentration and exposure time. *Nanotoxicology* 4, 120-137.

Moisan, E., Girard, D., 2006. Cell surface expression of intermediate filament proteins vimentin and lamin B1 in human neutrophil spontaneous apoptosis. *J Leukoc Biol* 79, 489-498.

Morishima, N., 1999. Changes in nuclear morphology during apoptosis correlate with vimentin cleavage by different caspases located either upstream or downstream of Bcl-2 action. *Genes Cells* 4, 401-414.

Oda, T., Kosuge, Y., Arakawa, M., Ishige, K., Ito, Y., 2008. Distinct mechanism of cell death is responsible for tunicamycin-induced ER stress in SK-N-SH and SH-SY5Y cells. *Neurosci Res* 60, 29-39.

Pan, Y., Neuss, S., Leifert, A., Fischler, M., Wen, F., Simon, U., Schmid, G., Brandau, W., Jahnke-Dechent, W., 2007. Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small* 3, 1941-1949.

Poirier, M., Simard, J.C., Antoine, F., Girard, D., 2014. Interaction between silver nanoparticles of 20 nm (AgNP20) and human neutrophils: induction of apoptosis and

inhibition of de novo protein synthesis by AgNP20 aggregates. *J Appl Toxicol* 34, 404-412.

Savoie, A., Lavastre, V., Pelletier, M., Hajto, T., Hostanska, K., Girard, D., 2000. Activation of human neutrophils by the plant lectin *Viscum album* agglutinin-I: modulation of de novo protein synthesis and evidence that caspases are involved in induction of apoptosis. *J Leukoc Biol* 68, 845-853.

Shrivastav, M., Mittal, B., Aggarwal, A., Misra, R., 2002. Autoantibodies against cytoskeletal proteins in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 21, 505-510.

Simard, J.C., Vallieres, F., de Liz, R., Lavastre, V., Girard, D., 2015a. Silver Nanoparticles Induce Degradation of the Endoplasmic Reticulum Stress Sensor Activating Transcription Factor-6 Leading to Activation of the NLRP-3 Inflammasome. *J Biol Chem*.

Simard, J.C., Vallieres, F., de Liz, R., Lavastre, V., Girard, D., 2015b. Silver Nanoparticles Induce Degradation of the Endoplasmic Reticulum Stress Sensor Activating Transcription Factor-6 Leading to Activation of the NLRP-3 Inflammasome. *J Biol Chem* 15, 610899.

Simon, M.M., Simard, J.C., Girard, D., 2013. *Viscum album* agglutinin-I (VAA-I) increases cell surface expression of cytoskeletal proteins in apoptotic human neutrophils: moesin and ezrin are two novel targets of VAA-I. *Hum Exp Toxicol* 32, 1097-1106.

Skuland, T., Ovreivik, J., Lag, M., Schwarze, P., Refsnes, M., 2014. Silica nanoparticles induce cytokine responses in lung epithelial cells through activation of a p38/TACE/TGF- α /EGFR-pathway and NF-kappaBeta signalling. *Toxicol Appl Pharmacol* 279, 76-86.

Stringer, R.E., Hart, C.A., Edwards, S.W., 1996. Sodium butyrate delays neutrophil apoptosis: role of protein biosynthesis in neutrophil survival. *Br J Haematol* 92, 169-175.

Sumbayev, V.V., Yasinska, I.M., Garcia, C.P., Gilliland, D., Lall, G.S., Gibbs, B.F., Bonsall, D.R., Varani, L., Rossi, F., Calzolari, L., 2013. Gold nanoparticles downregulate interleukin-1beta-induced pro-inflammatory responses. *Small* 9, 472-477.

Suzuki, H., Toyooka, T., Ibuki, Y., 2007. Simple and easy method to evaluate uptake potential of nanoparticles in mammalian cells using a flow cytometric light scatter analysis. *Environ Sci Technol* 41, 3018-3024.

Thebault, S., Gilbert, D., Hubert, M., Drouot, L., Machour, N., Lange, C., Charlionet, R., Tron, F., 2002. Orderly pattern of development of the autoantibody response in (New Zealand White x BXSB)F1 lupus mice: characterization of target antigens and antigen spreading by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *J Immunol* 169, 4046-4053.

Torres, M., Coates, T.D., 1999. Function of the cytoskeleton in human neutrophils and methods for evaluation. *J Immunol Methods* 232, 89-109.

Tsai, C.Y., Shiau, A.L., Chen, S.Y., Chen, Y.H., Cheng, P.C., Chang, M.Y., Chen, D.H., Chou, C.H., Wang, C.R., Wu, C.L., 2007. Amelioration of collagen-induced arthritis in rats by nanogold. *Arthritis Rheum* 56, 544-554.

Tsai, Y.Y., Huang, Y.H., Chao, Y.L., Hu, K.Y., Chin, L.T., Chou, S.H., Hour, A.L., Yao, Y.D., Tu, C.S., Liang, Y.J., Tsai, C.Y., Wu, H.Y., Tan, S.W., Chen, H.M., 2011. Identification of the nanogold particle-induced endoplasmic reticulum stress by omic techniques and systems biology analysis. *ACS Nano* 5, 9354-9369.

Ventola, C.L., 2012. The nanomedicine revolution: part 1: emerging concepts. *P T* 37, 512-525.

Villiers, C., Freitas, H., Couderc, R., Villiers, M.B., Marche, P., 2010. Analysis of the toxicity of gold nano particles on the immune system: effect on dendritic cell functions. *J Nanopart Res* 12, 55-60.

Ward, C., Dransfield, I., Chilvers, E.R., Haslett, C., Rossi, A.G., 1999. Pharmacological manipulation of granulocyte apoptosis: potential therapeutic targets. *Trends Pharmacol Sci* 20, 503-509.

