Université du Québec
INRS-Institut Armand Frappier

CARACTERISATION DES PROPRIETES INFLAMMATOIRES ET DES EFFETS SUR LE NEUTROPHILE DE NANOPARTICULES DE TYPE OXYDE-METAL ET DES FULLERENOLS.

Par
David Gonçalves

Thèse présentée
pour l'obtention
du grade de *Philosophiæ Doctor* (Ph.D.)
en biologie

JURY D'ÉVALUATION

Présidente du jury et examinatrice interne	**Mme Isabelle Plante, PhD** **INRS-Institut Armand-Frappier**
Examinateur externe	**M. Karim Maghni, PhD** **Université de Montréal**
Examinateur externe	**Mme Caroline Gilbert, PhD** **Université Laval**
Directeur de recherche	**M. Denis Girard, PhD** **INRS-Institut Armand Frappier**

© Droits réservés de David Gonçalves, 2015

REMERCIEMENTS

En premier lieu, j'aimerais remercier mon directeur de recherche, Denis Girard. Denis, de par son enthousiasme, est dans une classe à part comme professeur. Il m'a aidé à progresser au niveau académique, mais aussi au niveau humain. Lui et moi avons un caractère très différent. Toutefois, cela ne l'a pas empêché de bien saisir ma personnalité et mes aspirations. Ses conseils judicieux me permettront assurément de poursuivre mes objectifs de carrière avec succès. Je me considère privilégié d'avoir eu Denis comme mentor au doctorat. Merci Denis!

Je tiens également à souligner l'incroyable chance que j'ai d'avoir comme parents José Joaquim Gonçalves et Térésa Garcês. Ce sont des personnes qui ont toujours pensé au bien-être de leurs enfants avant de penser à leur propre bien-être. Je leur dois tout. Et surtout, il en va de soi, je les aime énormément. Une mention spéciale pour mon petit frère, avec qui j'ai grandi. Il a toujours été une source de joie dans ma vie.

Un merci très particulier à Tamara Bachelet. Ces dernières années ont été merveilleuses à ses côtés. Son amour, son support et sa compréhension y ont été pour beaucoup. Je suis très chanceux de pouvoir compter sur elle lors des moments les plus difficiles et de partager mon quotidien avec elle.

Enfin un merci très chaleureux envers mes collègues de laboratoire et de bureau. Ils sont trop nombreux à avoir effectué soit leur maîtrise, leur doctorat ou encore leur postdoctorat avec Denis pour tous les nommer. Mais j'aimerais souligner l'immense plaisir que ce fût de travailler avec chacun d'entre eux. Je suis très heureux d'avoir pu effectuer mes études graduées en compagnie d'individus aussi exceptionnels.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS III
TABLE DES MATIÈRES V
LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX VII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS IX
RÉSUMÉ XIII
PARTIE 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE 5
CHAPITRE 1 : LES NANOPARTICULES 7
1.1 Définitions officielles 7
1.2 Différences entre les matériaux à la nano-échelle et les autres matériaux 8
1.3 Historique 9
1.4 Différents types de nanoparticules 12
1.5 Applications 13
1.6 Métrologie et évaluation de la contamination 16
CHAPITRE 2 : LA TOXICITÉ DES NANOPARTICULES ET LEUR EFFET SUR LE PROCESSUS INFLAMMATOIRE 18
2.1 Différences entre la toxicologie et la nanotoxicologie 18
2.2 Les nanoparticules de type oxyde métallique 20
2.3 Les fullerènes et le fullerenol 21
CHAPITRE 3 : L'INFLAMMATION 53
3.1 Définition 53
3.2 Inflammation aiguë 53
3.3 Inflammation chronique 54
3.4 Rôle du neutrophile 54
CHAPITRE 4 : LES NEUTROPHILES 56
4.1 Différenciation 57
4.2 Principales fonctions et rôles chez l'humain 58
4.2.1 Chimiotaxie, adhésion et diapédèse 58
4.2.2 La phagocytose 60
4.2.3 La destruction des corps étrangers – élimination dépendante de l'oxygène 61

4.2.4 La destruction des corps étrangers – élimination indépendante de l'oxygène 62
4.2.5 L'apoptose 63
CHAPITRE 5 : LES DIVERS MODÈLES D'INFLAMMATION *IN VIVO* 69
5.1 Le modèle de la poche d'air murine 70
OBJECTIF DU PROJET DE RECHERCHE : 72
PARTIE 2 – ARTICLES 75
Article I : Présentation 77
Titanium dioxide (TiO_2) nanoparticles induce neutrophil influx and local production of several pro-inflammatory mediators in vivo. 77
Résumé en français de l'article 79
Evidence that polyhydroxylated C_{60} fullerenes (fullerenols) amplify the effect of lipopolysaccharides to induce rapid leukocyte infiltration in vivo. 89
Résumé en français de l'article 91
Article III: Présentation 105
Zinc oxide nanoparticles delay human neutrophil apoptosis by a de novo protein synthesis-dependent and reactive oxygen species-independent mechanism. 105
Résumé en français de l'article 107
Activation of neutrophils by nanoparticles 115
Résumé en français de l'article 116
DISCUSSION ET CONCLUSION 130
L'importance de la caractérisation dans des conditions similaires aux paramètres expérimentaux. 133
Cytotoxicité relative des nanoparticules de TiO_2, ZnO et fullerenol 134
Les nanoparticules, de vrais agonistes du neutrophile 136
Le modèle de la poche d'air murine, pertinent pour évaluer le potentiel inflammatoire d'une nanoparticule 139
CONTRIBUTION À L'AVANCEMENT DES CONNAISSANCES ET PERSPECTIVES 144
RÉRENCES 152
ANNEXE 165

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Figure 1 : Aire de surface d'une particule divisée en 36 particules plus petites.....9
Figure 2 : Statistiques de l'ensemble des articles scientifiques publiés en lien avec la recherche sur les nanoparticules en général et leur toxicité.....11
Figure 3. Conceptualisation schématisée de l'étude des nanoparticule au laboratoire. 132

Tableau 1. Classification des nanoparticules en fonction de leur composition chimique.....13
Tableau 2. Exemples de produits ayant incorporé des nanomatériaux. 14
Tableau 3. Différentes études portant sur les effets sur les neutrophiles et sur le processus inflammatoire des nanoparticules de dioxyde de titane. 23
Tableau 4. Différentes études portant sur les effets sur les neutrophiles et sur le processus inflammatoire des nanoparticules de dioxyde de zinc. 31
Tableau 5. Différentes études portant sur les effets sur les neutrophiles et sur le processus inflammatoire des nanoparticules de fullerenol et fullerènes.....46

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADN	acide désoxyribonucléique
ATP	adenosine triphosphate
Bad	*Bcl-2-associated death promoter*
BAL	lavage broncho-alvéolaire
BCL-2	*B-cell lymphoma 2*
C_{60}	fullerène
$C_{60}(OH)_n$	fullerenol
CD(…)	cluster of differentiation
CGD	granulomatose chronique
CHX	cycloheximide
CR(…)	récepteur du complément
cytb558	flavocytochrome b_{558}
DAMPs	*damage-associated molecular pattern*
DAPI	4',6'-diamidino-2-phénylindole
DLS	*dynamic light scattering*
DR	*death receptor*
ERK ½	*extracellular-signal-regulated kinase 1/2*
ESAM	molécule d'adhésion endothéliale sélective
FasL	Fas Ligand
FcR(…)	récepteur de la région fc
FDA	*Food and drug administration*
fMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine
G-CSF	*Granulocyte colony-stimulating factor*
GM-CSF	*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*
GSH	glutathione
ICAM-1	molécule d'adhésion intracellulaire-1
INF-γ	interféron gamma
IgG	immunoglobuline G
IL(…)	interleukine

ISO	International Organization for Standardization
JAM-1	molécule d'adhésion de la jonction
LAL	amoebocytes de limule
LB	*lysogeny broth*
LDH	lactates déshydrogénase
LPS	lipopolysaccharide
MAPK	m*itogen-activated protein kinases*
MCP-1	*monocyte chimoattractant protein 1*
MET	microscopie électronique à transmission
MIP-1β	*macrophage inflammatory protein-1 beta*
MMP	métalloprotéinase matricielle
MPO	myéloperoxydase
NADPH	*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*
NF-κB	*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*
NK	*natural killer*
NM	nanomatériaux
NP	nanoparticules
NTA	*nanoparticle tracking analysis*
NTC	nanotubes de carbone
OCDE	Organisation de coopération et de développment économiques
PAF	facteur d'activation des plaquettes
PAMPs	*Pathogen-associated molecular patterns*
PBMC	*peripheral blood mononucleated cell*
PDI	*polydispersity index*
PECAM-1	molécule d'adhésion cellulaire des plaquettes / cellules endothéliales
PI3K	phosphatidylinositide 3-kinase
PMA	phorbol myristate acetate
PMN	polymorphonucléaire
PRR	*Pattern recognition receptors*
PS	phosphatidylserines

PSGL-1	*P-selectin glycoprotein ligand-1*
ROS	*reactive oxygen species*
RPMI	milieu Roswell Park Memorial Institute
SOD	superoxyde dismutase
TEM/MET	Microscopie électronique à transmission
TLR	toll-like receptor
TNF-α	*tumor necrosis factor alpha*
UV	ultra-violets
VCAM-1	molécule d'adhésion vasculaire-1
WST	*water soluble tetrazolium*

RÉSUMÉ

L'intérêt pour le domaine de la nanoscience s'est nettement intensifié au cours des dernières années. À cause de sa taille, la nanomatière dispose de propriétés physiques, chimiques et biologiques différentes que celles des mêmes matériaux en vrac ou à l'échelle moléculaire. L'utilisation de plus en plus importante des nanoparticules (NP) engendre des questionnements quant au risque à la santé des humains qui y sont inévitablement exposés. Les travaux préalables à cette thèse ont démontré que les NP de dioxyde de titane peuvent activer les cellules polymorphonucléaires (PMN) et moduler de façon marquée leurs fonctions.