Yasui, H., Takeuchi, R., Nagane, M., Meike, S., Nakamura, Y., Yamamori, T., Ikenaka, Y., Kon, Y., Murotani, H., Oishi, M., Nagasaki, Y., Inanami, O., 2014. Radiosensitization of tumor cells through endoplasmic reticulum stress induced by PEGylated nanogel containing gold nanoparticles. *Cancer Lett* 347, 151-158.

Zhang, X.D., Wu, D., Shen, X., Liu, P.X., Yang, N., Zhao, B., Zhang, H., Sun, Y.M., Zhang, L.A., Fan, F.Y., 2011. Size-dependent in vivo toxicity of PEG-coated gold nanoparticles. *Int J Nanomedicine* 6, 2071-2081.

SECTION 3: DISCUSSION ET CONCLUSION

L'utilisation des NP dans plusieurs domaines entre autres en médecine, semble avoir un avenir prometteur. En effet, leur taille leur permet d'interagir avec les biomolécules des cellules qui sont de tailles similaires. De plus, elles permettent aux particules d'acquérir de nouvelles caractéristiques intéressantes pour la nanomédecine comme l'acquisition de propriétés fluorescentes (Buzea *et al.*, 2007, Simon-Deckers, 2008). Dans ce mémoire, nous avons étudié les AuNP ayant des propriétés pour les diagnostics et traitements de diverses maladies, tel le cancer (Almeida *et al.*, 2014, Bhattacharyya *et al.*, 2011). En effet, en utilisant les AuNP, il est possible de leur coupler des anticorps reconnaissant des antigènes spécifiques à des maladies précises, ce qui en fait de bons candidats pour la détection (Bhattacharyya *et al.*, 2011, Gerber *et al.*, 2013, Parida *et al.*, 2012, Yen *et al.*, 2009). Mais la NP peut également permettre d'éliminer des cellules néfastes grâce à sa propriété photothermique (Kennedy *et al.*, 2011, Yen *et al.*, 2009). Cette caractéristique lui donne la possibilité d'emmagasiner l'énergie d'un rayon lumineux afin de le transformer en chaleur pouvant tuer la cellule. Lors du traitement, le patient recevrait tout simplement une injection intraveineuse d'AuNP, puis à l'aide d'un rayon infrarouge, il serait possible de détruire les cellules qui ont internalisé les NP. Durant leur parcours dans le sang, les NP seront en contact avec diverses cellules, dont les cellules du système immunitaire (Kennedy *et al.*, 2011). C'est pourquoi il est important de mieux connaître l'interaction des NP avec les divers types cellulaires contenus dans le sang.

Il existe peu d'études sur l'interaction entre les NP et le neutrophile, une des cellules immunitaires qui joue un rôle primordial lors de l'inflammation et d'une infection. Chez l'humain, les neutrophiles représentent la majorité des leucocytes totaux circulant dans le sang, soit environ 60 à 75 %. De plus, ils ont un rôle important à jouer au site inflammatoire, puisqu'ils sont les premières cellules recrutées et permettent de moduler la réponse inflammatoire (Janeway *et al.*, 2009, Serhan, 2010). La modulation des fonctions des neutrophiles par les AuNP pourrait avoir de grandes répercussions sur la destruction d'un agent infectieux, la modulation de l'inflammation ou la résolution de celle-ci. Dans cette étude, nous avons étudié différentes fonctions des neutrophiles à la suite de leur contact avec des AuNP de différents diamètres, soit de 20 nm et 70 nm, respectivement.

Avant tout, nous avons observé de quelle façon les AuNP pouvaient réagir avec le milieu biologique contenant du sérum. Comme mentionné précédemment, le milieu biologique peut agir sur leur agrégation (Agency, 2009, Buzea *et al.*, 2007, Ostiguy *et al.*, 2008). Le milieu que nous utilisons afin de réaliser les tests sur les neutrophiles est un milieu RPMI-1640 contenant 10% de sérum autologue. Les NP ont été diluées dans ce milieu afin d'obtenir la concentration

utilisée tout au long des analyses, soit 100 µg/mL. La distribution de la taille est mesurée par la diffraction de la lumière à l'aide d'un appareil nommé Nanosizer. Les résultats ont montré que les AuNP de 70 nm de diamètre ne subissaient aucune modification, leur diamètre était le même que celui indiqué par le fournisseur. Cet effet n'est pas observé chez les AuNP de 20 nm. En effet, les résultats obtenus montrent une augmentation correspondant environ à cinq fois le diamètre initial donné par le fournisseur. Cette conséquence peut résulter d'une agglomération des particules entre elles ou bien d'une liaison des protéines contenues dans le sérum formant une couche à la surface de la NP appelée corona (Agency, 2009, Borregaard *et al.*, 1997). Ce changement de taille peut avoir des répercussions sur l'effet des AuNP. En effet, une étude a montré que les AuNP de 50 nm lorsqu'elles étaient inhalées causaient un plus grand recrutement de leucocytes au niveau des poumons que celles de 50 nm qui étaient en agrégats (Gosens *et al.*, 2010). Donc, le milieu dans lequel les NP se trouvent peut influencer leurs interactions avec les neutrophiles.

Par la suite, nous avons déterminé l'effet des AuNP sur les fonctions des neutrophiles. Tout d'abord, nous avons déterminé si la présence des NP dans l'environnement causait des changements morphologiques. De précédentes études ont montré que la présence de NP engendre une modification de la morphologie des neutrophiles. En effet, en présence de ZnO, les neutrophiles ont tendance à prendre une forme allongée signe de leur activation (D. Girard *et al.*, 1996, Goncalves *et al.*, 2014). En ce qui concerne les AuNP, seules les NP de 20 nm semblent faire varier la morphologie de la cellule par rapport aux cellules non stimulées. Donc, uniquement les NP de 20 nm causent une activation des neutrophiles. Afin de mieux comprendre pourquoi les AuNP de 70 nm ne semblaient pas activer les cellules comparées à celles de 20 nm, nous avons observé l'interaction entre la cellule et la particule à l'aide de microscopie électronique. La localisation des NP par rapport aux cellules peut influencer le comportement des neutrophiles. Par exemple, il fut montré que lorsque les fibroblastes sont mis en contact avec les AuNP de 13 nm, ces particules se retrouvent à l'intérieur de vacuoles dans la cellule. Après un certain temps, les vacuoles peuvent se rompre et causer des effets néfastes aux cellules (Mironava *et al.*, 2010). Nos observations ont permis de réaliser que les différents diamètres n'interagissent pas de la même manière avec les neutrophiles. Les NP de 20 nm vont se retrouver internalisées à l'intérieur de la cellule. Elles sont retrouvées à l'intérieur d'une vésicule, étant donné la présence d'une membrane entourant les NP. Cette observation permet de conclure que l'internalisation de celles-ci est réalisée de manière active. Pour celles de 70 nm, l'effet est différent : les NP sont retrouvées à la surface des cellules. Lorsque l'on observe attentivement les images, il serait possible de croire que ces NP peuvent regrouper les

neutrophiles les uns près des autres. Il peut s'agir uniquement d'un effet causé par le nombre trop important de neutrophiles dans l'échantillon, mais il faudrait confirmer ce résultat en diminuant ce nombre.

Étant donné l'effet différentiel des deux NP sur la morphologie et la capacité d'internalisation de ces NP par les neutrophiles, nous avons étudié certaines fonctions de ces cellules, dont l'apoptose. La régulation de l'apoptose des neutrophiles est très importante. Sachant que nous avons précédemment montré que les AgNP de différents diamètres, soit 20 et 70 nm, pouvaient induire respectivement un effet proapoptotique et antiapoptotique (Poirier *et al.*, 2014), nous avons émis l'hypothèse qu'il pourrait en être de même pour les AuNP, c'est-à-dire qu'un effet différentiel selon les diamètres serait observé. Cependant, nos résultats montrent que pour les deux diamètres testés, il y a une induction de l'apoptose. En effet, lors de l'évaluation du taux d'apoptose, il y avait une augmentation de celle-ci par rapport à l'apoptose spontanée des neutrophiles. Ces observations permettent de dire que les AuNP de 20 et 70 nm testées sont toutes deux proapoptotiques.

Les tests d'apoptose ont principalement été réalisés par observations cytologiques; le taux de cellules au noyau pycnotique comparé à celui des cellules au noyau polylobé. Afin de confirmer nos résultats, nous avons utilisé d'autres tests permettant de détecter l'apoptose. Tout d'abord, la présence du récepteur CD16 à la surface de cellules a été étudiée. Chez le neutrophile, il fut montré que lors de l'apoptose il y avait une diminution de ce récepteur à la surface de la cellule (Dransfield *et al.*, 1994). La diminution des récepteurs CD16 à la surface n'est pas observée lors de l'apoptose induite par les AuNP. Une telle observation avait déjà été réalisée lors de l'apoptose induite par un extrait de plante brésilienne *Esenbeckia leiocarpa* (De Liz *et al.*, 2012). Cependant, pour ce composé, il est possible d'observer l'apoptose par expression à la surface de phosphatidylsérines, ce qui n'est pas le cas pour les AuNP. L'effet de « flip-flop » des phosphatidylsérines de l'intérieur vers l'extérieur est un indice de l'apoptose, cependant il ne semble pas induit lors de l'apoptose par les AuNP. Ces deux effets anormaux portent à croire que les AuNP peuvent interagir avec les différentes molécules analysées, inhibant ainsi la liaison de l'anticorps dirigé contre le CD16 ou la protéine d'annexine V qui s'associe aux phosphatidylsérines. La présence des NP de 70 nm à la surface des cellules lors de l'observation en microscopie électronique semble un bon indice pour étayer cette hypothèse. Cependant, ce n'est pas le cas avec les NP de 20 nm qui sont retrouvées à l'intérieur des cellules et qui pourtant créent le même effet lors de l'apoptose. Cette observation porte à croire que ces résultats inattendus peuvent-être causés par le type d'apoptose créé par les NP qui est

différent de l'apoptose habituelle observée chez le neutrophile. Afin de confirmer cette hypothèse, il serait possible de vérifier l'absence des phosphatidylsérines à l'extérieur de la cellule grâce à la détection de la présence de ces phospholipides à l'intérieur de cette dernière. Une autre méthode serait d'observer l'activité des protéases qui clivent le récepteur CD16, les métalloprotéases et protéases à sérine, afin de détecter si elle est affectée par la présence des NP (Bazil *et al.*, 1994).

L'apoptose implique l'activation des caspases. Dans le cas des AuNP de 20 et 70 nm, nous avons noté la participation des caspases. La diminution du taux d'apoptose par cytologie lors de la présence de l'inhibiteur de pan-caspases Z-VAD est un bon indice de la participation des caspases dans l'apoptose créée par les AuNP. Puisque nous avons déterminé l'implication globale des caspases, nous avons porté une attention particulière aux caspases 3, 7 et 9. Les caspases 3 et 7 sont des caspases effectrices qui peuvent dégrader diverses protéines (Kroemer, 2007, Luo *et al.*, 2008, Simon, 2003). Elles correspondent toutes les deux aux dernières étapes de l'apoptose par voies intrinsèque et extrinsèque, tandis que la caspase 9 est activée uniquement lors de l'activation de la voie intrinsèque. Cette voie est activée lors de la libération du cytochrome c de la mitochondrie qui par la suite va permettre l'homodimérisation et l'activation de la caspase 9 par une coupure au niveau de la procaspase 9. Pour les trois différents types de caspases, leur activation était engendrée lors de l'apoptose par les NP de 20 et 70 nm. Puisqu'au départ, nous croyions que les NP étaient internalisées par les cellules, nous avons porté notre attention sur ces trois caspases qui font partie de la voie intrinsèque. De plus, puisque les caspases 3 et 7 sont impliquées dans la voie extrinsèque, l'observation de leur activation aurait pu être un bon indice dans l'activation de cette voie dans le cas où la caspase 9 n'aurait pas été activée (Kroemer, 2007, Luo *et al.*, 2008, Simon, 2003). Cependant, il aurait été intéressant de voir si la voie extrinsèque est également sollicitée lors de l'apoptose par les AuNP, étant donné que nous avons vu par microscopie électronique que les NP de 70 nm pouvaient se retrouver à la surface. Cette observation aurait permis d'en connaître davantage sur le mode d'action des NP sur l'apoptose des neutrophiles humains.