Afin d'entamer une classification des NP en fonction de leur potentiel inflammatoire, nous avons fait appel aux nombreux résultats acquis *in vitro* (avec des PMN fraîchement isolés à partir du sang veineux de volontaires sains) et *in vivo* (à l'aide du modèle murin de la poche d'air). Les résultats présentés dans ce document révèlent d'abord l'importance d'une caractérisation rigoureuse des NP et d'une évaluation de leur contamination. Il en ressort également que les métriques employées par les diverses études pour exprimer la notion de "dose" sont diverses et que la concentration massique, utilisée ici, permet d'obtenir des relations dose-dépendantes.

Les NP ont des dimensions similaires à de nombreuses molécules biologiques et différentes interactions NP-molécules sont rapportées dans la littérature. Les résultats obtenus avec les fullerenols que nous avons testés, permettent de conclure qu'il y a une interaction entre le LPS et le $C_{60}(OH)_n$. C'est la toute première étude qui démontre que deux agents, lorsque combinés, peuvent avoir des effets pro-inflammatoires, tandis que séparément, ils sont inertes dans certaines conditions. Ce constat ouvre la porte à d'autres études similaires. De plus, cette étude démontre également le comportement analogue des NP aux cytokines. En effet, leur capacité à retarder l'apoptose du neutrophile par un mécanisme dépendant d'une synthèse protéique (comme le font l'IL-4, l'IL-13, l'IL-15 ou encore le GM-CSF) ou encore leur capacité à augmenter la libération de cytokines pro-inflammatoires *in vivo* par d'autres types cellulaires que les PMN chez la souris en témoignent.

L'ensemble des fonctions affectées (l'apoptose, la production de médiateurs d'inflammation, la synthèse protéique *de novo*, la flambée oxydative, etc.), la capacité à activer le neutrophile (changements morphologiques, polymérisation des filaments d'actine, événements de phosphorylation, propagation des cellules, etc.) ainsi qu'un mécanisme d'action complexe (MAPK, phosphorylation des tyrosines, apoptose dépendante d'une synthèse protéique) témoignent du grand potentiel activateur des NP envers les neutrophiles.

Collectivement, ce projet a permis de mieux saisir et interpréter les interactions NP-PMN et il est clair que les NP agissent de façons différentes. Le mode d'action des NP est complexe et diversifié et peut varier en fonction d'une diversité de paramètres (composition chimique de la NP, concentration utilisée, temps de stimulation, interactions avec d'autres molécules, état de contamination, état d'agrégation, tampon physiologique utilisé, etc.). En raison de ces importantes variations, il faudrait d'avantage se concentrer sur les NP susceptibles d'êtres utilisées dans de futures applications concrètes commerciales ou industrielles.

INTRODUCTION

La nanotoxicologie est en pleine expansion et l'intérêt pour ce domaine s'est nettement intensifié au cours des dernières années. À cause de sa taille, la nanomatière a des propriétés physiques, chimiques et biologiques différentes de celles des mêmes matériaux en vrac. Les nanoparticules sont des particules ayant leurs trois dimensions comprises entre 1 et 100 nm. L'utilisation de plus en plus importante des NP engendre des questionnements quant au risque à la santé des humains qui y sont inévitablement exposés. Les NP de TiO_2, de ZnO et de fullerène, étudiées dans le cadre de ces travaux sont abondamment utilisées dans diverses applications à l'échelle mondiale. Les NP de TiO_2 et de ZnO font partie des NP de type oxyde-métal utilisées, entre autres, dans les domaines des revêtements de surface, les panneaux solaires, les cosmétiques, les fongicides et autres. Elles sont connues pour avoir de nombreux effets variés sur les fonctions cellulaires telle que : augmentation de la production de réactifs de l'oxygène, la libération de cytokines pro-inflammatoires, l'expression d'ARNm liés à l'inflammation, l'activation des voies de survie cellulaire, la modulation des protéines d'adhésion, etc.) des différents types cellulaires suivants : neutrophiles, kératinocites, endothéliales, fibroblastes, macrophages et dendritiques. Quant aux NP de fullerène et ses dérivés fullerenols, elles sont essentiellement composées à base de carbone assemblés sous la forme d'une sphère. Elles sont présentes dans l'environnement de façon naturelle (éruptions volcaniques, feux de forêt, etc.) et anthropogénique (produits de combustion). Ces NP sont connues pour être plutôt inertes au niveau biologique et pour avoir la capacité d'éliminer les radicaux libres. Elles sont souvent identifiées comme étant des éponges à radicaux libres puisque lorsqu'elles sont en présence d'espèces réactives de l'oxygène, elles atténuent directement les effets cytotoxiques de ces mêmes espèces réactives.

L'inflammation est une réponse physiologique normale du corps humain résultant d' une blessure ou une infection. Elle est caractérisée par des symptômes tels que la chaleur et la rougeur, dues à une augmentation de la circulation sanguine au niveau du site inflammatoire ainsi qu'à une vasodilatation des vaisseaux sanguins afin de diminuer la concentration des agents toxiques potentiels. Il y a également une augmentation de la perméabilité capillaire afin de faciliter le passage des cellules, molécules et médiateurs (cytokines, chimiokines) d'inflammation à travers l'endothélium. Éventuellement, on observe une migration des leucocytes (des neutrophiles dans la phase initiale) vers le site inflammatoire. Parmi les autres symptômes lors d'une inflammation il y a bien sûr, la douleur. Celle-ci est causée par l'oedème et la libération d'agents algogéniques.

Finalement, une perte de fonction tissulaire peut être causée par l'enflure et la douleur. Toutefois, en général, une inflammation a un début rapide et s'étend sur une courte période. Elle comprend trois phases distinctes : 1) l'initiation : un agent exogène (ex. : toxine, produit chimique, biologique ou physique) ou endogène (ex. : réaction d'hypersensibilité, accumulation d'acide urique) initie la réponse inflammatoire ; 2) l'amplification : il y a recrutement de cellules et produits pro-inflammatoires. 3) la résolution : il y a résolution lorsque les cellules et les débris sont éliminés par d'autres phagocytes comme les macrophages.

Les neutrophiles font partie de la famille des granulocytes. Les cellules granulocytaires comprennent les neutrophiles, les basophiles et les éosinophiles. Les neutrophiles possèdent des noyaux polylobés, d'où son appellation alternative, de cellule polymorphonucléaire (PMN). Les PMN sont des cellules phagocytaires. Ils constituent de 50 à 75 % de tous les leucocytes chez l'humain. Ce sont des cellules circulantes comportant un diamètre compris entre 12 à 15 μm de diamètre, qui peuvent migrer de la circulation sanguine vers les tissus. Leur concentration sanguine est d'environ 2 à 5 x 10^6 cellules/ml. Ils offrent une excellente protection contre les bactéries et champignons. Au cours du processus de maturation, les PMN fabriquent les différents types de granules qui leur confèrent la capacité de tuer des microorganismes. Une fois attirés au site inflammatoire, ils reconnaissent l'agent causal de l'inflammation, s'activent, tuent ou éliminent le microorganisme ou l'agent et finalement, se dirigent en apoptose (mort cellulaire programmée). Ils sont alors reconnus par les phagocytes professionnels, ce qui permet la résolution de l'inflammation. Ce type cellulaire est grandement impliqué dans les désordres inflammatoires, dont ceux causés par les NP. En effet, il est courant de remarquer l'implication de ce type cellulaire dans les diverses études d'instillation pulmonaire effectuées chez le vivant par exemple. Il est donc étonnant de constater que malgré qu'il y ait un nombre important d'études montrant le potentiel inflammatoire des NP, peu d'entre elles se penchent véritablement sur les questions reliées aux effets directs des NP sur les PMN.

L'objectif de la présente étude est d'effectuer l'étude du potentiel inflammatoire des NP, afin d'entamer une classification des NP selon leur potentiel inflammatoire en corrélant les résultats obtenus avec les neutrophiles *in vitro* et *in vivo*. Plus spécifiquement, l'objectif est d'initier l'étude selon le potentiel agonistique des NP de type oxyde-métal soit le TiO_2, le ZnO, ainsi que celui des

NP de fullerenol ($C_{60}(OH)_n$). À travers ce document on découvre la diversité de fonctions et réponses cellulaires de neutrophiles affectées par ces NP. On découvre également, l'effet de ces dernières sur la réponse inflammatoire chez la souris, à l'aide du modèle de la poche d'air murine. C'est un modèle qui offre une alternative intéressante aux nombreux modèles d'inflammation pulmonaire fréquemment utilisés dans la littérature.