Nous avons également déterminé l'état d'activation de la caspase 4 suivant la stimulation aux AuNP. Cette caspase inflammatoire est reconnue pour avoir un rôle à jouer dans l'apoptose par voie du stress du réticulum endoplasmique. Cette relation avait déjà été établie lors de la stimulation de la voie du réticulum par le trioxyde d'arsenic (Binet, 2010). La présence des AuNP amène l'activation de la voie du réticulum endoplasmique en induisant la phosphorylation de PERK et IRE1 et la coupure d'ATF-6 en sa forme active. L'activation de cette voie peut être une

cause de l'augmentation de l'apoptose. Afin de peaufiner cette section de l'étude, il serait intéressant de savoir de quelle manière les NP induisent la voie du réticulum endoplasmique parmi les suivantes : une accumulation du nombre de protéines mal repliées excédant la capacité des protéines chaperonnes, une augmentation de la synthèse des protéines, une altération de la réserve de calcium dans le lumen du réticulum endoplasmique, un stress oxydatif, une perturbation de potentiel redox au niveau du lumen du réticulum ou toutes autres actions propres aux NP.

Précédemment, il fut discuté que les caspases effectrices pouvaient couper certaines protéines dans la cellule lors de l'apoptose créée par les NP. Parmi les protéines pouvant être clivées lors de l'apoptose, il y a les protéines du cytosquelette. Dans notre laboratoire nous avons montré précédemment que la vimentine et la gelsoline sont dégradées lors de l'apoptose spontanée du neutrophile humain et lors d'une apoptose induite par un agent, telle la VAA-I. La lamine B1 est elle aussi dégradée (Lavastre *et al.*, 2005, Lavastre *et al.*, 2002, Rogers *et al.*, 1992). Tout comme la VAA-I, utilisée comme témoin positif pour la dégradation des protéines du cytosquelette, les AuNP, pour les deux diamètres testés, peuvent couper la gelsoline. Pour la vimentine et la lamine B1, seulement les NP de 20 nm peuvent induire leur dégradation. Afin de confirmer qu'il s'agissait bel et bien de la dégradation et non d'une diminution de l'expression de la protéine, nous avons stimulé les cellules avec l'inhibiteur de caspase Z-VAD. Les analyses d'immunobuvardage ont montré que le niveau de protéines était semblable au témoin négatif lorsque les caspases étaient inhibées. Ceci montre que les effets observés sont bel et bien causés par une coupure des protéines par les caspases et non par une diminution de l'expression de la protéine causée par la présence de la NP. Il aurait pu être intéressant d'observer d'autres protéines du cytosquelette reconnues pour être clivées lors de l'apoptose telle la paxilline (Lavastre *et al.*, 2005).

Précédemment, nous avons montré la présence de certaines des protéines du cytosquelette à la surface des neutrophiles apoptotiques. En effet, la lamine B1 et la vimentine sont exprimées lors de l'apoptose spontanée alors que la VAA-I peut induire l'expression de la moésine et de l'eitrine à la surface des neutrophiles (Lavastre *et al.*, 2005, Lavastre *et al.*, 2002, Rogers *et al.*, 1992). Ces protéines exprimées à la surface sont favorables à la formation d'autoanticorps qui sont présents dans certains types de maladies comme la polyarthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux systémique ou d'autres maladies auto-immunes. En effet, dans ces types de maladies, on retrouve un grand nombre d'autoanticorps et ceux-ci sont plus particulièrement dirigés contre les protéines du cytosquelette (Fhied *et al.*, 2014, D. Girard *et al.*, 1995,

Shrivastav *et al.*, 2002). Nos observations ont montré que malgré leur capacité à dégrader certaines protéines du cytosquelette, les AuNP ne permettent pas l'expression de ces protéines à la surface des neutrophiles. Les NP, contrairement à la VAA-I, ne favoriseraient donc pas une production d'autoanticorps contre les protéines du cytosquelette.

En conclusion, les recherches réalisées dans ce mémoire ont permis de mieux comprendre le mécanisme d'action des AuNP, plus particulièrement celles de 20 et 70 nm, sur les neutrophiles humains. Bien que nos résultats aient été obtenus à l'aide d'expériences *in vitro*, nos différentes observations permettent de croire que l'utilisation des AuNP dans le traitement de certains types de maladies auto-immunes, comme la polyarthrite rhumatoïde, pourrait être une bonne option. L'une des caractéristiques de la polyarthrite rhumatoïde est la présence abondante de neutrophiles, soit environ 90 % des cellules retrouvées, dans le liquide synovial des personnes qui en souffrent (Nemeth *et al.*, 2012). Puisqu'ils se retrouvent en grand nombre, ils peuvent causer d'importants dommages par leurs diverses fonctions. Avec le temps, les neutrophiles vont mourir par apoptose spontanée et nous croyons qu'ils pourraient alors être la source d'antigènes contre certaines protéines du cytosquelette. Puisque les AuNP permettent l'apoptose des neutrophiles sans toutefois augmenter leur expression à la surface des protéines du cytosquelette, elles pourraient être de bons candidats dans le traitement de cette maladie. En effet, en permettant la mort des neutrophiles retrouvés en abondance sans toutefois créer des autoanticorps contre les protéines du cytosquelette, les cellules pourraient éviter d'attaquer les tissus des jointures (Rogers *et al.*, 1992).

Dans le cadre d'études ultérieures, des tests *in vivo* pourraient être réalisés. Il serait intéressant de voir si ces NP sont capables d'induire une réponse inflammatoire par les recrutements leucocytaires lorsqu'elles sont administrées dans un modèle murin de la poche d'air. De plus, il aurait été intéressant d'observer si ces effets sont variables selon la taille des NP ou si, tout comme lors des tests *in vitro* d'apoptose, les effets sont semblables. À la suite des résultats obtenus concernant l'apoptose et la dégradation des protéines du cytosquelette sans leur expression en surface, il aurait été intéressant de voir dans un modèle murin d'arthrite si les NP pourraient diminuer les symptômes ou même les faire disparaître lorsqu'elles sont administrées par voie intraveineuse ou cutanée. Tous les tests *in vivo* permettraient de mieux comprendre comment les NP agissent dans des contextes inflammatoires ainsi que leur capacité à participer à la résolution. De plus, il aurait pu être intéressant de voir quel est l'effet des AuNP sur les macrophages humains. Ces cellules ont la capacité de phagocyter les cellules apoptotiques et par le fait même, de résoudre l'inflammation, Puisque chez le neutrophile le taux de cellules

apoptotiques est augmenté en présence des AuNP, il serait important de savoir si les macrophages sont capables d'éliminer ces cellules mortes. Une déficience de la phagocytose des macrophages aurait de grands impacts sur la résolution de l'inflammation et augmenterait les risques de maladies inflammatoires.

RÉFÉRENCES

- Agency USEP (2009) Nanomaterial Research Strategy. Édit Agency USEP Washington, D.C.), p 44.
- Akgul C, Moulding DA & Edwards SW (2001) Molecular control of neutrophil apoptosis. *FEBS Lett* 487(3):318-322.
- Almeida JPM, Figueroa ER & Drezek RA (2014) Gold nanoparticle mediated cancer immunotherapy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 10(3):503-514.
- Arvizo R, Bhattacharya R & Mukherjee P (2010) Gold nanoparticles: Opportunities and Challenges in Nanomedicine. *Expert opinion on drug delivery* 7(6):753-763.
- Babior BM (1999) NADPH oxidase: an update. *Blood* 93(5):1464-1476.
- Bartneck M, Keul HA, Singh S, Czaja K, Bornemann J, Bockstaller M, Moeller M, Zwadlo-Klarwasser G & Groll J (2010a) Rapid uptake of gold nanorods by primary human blood phagocytes and immunomodulatory effects of surface chemistry. *ACS Nano* 4(6):3073-3086.
- Bartneck M, Keul HA, Zwadlo-Klarwasser G & Groll J (2010b) Phagocytosis independent extracellular nanoparticle clearance by human immune cells. *Nano Lett* 10(1):59-63.
- Bazil V & Strominger JL (1994) Metalloprotease and serine protease are involved in cleavage of CD43, CD44, and CD16 from stimulated human granulocytes. Induction of cleavage of L-selectin via CD16. *J Immunol* 152(3):1314-1322.
- Bergin IL & Witzmann FA (2013) Nanoparticle toxicity by the gastrointestinal route: evidence and knowledge gaps. *International journal of biomedical nanoscience and nanotechnology* 3(1-2):10.1504.
- Berry JP, Arnoux B, Stanislas G, Galle P & Chretien J (1977) A microanalytic study of particles transport across the alveoli: role of blood platelets. *Biomedicine* 27(9-10):354-357.
- Bhattacharyya S, Kudgus RA, Bhattacharya R & Mukherjee P (2011) Inorganic nanoparticles in cancer therapy. *Pharmaceutical research* 28(2):237-259.
- Binet F, Chiasson, S. and Girard, D. (2010) Evidence that endoplasmic reticulum (ER) stress and caspase-4 activation occur in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 391(1):18-23.
- Borregaard N (1997) Development of neutrophil granule diversity. *Ann N Y Acad Sci* 832:62-68.
- Borregaard N & Cowland JB (1997) Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 89(10):3503-3521.
- Borregaard N, Lollike K, Kjeldsen L, Sengelov H, Bastholm L, Nielsen MH & Bainton DF (1993) Human neutrophil granules and secretory vesicles. *Eur J Haematol* 51(4):187-198.

- Buzea C, Pacheco, II & Robbie K (2007) Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases* 2(4):MR17-71.
- Chang L & Goldman RD (2004) Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(8):601-613.
- Chithrani BD, Ghazani AA & Chan WC (2006) Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett* 6(4):662-668.
- Clark K, Nanda S & Cohen P (2013) Molecular control of the NEMO family of ubiquitin-binding proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14(10):673-685.
- Cross SE, Innes B, Roberts MS, Tsuzuki T, Robertson TA & McCormick P (2007) Human skin penetration of sunscreen nanoparticles: in-vitro assessment of a novel micronized zinc oxide formulation. *Skin Pharmacol Physiol* 20(3):148-154.
- De Jong WH, Hagens WI, Krystek P, Burger MC, Sips AJ & Geertsma RE (2008) Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials* 29(12):1912-1919.
- De Liz R, Horst H, Pizzolatti MG, Frode TS & Girard D (2012) Activation of human neutrophils by the anti-inflammatory mediator *Esenbeckia leiocarpa* leads to atypical apoptosis. *Mediators Inflamm* 2012:198-382.
- Derfus AM, Chan WCW & Bhatia SN (2004) Probing the Cytotoxicity of Semiconductor Quantum Dots. *Nano Letters* 4(1):11-18.
- Dewey CF, Jr., Bussolari SR, Gimbrone MA, Jr. & Davies PF (1981) The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress. *J Biomech Eng* 103(3):177-185.
- Donaldson K & Stone V (2003) Current hypotheses on the mechanisms of toxicity of ultrafine particles. *Ann Ist Super Sanita* 39(3):405-410.
- Donaldson K, Stone V, Tran CL, Kreyling W & Borm PJ (2004) Nanotoxicology. *Occup Environ Med* 61(9):727-728.
- dos Remedios CG, Chhabra D, Kekic M, Dedova IV, Tsubakihara M, Berry DA & Nosworthy NJ (2003) Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev* 83(2):433-473.
- Dransfield I, Buckle AM, Savill JS, McDowall A, Haslett C & Hogg N (1994) Neutrophil apoptosis is associated with a reduction in CD16 (Fc gamma RIII) expression. *J Immunol* 153(3):1254-1263.
- Engineering TRSTRAo (2004) Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties.), p 127.
- Faurschou M & Borregaard N (2003) Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect* 5(14):1317-1327.
- Fhied C, Kanangat S & Borgia JA (2014) Development of a bead-based immunoassay to routinely measure vimentin autoantibodies in the clinical setting. *J Immunol Methods* 407:9-14.