Ce document est subdivisé en trois sections principales. D'abord, une revue de littérature portant sur les NP, sur l'inflammation, les fonctions principales du neutrophile ainsi qu'une brève description du modèle de la poche d'air est présentée. Suivent ensuite les trois articles qui contiennent l'essentiel des résultats présentés dans cette thèse. Pour clore cet ouvrage, une discussion succincte portant sur les résultats et les perspectives de recherche est présentée.

PARTIE 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE

CHAPITRE 1 : LES NANOPARTICULES

1.1 Définitions officielles

D'après les définitions de l'organisation internationale de normalisation (ISO) et adoptées, entre autres, par l'organisation internationale de coopération et de développement économique (OCDE), un **nanomètre** est une unité de mesure métrique qui exprime une grandeur de 10^{-9} mètres. Ce faisant, la **nanoéchelle** varie de 1 à 100 nanomètres (nm). Un **nano-objet** possède une, deux ou trois dimensions à la nanoéchelle. Ceci inclus les **nanoparticules** (qui ont trois dimensions à la nanoéchelle), les **nanofibres** (qui ont deux dimensions à la nano-échelle) et les **nanoplaques** (qui ont une dimension à la nanoéchelle) (International Organisation for Standardization, 2008). Les nanoparticules ont tendance à diffuser et ont un mouvement désordonné en suspension dans un milieu, ce qui fait qu'elles ont une tendance naturelle à s'agglomérer (Ostiguy, 2006). Un **agglomérat** de nanoparticules survient si la cohésion d'un groupe de particules est favorisée par des forces de nature électrostatiques. Des particules formant un agglomérat sont considérées comme étant faiblement liées. Par opposition, un **agrégat** est un ensemble de particules étant fortement liées par des liaisons covalentes, qui ne peuvent pas être séparées facilement (AFFSET, 2008; Johnston *et al.*, 2009; G. Oberdorster *et al.*, 2007; Witschger O., 2005).

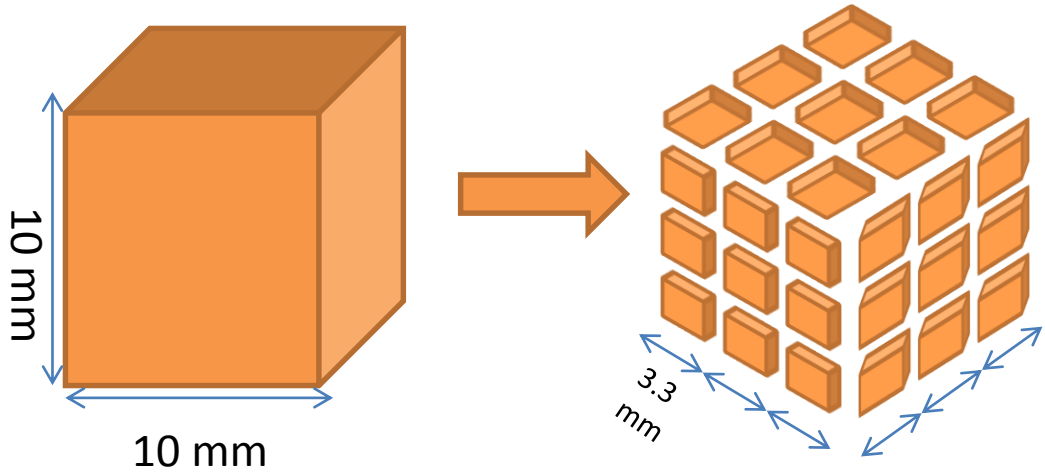
La **nanoscience,** *« c'est l'étude des phénomènes et la manipulation des matériaux à l'échelle atomique, moléculaire et macromoléculaire, dont les propriétés diffèrent de celles de la matière à échelle plus élevée »* (Maynard, 2007; The Royal Society and The Royal Academy of engineering, 2004)

La **nanotechnologie**, *« c'est la compréhension et le contrôle de la matière ayant des dimensions situées entre 1 et 100 nanomètres, dont les phénomènes uniques qui y sont associés, permettent de développer de nouvelles applications »* (National Nanotechnology Initiative, 2011)

La **nanotoxicologie**, est une nouvelle branche de la toxicologie qui évalue le risque que posent tous les matériaux à la nanoéchelle sur les organismes vivants. (Donaldson *et al.*, 2004; G. Oberdorster *et al.*, 2005b)

1.2 Différences entre les matériaux à la nano-échelle et les autres matériaux

La matière à la nanoéchelle a des propriétés uniques. Parmi les propriétés qui peuvent être altérées lorsque la matière est à la nanoéchelle il y a la conductivité électrique, la résistance des matériaux à la pression et à la température, l'efficacité catalytique, le point fusion du matériau, les propriétés de fluorescence, les propriétés optiques, la réactivité chimique et bien sûr la réactivité biologique (EPA-Nanotechnology-White-Paper, 2007; National Nanotechnology Initiative, 2011; The Royal Society and The Royal Academy of engineering, 2004). Un des facteurs qui explique ces changements de propriétés, c'est l'aire de surface par unité de masse. En effet, plus la taille d'une particule est petite, plus l'aire de surface par unité de masse augmente. Cette règle est illustrée de façon schématisée à l'aide d'un cube mesurant 10 mm de côté, qui représente une grosse particule (fig 1). Lorsque ce cube est réduit en 36 parts égales, il est facile de constater que l'aire de surface de la somme des petites particules est bien plus élevée que l'aire de surface du cube de départ. Ainsi, une NP ayant un diamètre de 30 nm a 5% de ses atomes à la surface, à 20 nm de taille ce chiffre augmente à 10% et à 3nm de diamètre c'est 50% des atomes qui sont à la surface de la NP. Ce sont donc les propriétés des molécules et des atomes à la surface de la NP qui vont lui conférer ses caractéristiques spécifiques et par conséquent, qui détermineront les effets biologiques des NP. (Ostiguy, 2006; Roduner, 2006; The Royal Society and The Royal Academy of engineering, 2004)



Aire de la grosse particule = $6 * 10^2 = 600\ mm^2$

Aire totale des 36 petites particules = $6* 3.3^2 \times 36 = 2352\ mm^2$

Figure 1 : Aire de surface d'une particule divisée en 36 particules plus petites.
Le rapport de l'aire de surface par unité de masse est plus élevé pour les petites particules, conférant ainsi aux NP des caractéristiques uniques liées à leurs propriétés de surface.

Le deuxième facteur qui explique le changement de propriétés de la nanomatière c'est les forces physiques qui s'appliquent à la nanoéchelle. En fait, ces forces font partie d'un domaine de recherche qu'on appelle la physique quantique et qui s'intéresse aux forces exercées sur les objets dont la taille se situe autour de 10^{-9} mètres. Ces forces qui agissent sur les atomes, ou sur des molécules comme l'ADN, ou encore sur les nanoparticules sont très différentes de celles qui exercent une force sur les objets beaucoup plus grands que 10^{-9} mètres, c'est-à-dire les forces décrites par la physique classique (gravité, électrostatiques, Van der Waals, etc.) (The Royal Society and The Royal Academy of engineering, 2004). La matière nanométrique se trouve pour ainsi dire dans une zone de transition, à la fois influencée par les forces de type classique et les forces décrites par la physique quantique. (EPA-Nanotechnology-White-Paper, 2007; Roduner, 2006; The Royal Society and The Royal Academy of engineering, 2004; Webster, 2009). Par conséquent, le domaine des nanotechnologies provoque un changement de mentalités, car on ne peut prévoir d'avance les caractéristiques d'un élément chimique bien connu lorsqu'il se retrouve à la nanoéchelle (Roduner, 2006).

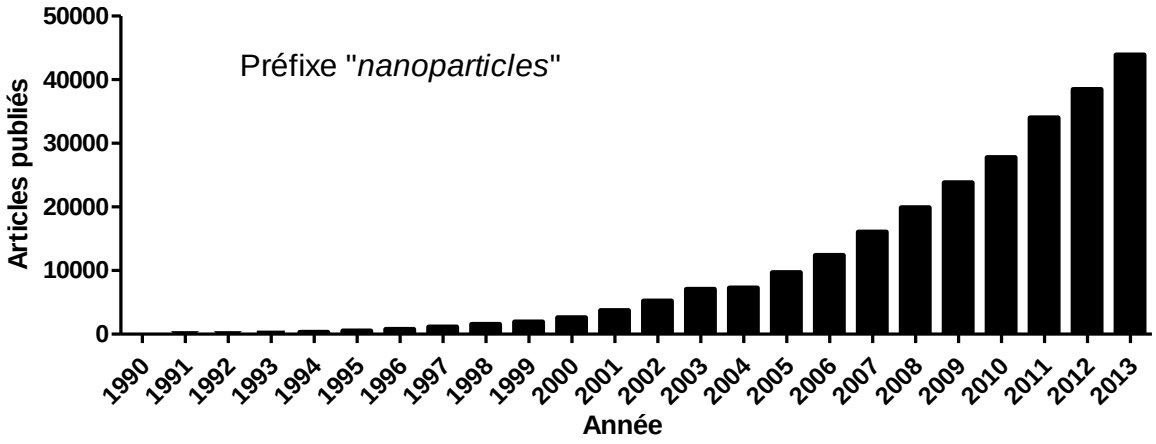
1.3 Historique

Le concept de nanotechnologie ne décrit pas une technologie précise. Il décrit plutôt une façon de penser ou de créer des choses. La première personne à avoir parlé des avantages et du potentiel de travailler à la nanoéchelle est le physicien et récipiendaire du prix Nobel Richard Feynman. Lors d'un discours intitulé *'There's plenty of room at the bottom'* qu'il prononça en 1959 au *Californian Institute of Technology*, il a exprimé sa vision. C'est-à-dire, qu'il deviendrait un jour possible de manipuler les atomes et les molécules et que cela ouvrirait la porte au développement de toutes sortes de nouvelles technologies. Toutefois, selon lui, il y avait un problème de taille : *« Nous sommes trop grands »* (Maynard, 2007).

C’est grâce au développement de nouvelles techniques d’observation quelques décennies plus tard que l’intérêt pour ce concept a pris naissance. Les techniques d’imagerie en question sont le microscope à effet tunnel qui permet d’analyser la surface d’un matériau conducteur au niveau atomique; le microscope à balayage électronique (interactions entre un champ d’électrons et la matière) et le microscope optique en champ proche (qui permet d’effectuer de l’imagerie optique de la matière avec une résolution très élevée) (Maynard, 2007).

Depuis le début des années 1990, plus de 200 000 études et articles scientifiques portant sur les applications liées aux NP fabriquées par l’homme ont été effectuées. Leur nombre s’accroit de façon substantielle: plus de 10 000/année en 2005 et plus de 40 000/année en 2014 (Fig.2) (base de données SCOPUS, 2014; Buzea *et al.*, 2007). Cette croissance du nombre d’études est imputable aux nouvelles découvertes et applications développées (réalisées entre autres avec les dendrimères, les points quantiques, les nanotubes de carbone, etc.), mais également à cause du nombre croissant de compagnies œuvrant dans le domaine des nanotechnologies qui a considérablement augmenté (G. Oberdorster *et al.*, 2007). Le nombre exact de ces technologies varie quelque peu en fonction des sources / agences gouvernementales qui en font l’inventaire (ex : le *project on emerging nanotechnologies* (PEN) aux États-Unis ou encore l’agence nationale de sécurité sanitaire de l’alimentation, de l’environnement et du travail en France). Toutefois, en ce qui concerne les données du PEN, il y a actuellement plus de 1600 produits basés sur les nanotechnologies sur le marché mondial (Nanoproject.org, 2014).

a)



b)

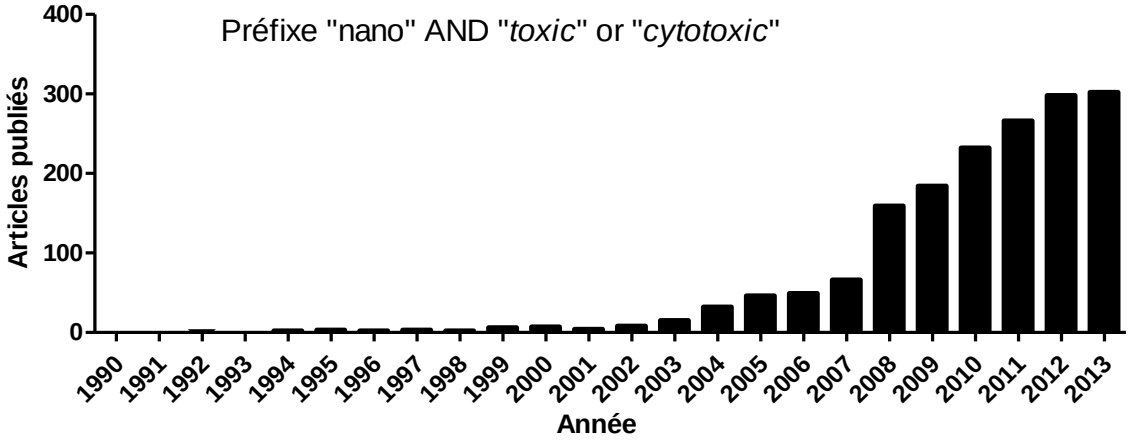


Figure 2 : Statistiques de l'ensemble des articles scientifiques publiés en lien avec la recherche sur les nanoparticules en général et leur toxicité.
Le nombre de publications traitant du développement d'applications à base de nanoparticules est très élevé alors que les études en nanotoxicité sont moins nombreuses (source : base de données Scopus).

Le domaine de la nanotoxicologie, quant à lui, tire évidemment profit du nombre croissant d'études sur les nanomatériaux qui sont en lien avec une diversité de secteurs d'activité humaine incluant la chimie, la physique, l'ingénierie des matériaux, la biologie, la médecine et l'électronique. Toutefois, le nombre total d'études en nanotoxicologie est bien modeste lorsque comparé au nombre total de publications traitant des applications développées à l'aide de NP (fig.2). Il y a un total d'environ 2000 études dans ce domaine. Toutefois, le rythme de publications s'accroit aussi rapidement (400 publications en 2013). Ces données soulignent l'urgence de générer des résultats supplémentaires en nanotoxicologie pour essayer de comprendre les risques que représentent ces nouveaux matériaux (produits intentionnellement) pour la santé et l'environnement (EPA-Nanotechnology-White-Paper, 2007).

La nanotoxicologie tire profit des connaissances acquises par l'étude de la toxicité causée par les particules ultrafines ainsi que par l'étude de l'interaction entre les virus et les cellules vivantes. En effet, les résultats des travaux de recherche effectués sur les radio-isotopes, les poussières nuisibles, la silice, l'amiante, les particules en suspension dans l'air et en virologie y ont tous contribué (G. Oberdorster *et al.*, 2007). Un parallèle peut d'ailleurs être fait entre les NP et les virus. Ces derniers

ont des dimensions qui se mesurent à l'échelle nanométrique (de 18 à 500 nm pour les virus de structure de type icosaèdre). De plus, le désir de mieux comprendre le mode d'action des virus a aussi contribué au développement de nouvelles techniques d'imagerie et de microscopie (microscopie électronique à transmission, cristallographie aux rayons x, diffraction dynamique de la lumière, etc.) qui sont abondamment utilisées aujourd'hui pour caractériser les NP. Enfin, un autre important parallèle peut être fait, soit le rôle que joue la capside virale au niveau du transport de molécules et de sa capacité de ciblage moléculaire. Celle-ci est en quelque sortes analogue au rôle que joueront les NP vouées à être utilisées en ciblage de médicaments (*drug delivery*) (Douglas *et al.*, 2006; G. Oberdorster *et al.*, 2007).

Parmi les premières NP dont le potentiel toxique a été évalué, il y a la NP nommée buckminsterfullerène, une NP ayant la forme d'un ballon de football Européen composée de 60 atomes de carbone, ainsi que les nanotubes de carbone (NTC), formés également entièrement à base de carbone (Hubbs *et al.*, 2013). Leur potentiel de toxicité a commencé à être évalué seulement une dizaine d'années après leur découverte (années 1980 à 1990). Des travaux importants menés par des chercheurs qui aujourd'hui sont des sommités dans le domaine ont permis de révéler le potentiel toxique de ces NP (neurotoxicité, dommage pulmonaire, génération de ROS, etc.) (E. Oberdorster, 2004; Shvedova *et al.*, 2005). D'un autre côté, d'autres études ont démontré par la suite l'importance des modifications de surface pour atténuer la toxicité des NP. Des modifications de la surface tels la carboxylation, l'oxydation à l'acide ou l'ajout de polystyrène par exemple, ont été parmi les premières modifications effectuées (Jain *et al.*, 2011; Tabet *et al.*, 2011). Celles-ci ont permis de diminuer significativement la toxicité causée par ces NP. Cependant, ce qui se fait de plus en plus aujourd'hui, consiste à modifier les propriétés de surface des NP sans altérer leurs qualités qui les ont amenées à être convoitées et développées en premier lieu (Hubbs *et al.*, 2013; Jain *et al.*, 2011; Tabet *et al.*, 2011).

1.4 Différents types de nanoparticules

Il y a une grande variété de NP et leur nombre ne fera que s'accroitre. Ainsi, il faut tenir compte du fait que la classification des nanoparticules est dynamique et évoluera avec le temps. Il y a

plusieurs façons de regrouper les NP en fonction des paramètres que sont la taille, la morphologie, la composition chimique, l'uniformité et l'état d'agrégation (Buzea *et al.*, 2007). Toutefois, si on se limite à la composition chimique, la plupart peuvent être regroupées en quatre grands groupes (tableau 1) (EPA-Nanotechnology-White-Paper, 2007).

Tableau 1. Classification des nanoparticules en fonction de leur composition chimique

	Matériaux à base de carbone	Matériaux à base de métaux	Dendrimères	Matériaux composites
Définition	Matériaux à base de carbone qui ont soit une forme sphérique ou tubulaire.	Matériaux ayant un élément chimique métallique.	Polymères assemblés de façon ramifiée et aux cavités intérieures vides.	Matériaux résultant d'une combinaison entre des NP et un autre matériau à la nano-échelle.
Exemples parmi les plus connus	-Fullerenes -Nanotubes de carbone à simple paroie -Nanotubes de carbone à parois multiples	-Points quantiques -NP d'or / d'argent -NP de type "oxyde-métal" (dioxyde de zinc ou cérium ou titane)	-On trouvera des dendrimères dont le nombre de générations varie en fonction des couches d'unités répétées. -Chaque dendrimère peut-être couplé à des molécules de surface lui donnant ainsi de nouvelles propriétés.	-NP de silice mésoporeuses jumelées à du Gadolinum ou Manganèse (pour application liée à imagerie à résonance magnétique). -NP de PLGA ((poly (dl-lactide-co-glycolide)) couplées à des agents thérapeutiques pour être utilisées dans le traitement contre le VIH.