- Fox S, Leitch AE, Duffin R, Haslett C & Rossi AG (2010) Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. *J Innate Immun* 2(3):216-227.
- Fratoddi I, Venditti I, Cametti C & Russo MV (2014) Gold nanoparticles and gold nanoparticle-conjugates for delivery of therapeutic molecules. Progress and challenges. *Journal of Materials Chemistry B* 2(27):4204-4220.
- Gasperini S, Marchi M, Calzetti F, Laudanna C, Vicentini L, Olsen H, Murphy M, Liao F, Farber J & Cassatella MA (1999) Gene expression and production of the monokine induced by IFN-gamma (MIG), IFN-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC), and IFN-gamma-inducible protein-10 (IP-10) chemokines by human neutrophils. *J Immunol* 162(8):4928-4937.
- Gerber A, Bundschuh M, Klingelhofer D & Groneberg D (2013) Gold nanoparticles: recent aspects for human toxicology. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*:8-32.
- Girard D (2003) Phenotypic and functional change of neutrophils activated by cytokines utilizing the common cytokine receptor gamma chain. *Chem Immunol Allergy* 83:64-80.
- Girard D, Paquet ME, Paquin R & Beaulieu AD (1996) Differential effects of interleukin-15 (IL-15) and IL-2 on human neutrophils: modulation of phagocytosis, cytoskeleton rearrangement, gene expression, and apoptosis by IL-15. *Blood* 88(8):3176-3184.
- Girard D & Senecal JL (1995) Anti-microfilament IgG antibodies in normal adults and in patients with autoimmune diseases: immunofluorescence and immunoblotting analysis of 201 subjects reveals polyreactivity with microfilament-associated proteins. *Clin Immunol Immunopathol* 74(2):193-201.
- Goepel F, Weinmann P, Schymeinsky J & Walzog B (2004) Identification of caspase-10 in human neutrophils and its role in spontaneous apoptosis. *J Leukoc Biol* 75(5):836-843.
- Goncalves DM & Girard D (2014) Zinc oxide nanoparticles delay human neutrophil apoptosis by a de novo protein synthesis-dependent and reactive oxygen species-independent mechanism. *Toxicol In Vitro* 28(5):926-931.
- Gosens I, Post JA, de la Fonteyne LJ, Jansen EH, Geus JW, Cassee FR & de Jong WH (2010) Impact of agglomeration state of nano- and submicron sized gold particles on pulmonary inflammation. *Part Fibre Toxicol*:7-37.
- Hainfeld J, Dilmanian F, Zhong Z, Slatkin D, Kalef-Ezra J & Smilowitz H (2010) Gold nanoparticles enhance the radiation therapy of a murine squamous cell carcinoma. *Phys Med Biol* 55(11):3045 - 3059.
- Herre J, Gordon S & Brown GD (2004a) Dectin-1 and its role in the recognition of beta-glucans by macrophages. *Mol Immunol* 40(12):869-876.
- Herre J, Willment JA, Gordon S & Brown GD (2004b) The role of Dectin-1 in antifungal immunity. *Crit Rev Immunol* 24(3):193-203.

- Higaki M, Ishihara T, Izumo N, Takatsu M & Mizushima Y (2005) Treatment of experimental arthritis with poly(D, L-lactic/glycolic acid) nanoparticles encapsulating betamethasone sodium phosphate. *Ann Rheum Dis* 64(8):1132-1136.
- Hubbs AF, Sargent LM, Porter DW, Sager TM, Chen BT, Frazer DG, Castranova V, Sriram K, Nurkiewicz TR, Reynolds SH, Battelli LA, Schwegler-Berry D, McKinney W, Fluharty KL & Mercer RR (2013) Nanotechnology: toxicologic pathology. *Toxicol Pathol* 41(2):395-409.
- 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.
- Ilaria Fratoddi IV, Cesare Cametti and Maria Vittoria Russo (2014) How toxic are gold nanoparticles? the state-of-the-art © *Tsinghua University Press and Springer*:34.
- Janeway CA, Murphy K, Masson PL & Walport M (2009) *Immunobiologie*. De Boeck Supérieur,
- Kennedy LC, Bickford LR, Lewinski NA, Coughlin AJ, Hu Y, Day ES, West JL & Drezek RA (2011) A new era for cancer treatment: gold-nanoparticle-mediated thermal therapies. *Small* 7(2):169-183.
- Kessler R (2011) Engineered Nanoparticles in Consumer Products: Understanding a New Ingredient. *Environmental Health Perspectives* 119(3):A120-A125.
- Kim R, Emi M & Tanabe K (2006) Cancer immunosuppression and autoimmune disease: beyond immunosuppressive networks for tumour immunity. *Immunology* 119(2):254-264.
- Kolaczowska E & Kubes P (2013) Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* 13(3):159-175.
- Kroemer G, Galluzzi, L. and Brenner, C. (2007) Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 87(1):99-163.
- Kunkel SL, Lukacs N & Strieter RM (1995) Expression and biology of neutrophil and endothelial cell-derived chemokines. *Semin Cell Biol* 6(6):327-336.
- Lasagna-Reeves C, Gonzalez-Romero D, Barria MA, Olmedo I, Clos A, Sadagopa Ramanujam VM, Urayama A, Vergara L, Kogan MJ & Soto C (2010) Bioaccumulation and toxicity of gold nanoparticles after repeated administration in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 393(4):649-655.
- Lavastre V, Chiasson S, Cavalli H & Girard D (2005) Viscum album agglutinin-I (VAA-I) induces apoptosis and degradation of cytoskeletal proteins in human leukemia PLB-985 and X-CGD cells via caspases: lamin B1 is a novel target of VAA-I. *Leuk Res* 29(12):1443-1453.
- Lavastre V, Pelletier M, Saller R, Hostanska K & Girard D (2002) Mechanisms involved in spontaneous and Viscum album agglutinin-I-induced human neutrophil apoptosis: Viscum album agglutinin-I accelerates the loss of antiapoptotic Mcl-1