Sources : (EPA-Nanotechnology-White-Paper, 2007; Guillet-Nicolas *et al.*, 2013; Lavigne *et al.*, 2013)

Il faut également savoir que les particules de taille nanométrique sont présentes de manière abondante dans la nature. Elles sont produites lors de phénomènes naturels tels que les éruptions volcaniques, les feux de forêts, l'érosion, le renouvellement de la peau et des cheveux, etc. La taille de ces NP peut varier (dimensions allant de 1(Baan *et al.*, 2006) à 3000nm de diamètre) (Buzea *et al.*, 2007; Taylor, 2002).

1.5 Applications

Tel que mentionné, plus de 1600 produits contenant des nanomatériaux ont été répertoriés par le PEN. Ceux-ci sont classés en fonction de catégories d'applications. Des exemples de produits répertoriés pour chaque catégorie sont listés dans le tableau 2. Il faut souligner le fait qu'aucune

réglementation en Amérique du Nord n'oblige les manufacturiers à déclarer que leur produit contient des NP. Pour répertorier la quantité de produits qui incorporent des nanomatériaux, le PEN se fie sur les déclarations du producteur ou par une autre source de données jugée relativement fiable (Nanoproject.org, 2014). L'Europe est devenue le premier endroit au monde où l'étiquetage des produits contenant des nanomatériaux est devenu obligatoire, et ce, depuis janvier 2013. Toutefois, cette réglementation ne s'applique qu'aux secteurs des cosmétiques et des biocides pour l'instant (AVICENN, 2013).

Tableau 2. Exemples de produits ayant incorporé des nanomatériaux.
(Données provenant du répertoire du PEN).

Catégories	Différents exemples de produits existant sur le marché
Produits pour automobile	-Lustrant à pneus (n-m*) -Lustrant à carrosserie (nano-argile) -Répulsif à poussière/insectes/autres pour pare brise (NP de dioxyde de titane) -Protecteur de plastiques d'autos contre le soleil (NP de dioxyde de titane) -Composant des plastiques d'auto (fibrilles de nanotubes de carbone) -Purificateur d'air pour auto (NP de dioxyde de titane)
Électronique et Informatique	-Ipod nano (semi-conducteurs < 100 nm) -Papier photo (couche de nano-céramique) -Processeurs d'ordinateur (nano-silice) -Diodes électrolumine-scents (NP organiques)
Nourriture	-Ustensiles avec propriétés antibactériennes(NP d'argent) -Planche à couper antibactériennes (NP d'argent)

	-Supplément minéral (NP d'or) -Anti-adhérant pour lait dans machine à café (NP d'argent)
Biens de consommation destinés aux enfants	-"Développeur" de dents pour bébés (NP d'argent) -Peluches antibactériennes(NP d'argent) -Brosse à dents pour bébé antimicrobienne (NP de silice, NP d'argent)
Produits de santé et sport	-T-shirts et bas avec propriétés antibactériennes (NP de carbone) -Polo qui absorbe et sèche vite (NP de carbone) -Filtres à toxiques tels que acide sulfurique et autres acides (NP de dioxyde de titane) -Raquettes de tennis (Nanotubes de carbone) -Bâtons de hockey (Nanotubes de carbone) -Combinaison de course avec petit coefficient de trainée aérodynamique (NP de dioxyde de silice)
Produits pour la maison et le jardinage	-Produit nettoyant industriel (Nano-micelles) -Robinet d'eau antimicrobien (NP d'argent) -Oreiller avec beaucoup de support pour la tête et le cou (NP de céramique) -Fer à cheveux avec plaques composées de NP (NP de céramique)
Produits de revêtements.	-Gel pour empêcher la croissance d'algues sur coque de bateau (NP de dioxyde de silice) -Revêtement résistant aux UV pour bois, plastiques et textiles (NP de cérium et NP de dioxyde de zinc) - Filtre pour écran d'ordinateur pour améliorer l'image (nanotubes de carbone)
Autres	-Batteries (NP de titanate) -Agent anti-décolorant pour vêtements (NP d'argent) -Fer à repasser avec protection antimicrobienne (NP d'argent)

*n-m : Nanoparticule utilisée non-mentionnée

Les NP de dioxyde de titane (TiO_2) font partie des NP de type oxyde-métal. Ces NP sont très utilisées dans le domaine des revêtements et de la peinture. À elles seules, ces NP sont incorporées dans 70% des peintures au niveau mondial. Le TiO_2 est également abondamment utilisé dans les crèmes solaires et les panneaux solaires à cause de leur capacité à absorber les rayons UV (Baan *et al.*, 2006; Liao *et al.*, 2008). La production mondiale totale de ces NP spécifiques est estimée à plus d'un million de tonnes métriques par année (NIOSH, 2005). Quant aux NP d'oxyde de zinc (ZnO) qui font également partie des NP de type oxyde-métal, elles sont également très utilisées dans l'industrie des cosmétiques et des crèmes solaires à cause de leur capacité à absorber les rayons UV (comme les NP de TiO_2). De plus, ces NP sont abondamment utilisées dans la fabrication des fongicides, poudres pour bébés et shampoings anti-pellicule à cause de leurs propriétés antimicrobiennes. Les fumées de soudage peuvent également contenir des aérosols de ZnO à l'échelle nanométrique. (Adamcakova-Dodd *et al.*, 2014b; Heng *et al.*, 2011; Osmond *et al.*, 2010; Vandebriel *et al.*, 2012). En ce qui concerne les NP constituées d'atomes de carbone assemblées sous la forme d'un ballon de football Européen, les fullerènes (C_{60}) et dérivés comme le fullerenol ($C_{60}OH_{18-24}$), elles sont considérées comme d'excellentes candidates pour être utilisées dans le secteur médical. Tout d'abord, elles possèdent des propriétés antioxydantes importantes et en ce sens, leur potentiel thérapeutique est élevé (Djordjevic *et al.*, 2006). De plus, leur cavité

interne et leur résistance aux variations de température et de pression en font aussi d'excellentes candidates pour des applications de livraison ciblée de médicaments (en anglais : *drug delivery*); (Ostiguy, 2006; Partha *et al.*, 2009).

Un large éventail d'applications pour les NP sont en cours de développement en ce qui concerne le domaine de la santé seulement. Les nanomatériaux permettront de développer de nouveaux vaccins et adjuvants de nouveaux composés thérapeutiques ainsi que de nouveaux composés immunosuppresseurs comme les fullerènes par exemple, qui sont connus pour diminuer la dégranulation des macrophages et des basophiles, diminuer la production de ROS de façon générale et qui sont également capables d'atténuer les réponses aux composés allergènes. De façon générale, des combinaisons NP-antigène ou NP-cytokine permettront de moduler la réponse inflammatoire dans l'avenir (Smith *et al.*, 2013; Zolnik *et al.*, 2010). En ce qui concerne les systèmes de ciblage de médicaments, certaines NP agissent exactement comme des adjuvants, potentialisant ainsi les réponses immunitaires (Smith *et al.*, 2013). En effet, les NP sont bien connues pour être associées à un phénomène appelé *Enhanced permeability and retention effect* (EPR). C'est un phénomène qui survient avec certaines NP (et des macromolécules également) qui ont tendance à s'accumuler dans les tissus des tumeurs solides. Cette propriété associée à certaines NP (NP de chitosan, d'or, liposomes, etc.) leur permet d'être de bonnes candidates pour le ciblage de médicaments (Nakamura *et al.*, 2015; Oh *et al.*, 2013; X. Zhang *et al.*, 2011). Certaines NP ont également un grand potentiel pour des applications d'imagerie, que ce soit par fluorescence ou encore imagerie par résonance magnétique (Carlini *et al.*, 2013; Guillet-Nicolas *et al.*, 2013). Ce ne sont que quelques-uns des exemples de la gamme d'applications potentielles pour les NP en santé.

1.6 Métrologie et évaluation de la contamination

La science qui mesure la matière à la nanoéchelle s'appelle la nanométrologie. Il est essentiel de pouvoir mesurer et caractériser la nanomatière si celle-ci est appelée à être générée en grande quantité pour des applications touchant les êtres vivants de près. La compréhension du comportement des NP en dépend. Toutefois, c'est un défi majeur, car l'appareillage requis pour

faire des mesures à la nanoéchelle est sensible aux vibrations, à la température, au pH du milieu, etc. Cela est en partie dû au fait que les NP en suspension dans l'air ou dans un milieu liquide sont hautement instables et plus réactives que les particules plus grosses (The Royal Society and The Royal Academy of engineering, 2004; Wilkinson, 2013). L'absence de caractérisation adéquate complique les comparaisons entre les études évaluant la toxicité des NP (Fatisson *et al.*, 2012). De plus, les techniques utilisées devront être choisies en fonction de l'état de dispersion des particules, c'est-à-dire en fonction du fait qu'elles sont mono-disperses ou poly-disperses. Dans le premier cas, les NP ont une taille définie, alors que dans le second, les NP forment des agglomérats de différentes tailles. Il faut noter également que chaque technique a ses forces, ses faiblesses, ses biais expérimentaux, etc. Pour ces raisons, il est conseillé pour les équipes de recherche qui étudient le comportement des NP, d'utiliser une diversité d'appareils et de techniques de mesure (Wilkinson, 2013). Enfin, il faut aussi souligner le fait qu'il y a une récente conscientisation dans le domaine de la nanotoxicologie par rapport à la problématique de la caractérisation qui est effectuée dans des conditions qui mimiquent peu ou pas la complexité des milieux physiologiques (E. J. Cho *et al.*, 2013).

La taille des NP est le paramètre le plus évalué en nanotoxicologie et la méthode la plus utilisée pour la mesurer est la diffraction dynamique de la lumière ou le *Dynamic light scattering* (DLS). C'est une méthode qui tire profit du principe du mouvement aléatoire des particules, selon lequel les petites particules bougent plus que les grosses particules; c'est le mouvement Brownien. Cette technique permet d'obtenir la moyenne des tailles mesurées ainsi qu'un indice de l'homogénéité de la dispersion appelé *polydisperisty index* (PDI). Dans les cas où l'échantillon est trop poly-disperse, la technique nommée *nanoparticle tracking analysis* (NTA) est plus appropriée. Cette technique utilise aussi le principe du mouvement Brownien des particules, mais a l'avantage de mesurer la taille des NP individuellement ce qui permet de déterminer le diamètre moyen des NP avec une résolution beaucoup plus élevée (Nanosight, 2014; Saveyn *et al.*, 2010). La microscopie peut réveler aussi un bon indice de la taille réelle des NP. Toutefois cette méthode exige une manipulation importante de l'échantillon à observer ce qui en fin de compte peut modifier l'échantillon ou créer des artefacts, comme on peut souvent en observer sur les images de microscopie électronique (MET) (E. J. Cho *et al.*, 2013).

Malgré tous les avantages et le potentiel qui sont liés aux NP, des effets toxiques causés par ces dernières sont parfois observés. Il ne faut pas exclure la possibilité que la toxicité observée puisse être due à une contamination au préalable par des lypopolisaccharides (LPS) ou endotoxines (durant la production ou lors d'une manipulation subséquente) (Smulders *et al.*, 2012). Le test du lysat d'amoebocytes de limule (*lal assay*) est le test le plus utilisé pour déterminer le niveau de contamination des produits biologiques, des médicaments et des solutions NP. Toutefois, dans le cas des NP, de récents travaux démontrent que celles-ci peuvent interférer avec ce test colorimétrique dont le principe est basé sur une réaction qui se produit entre le lysat de cellules rouges de limule et les endotoxines. Il a déjà été démontré que les NP d'or se lient et séquestrent le LPS, l'empêchant de réagir avec le lysat cellulaire de limule, interférant ainsi avec ce test. Un simple changement de couleur de la solution de NP causé par la NP elle-même peut également affecter la densité optique perçue par le spectromètre. Pour ces raison, la *Food and drug administration* (FDA) suggère de diluer l'échantillon de NP à tester (Dobrovolskaia *et al.*, 2010; Smulders *et al.*, 2012). Il est aussi possible d'évaluer la contamination potentielle d'une solution de NP en inoculant une gélose de milieu LB (*lysogeny broth)* pendant 24 ou 48 heures. Ce milieu est couramment utilisé pour évaluer la présence d'un large spectre de bactéries dans un milieu (MacWilliams, 2006). Enfin, en fonction de la NP étudiée et de ses effets sur la turbidité et la couleur du milieu, différents types d'essais LAL sont disponibles, soit les méthodes par coagulation sur gel, turbidimétrie cinétique ou encore par colorimétrie cinétique (Hurley, 1995; Smulders *et al.*, 2012).

CHAPITRE 2 : LA TOXICITÉ DES NANOPARTICULES ET LEUR EFFET SUR LE PROCESSUS INFLAMMATOIRE

2.1 Différences entre la toxicologie et la nanotoxicologie

La nanotoxicologie s'intéresse aux problèmes de santé qui peuvent être causés par les NP. Celles-ci vont pénétrer à l'intérieur du corps humain de façon naturelle par la voie gastro-intestinale, la

voie pulmonaire ou encore par la peau. L'entrée par injection intraveineuse est aussi une possibilité en ce qui concerne les NP fabriquées à des fins thérapeutiques (Buzea *et al.*, 2007). Dans un article de revue publié en 2005 par Gunter Oberdörster *et al.*, on y retrouve un résumé de l'ensemble des premières observations décrites dans les études ciblant les effets toxiques des NP. On y relate qu'en 1977, Berry et al. ont été les premiers à observer le phénomène de translocation. Les NP d'or utilisées (30nm) étaient capables de traverser l'épithélium alvéolaire et pénétrer à l'intérieur des plaquettes par la suite (Berry *et al.*, 1977). Une fois que les NP se retrouvent dans le sang, elles peuvent alors affecter des sites éloignées du point d'entrée tels la moelle épinière, les ganglions lymphatiques, la rate, le cœur ou encore le système nerveux central par exemple. Également, certaines NP se sont avérées être pro-oxydantes et d'autres antioxydantes. L'augmentation de la réactivité biologique sera un phénomène positif dans certains cas et négatif dans d'autres. Ainsi, des NP ayant des effets antioxydants ou encore ayant la capacité de transporter des médicaments et de passer au travers de barrières cellulaires peuvent être considérées comme des NP aux effets désirables. En contrepartie, des NP ayant des effets toxiques et qui provoquent un stress oxydatif ou un dysfonctionnement cellulaire important, peuvent être considérées comme indésirables. En fait, les attributs qui rendent les NP intéressantes (augmentation de la réactivité biologique, capacité de diffusion et de conjugaison, etc.) sont les mêmes qui posent potentiellement de nouveaux risques pour la santé (Hubbs *et al.*, 2013; Maynard, 2007; Maynard *et al.*, 2011; G. Oberdorster *et al.*, 2005b)

Toutefois, rien n'est simple en nanotoxicologie. En toxicologie classique (sauf exceptions), le risque pour la santé que possède une molécule est directement lié à la relation dose effet, la dose étant calculée en concentration de masse. De façon générale, en nanotoxicologie, plus le diamètre d'une NP est petit, plus le rapport surface/volume augmente et donc plus le potentiel toxique ou la capacité à moduler des réponses biologiques est élevé. Toutefois, au-delà de cette règle générale, les paramètres physicochimiques suivants peuvent influencer l'effet biologique observé : propriétés chimiques de surface, modifications de surface, nombre de particules, degré d'ionisation, potentiel d'oxydoréduction, solubilité, concentration, nombre de particules, structure cristalline, l'état d'agrégation, la charge électrique de surface, etc. Pour cette raison, la recherche en nanotoxicologie est souvent effectuée par des équipes multidisciplinaires qui travaillent dans des domaines tels que la toxicologie, mais aussi les sciences des matériaux, médecine, biologie

moléculaire et la bio-informatique. Pour l'ensemble des raisons mentionnées dans cette section, il est essentiel en nanotoxicologie de bien caractériser les NP pour être en mesure de pouvoir effectuer des liens de cause à effet entre des caractéristiques physico-chimiques de la NP et ses effets biologiques (Hubbs *et al.*, 2013; G. Oberdorster *et al.*, 2005b). Enfin, la diversité et la complexité des NP rappellent à quel point la nanotoxicologie est une discipline très complexe étant donné les connaissances, les ressources, l'appareillage et les différentes connaissances scientifiques (de domaines scientifiques différents) que cela requiert (Hubbs *et al.*, 2013; Maynard, 2007; G. Oberdorster *et al.*, 2005a).

Les principaux effets modulatoires sur le processus inflammatoire de quelques NP représentatives sont répertoriés dans les tableaux 3-5. Ainsi, autant les interactions qui sont bénéfiques et protectrices que celles qui sont négatives et dommageables y sont inscrites. Les modulations du processus inflammatoire sont fréquemment associées aux expositions aux NP (Maynard *et al.*, 2011).

2.2 Les nanoparticules de type oxyde métallique

Les NP de la famille des oxydes-métalliques (OxM) génèrent beaucoup d'attention. D'un point de vue industriel, c'est une catégorie de NP qui est produite en grande quantité. Elles ont de nombreuses propriétés semi-conductrices qui leur permettent d'être utilisées comme catalyseurs pour des réactions d'oxydoréduction. Ces NP sont également abondamment utilisées dans les crèmes solaires, car elles sont capables d'absorber les rayons UV (voir section 1.1.5). Dans le cas des NP de ZnO et TiO_2 par exemple, elles peuvent être utilisées comme agents de stérilisation à cause de leur capacité de photo-catalyse (Osmond *et al.*, 2010; Simon-Vazquez *et al.*, 2014; Vandebriel *et al.*, 2012; H. Zhang *et al.*, 2012). Les NP de TiO_2 et ZnO ont été identifiées comme des NP à haute importance (à cause de leur potentiel économique) par l'organisation de coopération et de développement économique (Baker *et al.*, 2014; OCDE, 2012)

Le TiO_2 sous forme non nanométrique est déjà abondamment utilisé dans l'industrie. C'est un matériau qui existe dans la nature dans les minéraux comme l'anatase, le rutile et la brookite. Ce

sont d'ailleurs les formes cristallines sous lesquelles on peut majoritairement les retrouver. En vrac, c'est une poudre blanche alors qu'à la nanoéchelle, ce matériau devient transparent. De nombreuses études ont évalué son potentiel de toxicité et ont démontré de fortes interactions entre ces NP et divers types cellulaires (Okuda-Shimazaki *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2008; Sayes *et al.*, 2006; Webster, 2009).