- expression and the degradation of cytoskeletal paxillin and vimentin proteins via caspases. *J Immunol* 168(3):1419-1427.
- Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI & Nourshargh S (2007) Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7(9):678-689.
- Lowe DB & Storkus WJ (2011) Chronic inflammation and immunologic-based constraints in malignant disease. *Immunotherapy* 3(10):1265-1274.
- Luo HR & Loison F (2008) Constitutive neutrophil apoptosis: mechanisms and regulation. *Am J Hematol* 83(4):288-295.
- Markiewski MM & Lambris JD (2009) Is complement good or bad for cancer patients? A new perspective on an old dilemma. *Trends Immunol* 30(6):286-292.
- Medzhitov R (2008) Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454(7203):428-435.
- Mikkelsen L, Jensen KA, Koponen IK, Saber AT, Wallin H, Loft S, Vogel U & Moller P (2013) Cytotoxicity, oxidative stress and expression of adhesion molecules in human umbilical vein endothelial cells exposed to dust from paints with or without nanoparticles. *Nanotoxicology* 7(2):117-134.
- Mironava T, Hadjiargyrou M, Simon M, Jurukovski V & Rafailovich MH (2010) Gold nanoparticles cellular toxicity and recovery: effect of size, concentration and exposure time. *Nanotoxicology* 4(1):120-137.
- Mitchell LA, Lauer FT, Burchiel SW & McDonald JD (2009) Mechanisms for how inhaled multiwalled carbon nanotubes suppress systemic immune function in mice. *Nat Nanotechnol* 4(7):451-456.
- Moisan E & Girard D (2006) Cell surface expression of intermediate filament proteins vimentin and lamin B1 in human neutrophil spontaneous apoptosis. *J Leukoc Biol* 79(3):489-498.
- Monopoli MP, Aberg C, Salvati A & Dawson KA (2012) Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nat Nanotechnol* 7(12):779-786.
- Moulding DA, Akgul C, Derouet M, White MR & Edwards SW (2001) BCL-2 family expression in human neutrophils during delayed and accelerated apoptosis. *J Leukoc Biol* 70(5):783-792.
- Muller K, Dulku S, Hardwick SJ, Skepper JN & Mitchinson MJ (2001) Changes in vimentin in human macrophages during apoptosis induced by oxidised low density lipoprotein. *Atherosclerosis* 156(1):133-144.
- Murphy BM, O'Neill AJ, Adrain C, Watson RW & Martin SJ (2003) The apoptosome pathway to caspase activation in primary human neutrophils exhibits dramatically reduced requirements for cytochrome C. *J Exp Med* 197(5):625-632.
- Nauseef WM (2007) How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol Rev* 219:88-102.

- Nemeth T & Mocsai A (2012) The role of neutrophils in autoimmune diseases. *Immunol Lett* 143(1):9-19.
- Nemmar A, Hoylaerts MF, Hoet PH, Dinsdale D, Smith T, Xu H, Vermeylen J & Nemery B (2002) Ultrafine particles affect experimental thrombosis in an in vivo hamster model. *Am J Respir Crit Care Med* 166(7):998-1004.
- Oberdorster 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.
- Oberdorster G, Oberdorster E & Oberdorster J (2005) Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 113(7):823-839.
- Ostiguy C, Lapointe G, Trottier M, Ménard L, Cloutier Y, Michel B, Antoun M & Normand C (2008) Les effets sur la santé reliés aux nanoparticules. 120.
- Pan Y, Neuss S, Leifert A, Fischler M, Wen F, Simon U, Schmid G, Brandau W & Jahnke-Dechent W (2007) Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small* 3(11):1941-1949.
- Parida UK & Nayak P (2012) Biomedical Applications of Gold Nanoparticles: Opportunity and Challenges. *World Journal of Nano Science and Technology* 1(2):10-25.
- Parsons SA, Sharma R, Roccamatysi DL, Zhang H, Petri B, Kubes P, Colarusso P & Patel KD (2012) Endothelial paxillin and focal adhesion kinase (FAK) play a critical role in neutrophil transmigration. *Eur J Immunol* 42(2):436-446.
- Patra HK, Banerjee S, Chaudhuri U, Lahiri P & Dasgupta AK (2007) Cell selective response to gold nanoparticles. *Nanomedicine* 3(2):111-119.
- Perlson E, Michaelevski I, Kowalsman N, Ben-Yaakov K, Shaked M, Seger R, Eisenstein M & Fainzilber M (2006) Vimentin binding to phosphorylated Erk sterically hinders enzymatic dephosphorylation of the kinase. *J Mol Biol* 364(5):938-944.
- Pernodet N, Fang X, Sun Y, Bakhtina A, Ramakrishnan A, Sokolov J, Ulman A & Rafailovich M (2006) Adverse effects of citrate/gold nanoparticles on human dermal fibroblasts. *Small* 2(6):766-773.
- Peters A, Veronesi B, Calderon-Garciduenas L, Gehr P, Chen LC, Geiser M, Reed W, Rothen-Rutishauser B, Schurch S & Schulz H (2006) Translocation and potential neurological effects of fine and ultrafine particles a critical update. *Part Fibre Toxicol*:3-13.
- Petri B, Phillipson M & Kubes P (2008) The physiology of leukocyte recruitment: an in vivo perspective. *J Immunol* 180(10):6439-6446.
- Poirier M, Simard J-C, Antoine F & Girard D (2014) Interaction between silver nanoparticles of 20 nm (AgNP20) and human neutrophils: induction of apoptosis and inhibition of de novo protein synthesis by AgNP20 aggregates. *Journal of Applied Toxicology* 34(4):404-412.