En plus d'être parmi les NP les plus communément utilisées dans l'industrie, les NP de ZnO, quant à elles, ont un bon potentiel anti-cancérigène (Hanley *et al.*, 2008; Rasmussen *et al.*, 2010). Comparativement à l'oxyde de zinc en vrac, les NP de ZnO sont transparentes tout comme les NP de TiO_2. Le zinc en tant qu'élément trace est vital pour le bon fonctionnement du système immunitaire chez l'humain (Shankar *et al.*, 1998). Il est envisageable de penser qu'une exposition aux NP de ZnO peut affecter le système immunitaire et de façon plus spécifique, affecter l'inflammation (Prach *et al.*, 2013).

2.3 Les fullerènes et le fullerenol

Les NP de fullerènes (C_{60}) sont des structures icosaèdres composées de 60 atomes de carbone. Une NP de C_{60} individuelle possède une taille proche du nanomètre. Toutefois, dépendamment du tampon dans lequel elles sont, elles peuvent s'agréger(Saathoff *et al.*, 2011). Ce sont des molécules peu solubles en solution aqueuse, ce qui explique probablement le nombre peu élevé d'études portant directement sur la molécule de C_{60} non modifiée. Toutefois, des modifications de surface qui peuvent les rendre plus solubles peuvent facilement être apportées. Ainsi, on retrouve communément des dérivés du fullerène appelés fullerenols. Ces derniers sont composés des groupements hydroxyle (-OH) qui sont adsorbés sur la cage sphérique des 60 atomes de carbone. L'une des principales caractéristiques de ces NP est leur potentiel antioxydant (Saathoff *et al.*, 2011; Webster, 2009). Les principales observations concernant sur les effets du fullerène et du fullerenol sur le processus inflammatoire sont répertoriées dans le tableau 5.

Les principales observations portant sur les effets de ces trois NP sur le processus inflammatoire sont répertoriées dans les tableaux 3 à 5. On y constate que les effets biologiques des NP sont multiples. Il est important de souligner tout d'abord que la majorité des études *in vitro* évaluent les

effets des NP sur des lignées cellulaires plutôt que sur des cellules primaires. Également, il n'y a à peu près aucune étude qui porte sur les interactions directes entre les NP et les neutrophiles. Aussi, dans la plupart des cas, les équipes de recherche évaluent l'effet des NP surtout sur : l'intégrité membranaire, l'ADN, la présence de cytokines ou d'ARNm liés à l'inflammation, la croissance cellulaire, la présence d'espèces réactives de l'oxygène, l'apoptose. D'autres paramètres tels que la phagocytose, l'adhésion, les protéines nouvellement synthétisées, la dégranulation, la chimiotaxie et autres sont moins étudiés. Pareillement, malgré toute l'emphase qui est mise sur l'importance de la caractérisation dans le domaine des nanosciences, on constate que les deux paramètres physiques les plus résolus sont ceux du diamètre et de la charge électrique de surface. En ce qui concerne les études *in vivo*, la grande majorité des études traitent de l'inflammation pulmonaire. Après une exposition aux NP sous forme d'aérosol, par inhalation ou encore par instillation par la trachée, les constituants du liquide broncho-alvéolaire (tels que les enzymes, cytokines, types cellulaires prédominants, ROS) sont ensuite analysés. Il est important de souligner que dans la plupart de ces expériences *in vivo*, le neutrophile est plus souvent qu'autrement impliqué.

Tableau 3. Différentes études portant sur les effets des nanoparticules de dioxyde de titane sur les neutrophiles et le processus inflammatoire.

Étude ***In vitro / In vivo***	**Paramètre utilisé pour évaluer la relation dose/réponse**	**Type de cellule et / ou animal**	**Caractéristiques des nanoparticules**	**Effets sur les neutrophiles**	**Autres effets sur le processus inflammatoire observés**	**Références**
In vitro	-Concentration massique	-Neutrophiles humains (lignée primaire)	-Taille agrégats : 345-1000 nm -Structure cristalline : anatase et rutile	**-Pas d'effet cytotoxique** (jusqu'à 200 ug/ml) Techniques : bleu de trypan et libération lysozyme **-Augmentation des ROS** de façon concentration dépendante (jusqu'à 200ug/ml).Technique : chemiluminescence		(Hedenborg, 1988a)
In vitro	-Concentration massique	-Cellules de type macrophage murain (lignée J774A.1) et de type macrophage alvéolaires primaires canins (lignée BD-AM)	-Taille : 220 et 20 nm -Aire de surface : 6 et 48m^2/g		**-Diminution de la phagocytose des cellules J774A.1** (100ug/ml) Technique : phagocytose des billes de latex. **-Pas d'effet sur la phagocytose des cellules BD-AM** (100ug/ml) Technique : Idem que J774A.1	(Moller *et al.*, 2002)
In vitro	-Concentration massique	-Cellules de type fibroblastes dermiques humaines (lignée HDF) -Cellules épithéliales pulmonaires humaines (lignée A549)	-Taille : 3-10nm -Structure cristalline : anatase et rutile (comparaison entre les deux) -Aire de surface : 110-155 m^2/g		-Lignée HDF : **-Effet cytotoxique** (30-3000ug/ml) Techniques : Libération de LDH et actvité mitochondriale (essai MTT) **-Pas de sécrétion d'IL-8** Technique : Elisa -Lignée A549 : **-Effet cytotoxique** (300-3000ug/ml) Techniques : Libération de LDH et Actvité mitochondriale (essai MTT) **--Sécrétion d'IL-8** Technique : Elisa **Forme cristalline anatase plus cytotoxique	(Sayes *et al.*, 2006)

Étude ***In vitro / In vivo***	**Paramètre utilisé pour évaluer la relation dose/réponse**	**Type de cellule et / ou animal**	**Caractéristiques des nanoparticules**	**Effets sur les neutrophiles**	**Autres effets sur le processus inflammatoire observés**	**Références**
In vitro	-Concentration massique	-Cellules bronchiques humaines (lignée BEAS-2B)	-Taille : 21nm		-**Effet cytotoxique** (5-40ug/ml) Technique : Activité mitochondriale (essai MTT) -**Augmentation des ROS** (24h) ; (20 et 40 ug/ml) Technique : Sonde H2DCFDA -**Augmentation de l'expression d'ARNm liées au stress oxydatif** (Heme oxygénase 1; Catalase, Glutathione-S-transférase, etc.) Technique : RT-PCR -**Augmention de l'expression d'ARNm liée à l'inflammation** (IL-1, IL-6, IL-8, TNF-α, CXCL-2) -**Activation de la caspase-3** Technique : essai colorimétrique p-nitroaniline -**Condensation de la chromatine** Technique : Coloration au DAPI	(Park *et al.*, 2008)
In vitro	-Concentration massique	-Cellules de type monocytaire humaines (lignée THP-1) -Cellules de type épithéliales pulmonaires (lignée NCI-H292)	-Taille agrégats : 166 et 596 nm		THP-1 : -**Pas d'effet cytotoxique** par deux types d'agrégats à 24h (20ug/ml) Technique : Quantification de l'ATP cytoplasmique -**Augmentation de l'expression de l'ARNm lié à l'inflammation** par gros agrégats (IL-6) Technique : qrtPCR NCL-H292 : -**Effet cytotoxique** par gros agrégat à 24h (20ug/ml) Technique : Idem que THP-1 - **Augmention de l'expression d'ARNm liée à l'inflammation** par gros agrégat (Il-6, THP-1) Technique : qrtPCR	(Okuda-Shimazaki *et al.*, 2010)

Étude *In vitro / In vivo*	Paramètre utilisé pour évaluer la relation dose/réponse	Type de cellule et / ou animal	Caractéristiques des nanoparticules	Effets sur les neutrophiles	Autres effets sur le processus inflammatoire observés	Références
In vitro	-Concentration massique	-Cellules de type pré-ostéoblaste murines (lignée MC-3T3) -Cellules de type fibroblaste murines (lignée L929)	-Taille : < 25nm -Structure cristalline de type anatase -Potentiel Zeta ζ : -6.98mV -Aire de surface : 46.85m^2/g		MC-3T3 : **-Effet cytotoxique à faible concentration** à 24h et 48 h (20-40ug/ml) Techniques : Bleu de trypan et libération de LDH **-Pas d'effet sur adhésion cellulaire** (1-40ug/ml) Technique : Compte après incubation de 2 heures en plaque et lavage à la trypsin-EDTA **-Diminution de la taille et augmentation de la complexité cellulaire** à 24h et 48h (20-40ug/ml) Technique : Cytométrie en flux et microscopie optique **-Sécrétion d'IL-6** (20-40ug/ml) **-Pas de sécrétion de TNF-α** (20-40ug/ml) Technique : Elisa L929 : **-Effet cytotoxique à forte concentration** à 24h et 48h (500 et 1000ug/ml) Techniques : IDEM que MC-3T3 **-Pas d'effet sur adhésion cellulaire** (1-40ug/ml) Technique : IDEM que MC-3T3 **-Diminution de la taille et augmentation de la complexité cellulaire** à 24h et 48h (500-1000ug/ml) Technique : IDEM que MC-3T3 **-Pas de sécrétion d'IL-6** (1-1000ug/ml) **-Pas de sécrétion de TNF-α** (1-1000ug/ml) Technique : Elisa	(Bernier *et al.*, 2012)