- Richards MK, Liu F, Iwasaki H, Akashi K & Link DC (2003) Pivotal role of granulocyte colony-stimulating factor in the development of progenitors in the common myeloid pathway. *Blood* 102(10):3562-3568.
- Risom L, Moller P & Loft S (2005) Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutat Res* 592(1-2):119-137.
- Roduner E (2006) Size matters: why nanomaterials are different. *Chem Soc Rev* 35(7):583-592.
- Rogers KR, Morris CJ & Blake DR (1992) The cytoskeleton and its importance as a mediator of inflammation. *Annals of the Rheumatic Diseases* 51(4):565-571.
- Ron D & Walter P (2007) Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(7):519-529.
- Salmaso S, Caliceti P, Amendola V, Meneghetti M, Magnusson JP, Pasparakis G & Alexander C (2009) Cell up-take control of gold nanoparticles functionalized with a thermoresponsive polymer. *Journal of Materials Chemistry* 19(11):1608-1615.
- Santos-Beneit AM & Mollinedo F (2000) Expression of genes involved in initiation, regulation, and execution of apoptosis in human neutrophils and during neutrophil differentiation of HL-60 cells. *J Leukoc Biol* 67(5):712-724.
- Segal AW (2005) How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol* 23:197-223.
- Serhan CNea (2010) *Fundamentals of Inflammation*. Cambridge University Press. 488 p
- Shi Y, Tohyama Y, Kadono T, He J, Miah SM, Hazama R, Tanaka C, Tohyama K & Yamamura H (2006) Protein-tyrosine kinase Syk is required for pathogen engulfment in complement-mediated phagocytosis. *Blood* 107(11):4554-4562.
- Shrivastav M, Mittal B, Aggarwal A & Misra R (2002) Autoantibodies against cytoskeletal proteins in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 21(6):505-510.
- Simard JC, Girard D & Tessier PA (2010) Induction of neutrophil degranulation by S100A9 via a MAPK-dependent mechanism. *J Leukoc Biol* 87(5):905-914.
- Simon-Deckers A (2008) *Effets biologiques de nanoparticules manufacturées : influence de leurs caractéristiques*. (l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement de l'Environnement (Agro Paris Tech)). 282 p
- Simon HU (2003) Neutrophil apoptosis pathways and their modifications in inflammation. *Immunol Rev* 193:101-110.
- Simpson CA, Salleng KJ, Cliffl DE & Feldheim DL (2013) In vivo toxicity, biodistribution, and clearance of glutathione-coated gold nanoparticles. *Nanomedicine* 9(2):257-263.
- Stefan M, Melnig V, Pricop D, Neagu A, Mihasan M, Tartau L & Hritcu L (2013) Attenuated effects of chitosan-capped gold nanoparticles on LPS-induced toxicity in laboratory rats. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 33(1):550-556.
- Sumbayev VV, Yasinska IM, Garcia CP, Gilliland D, Lall GS, Gibbs BF, Bonsall DR, Varani L, Rossi F & Calzolari L (2013) Gold nanoparticles downregulate interleukin-1beta-induced pro-inflammatory responses. *Small* 9(3):472-477.

- Technology NSaTCCo (2014) Progress review on the coordinated implementation of the national nanotechnology initiative (Édit Environmental Health Services United States of America).
- Torres M & Coates TD (1999) Function of the cytoskeleton in human neutrophils and methods for evaluation. *J Immunol Methods* 232(1-2):89-109.
- Toyama T, Matsuda H, Ishida I, Tani M, Kitaba S, Sano S & Katayama I (2008) A case of toxic epidermal necrolysis-like dermatitis evolving from contact dermatitis of the hands associated with exposure to dendrimers. *Contact Dermatitis* 59(2):122-123.
- Underhill DM & Goodridge HS (2012) Information processing during phagocytosis. *Nat Rev Immunol* 12(7):492-502.
- Vecchio G, Galeone A, Brunetti V, Maiorano G, Rizzello L, Sabella S, Cingolani R & Pompa P (2012) Mutagenic effects of gold nanoparticles induce aberrant phenotypes in *Drosophila melanogaster*. *Nanomedicine* 8(1):1 - 7.
- Villiers C, Freitas H, Couderc R, Villiers M-B & Marche P (2010) Analysis of the toxicity of gold nano particles on the immune system: effect on dendritic cell functions. *Journal of Nanoparticle Research* 12(1):55-60.
- Witko-Sarsat V, Rieu, P., Descamps-Latscha, B., Lesavre, P. and Halbwachs-Mecarelli, L. (2000) Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* 80(5):617-653.
- Yang X, Wang J, Liu C, Grizzle WE, Yu S, Zhang S, Barnes S, Koopman WJ, Mountz JD, Kimberly RP & Zhang HG (2005) Cleavage of p53-vimentin complex enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Am J Pathol* 167(3):705-719.
- Yen HJ, H, S. H. & Tsai CL (2009) Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes. *Small* 5(13):1553-1561.
- Zarbock A, Ley K, McEver RP & Hidalgo A (2011) Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. *Blood* 118(26):6743-6751.
- Zolnik BS, González-Fernández Á, Sadrieh N & Dobrovolskaia MA (2010) Nanoparticles and the Immune System. *Endocrinology* 151(2):458-465.