Étude *In vitro / In vivo*	**Paramètre utilisé pour évaluer la relation dose/réponse**	**Type de cellule et / ou animal**	**Caractéristiques des nanoparticules**	**Effets sur les neutrophiles**	**Autres effets sur le processus inflammatoire observés**	**Références**
In vitro	- Masse par aire de surface	-Cellules de type endothéliales humaines (HUVEC)	-Taille : <50nm -Agrégat mesuré de : 421nm -Structure cristalline de type anatase		-**Internalisation des NP** Technique : MET -**Inhibition de prolifération cellulaire** à 24 et 72 h (5-40ug/cm^2) Technique : Marquage au cristal violet -**Augmentation du taux d'apoptose** à 24h (5-40ug/cm^2) Technique : Cytométrie en flux (AnnexineV) -**Augmentation de molécules d'adhésion** ICAM-1, VCAM-1 et PECAM-1 à 3h et 24h (5-40ug/cm^2) Technique : Cytométrie en flux -**Augmentation des ROS** après 30 min. (5-20ug/cm^2) Technique : Sonde H2DCFDA -**Activation du facteur de transcription NF-κB** (5-20ug/cm^2) Techniques : translocation dans le noyau de NF-κB par EMSA et phosphorylation de IκB-α par Western blot	(Montiel-Davalos *et al.*, 2012)

Étude ***In vitro / In vivo***	**Paramètre utilisé pour évaluer la relation dose/réponse**	**Type de cellule et / ou animal**	**Caractéristiques des nanoparticules**	**Effets sur les neutrophiles**	**Autres effets sur le processus inflammatoire observés**	**Références**
In vitro	- Concentration massique	-Cellules endothéliales vasculaires porcines (cellules primaires)	-Taille : 5nm -Agrégats: 349nm -Agrégats (SEM): 79 nm -Structure cristalline de type anatase -Aire de surface : 93.9m^2/g		-**Augmentation de l'ion superoxide (O_2^-)** après 1h (10-50ug/ml) Technique : Marquage au dihydroethydium (DHE) et au MitoSOX Red -**Activation des voies MAPK et PI3K/Akt** après 30min. Technique : Western blot - **Activation du facteur de transcription NF-κB** (10-50ug/ml) Techniques : translocation dans le noyau de NF-κB par EMSA et phosphorylation de IκB-α par western blot -**Augmentation de l'expression de l'ARNm de MCP-1 et VCAM-1** à 2, 4, 8 et 16h (1-50ug/ml) Techniques : qrtPCR et western blot pour VCAM-1 -**Augmentation de l'autophagie** (1-50ug/ml) à 2, 4, 8, 16h Technique : Western blot (marqueur d'autophagie LC3-I et LC3-II)	(Han *et al.*, 2013)
In vitro	-Concentration massique	-Kératinocytes (cellules primaires)	-Taille : 22nm -Taille agrégats: 300nm dans H_2O et 600nm dans tampon physiologique (EpiGRO)		-**Effet cytotoxique** à 10ug/ml Technique : Essai WST -**Activation de l'autophagie** à 10ug/ml Technique : Microscopie à fluorescence (marqueur d'autophagie LC3-I et LC3-II) et observation de vacuoles au MET	(Zhao *et al.*, 2013)
In vitro	-Concentration massique	-Neutrophiles humains	-Taille moyenne des agrégats : 180nm	-**Transition des PMN vers une forme activée** suite à incubation avec NP de TiO_2 Technique : Microscopie SEM		(da Rosa, 2013)
In vivo	-Masse par volume	-Rats mâles	-Taille : 250 et 20nm	Inhalation – durée d'exposition de 3 mois: -**Augmentation de la quantité de leucocytes** dans les BAL par les NP de TiO_2 de 20nm - surtout **PMN** et macrophages alvéolaires (23.5 mg/m^3) Leur niveau est revenu à la normale (vs souris contrôles) presqu'un an après l'exposition initiale.		(G. Oberdorster *et al.*, 1994)

Étude ***In vitro / In vivo***	**Paramètre utilisé pour évaluer la relation dose/réponse**	**Type de cellule et / ou animal**	**Caractéristiques des nanoparticules**	**Effets sur les neutrophiles**	**Autres effets sur le processus inflammatoire observés**	**Références**
In vivo	-Masse par poids corporel	-Rats mâles	-TiO_2 (Rutile) : 300nm -TiO_2 (Anatase; bâtonnets) 233nm longueur 35nm largeur -TiO_2 (Anatase, sphériques) 6nm	Instillation intratrachéale – mesure post-exposition à 24h : -Les trois types de NP ont causé une légère inflammation 24h après exposition. **Pourcentage de neutrophiles très élevé** dans les BAL. (À 5mg/kg) Une résolution s'effectue après une semaine.	Instillation intratrachéale - mesure post-exposition à 24h: -**Effet cytotoxique.** Il y a eu **augmentation de concentration de l'enzyme LDH** dans les BAL des souris exposées au TiO_2 Anatase/bâtonnet après 24h. (5mg/kg) Mais pas pour le TiO_2 Anatase/sphérique ou TiO_2 Rutile -**Aucun effet observable sur coupes histologiques** du poumons après exposition aux 3 différentes sortes de NP (5mg/kg)	(Warheit *et al.*, 2006)
In vivo	-Masse	-souris femelles	-Taille : 140nm -Aire de surface : 34.1m^2/g	Injection intra-péritonéale (ovalbumine + TiO_2) et exposition à OVA sous forme d'aérosol 27 et 34 jours PI (mesure des paramètres 35 jours post- injection) : -**Augmentation du nombre de neutrophiles** (éosinophiles et lymphocytes aussi) dans les BAL des souris OVA + TiO_2 vs souris OVA seulement. (250ug)	Injection intra-péritonéale (ovalbumine + TiO_2) et exposition à OVA sous forme d'aérosol 27 et 34 jours PI (mesure des paramètres 35 jours post- injection) : -**Augmentation des niveaux de IgE et IgG1 vs souris injectées avec OVA seulement** (induction réponse type th2) L'injection IP de OVA et de TiO_2 à différentes concentrations a révélé le **pouvoir adjuvant du TiO_2**. (250ug)	(Larsen *et al.*, 2010)

Étude ***In vitro / In vivo***	**Paramètre utilisé pour évaluer la relation dose/réponse**	**Type de cellule et / ou animal**	**Caractéristiques des nanoparticules**	**Effets sur les neutrophiles**	**Autres effets sur le processus inflammatoire observés**	**Références**
In vivo	-Masse par poids corporel	-Rats mâles	-Taille : 21nm -Agrégats : 200nm et 2 µm -(75% anatase, 25% rutile)	Instillation intratrachéale – mesure des paramètres 1, 2, 8, 16, 30 et 90 jours post-instillation : -**Augmentation du nombre de neutrophiles** (éosinophiles aussi) dans les BAL de façon concentration dépendante (1-7.5 mg/kg) -**Nombre de neutrophiles élevé** jusqu'à 30 jours post-instillation (5mg/kg)	Instillation intratrachéale – mesure des paramètres 1, 2, 8, 16, 30 et 90 jours post-instillation : -**Recrutement de cellules** dendritiques et cellules NK suivi d'un recrutement de lymphocytes T CD4 + et CD8 + 8 à 30 jours PI (5mg/kg) . -**Présence de cytokines pro-inflammatoires dans dans les fluides des BAL** 1-2 jours post-instillation (5mg/kg) : IL-1α, IL-1β, IL-6, CINC-1 (*cytokine induced neutrophil chemoattractant*), et GM-CSF -**Présence de cytokines pro-inflammatoires dans le sérum** 16 jours post-instillation (5mg/kg) : Il-1α, IL-6, IFN-γ et TNF-α	(Gustafsson *et al.*, 2011)
In vivo	-Masse	-souris femelles	-TiO_2 Rutile Taille : 8nm (par XRD) Aire de surface : 73 m^2/g -TiO_2 Anatase Taille : 10nm Aire de surface : 150 m^2/g -TiO_2 Amorphe Taille : N.D. Aire de surface : 433 m^2/g	Instillation intratrachéale – mesure des paramètres à 24h et 3 mois : -**Augmentation du nombre de neutrophiles** après 24 heures indépendamment de la forme de TiO_2 à la plus forte dose (500ug)	Instillation intratrachéale – mesure des paramètres à 24h et 3 mois : -**Augmentation du nombre de macrophages** après 3 mois post instillation. Surtout par souris exposées au TiO_2 de forme rutile de façon dose – dépendante (5-500ug) -**Présence de cytokine IL-6** après 24h post-instillation. Seulement par souris exposées au TiO_2 de forme rutile (500ug)	(Roursgaard *et al.*, 2011)

Étude ***In vitro / In vivo***	**Paramètre utilisé pour évaluer la relation dose/réponse**	**Type de cellule et / ou animal**	**Caractéristiques des nanoparticules**	**Effets sur les neutrophiles**	**Autres effets sur le processus inflammatoire observés**	**Références**
In vivo	-Masse par volume	-Rats mâles	TiO_2 <100nm : -Taille : 30nm -Anatase 90% , Rutile 10% TiO_2 > 100 nm : -Taille : 190nm - Anatase 90% , Rutile 10%	-Inhalation par le nez durant 6 heures : - **Nombre de neutrophiles plus élevé** dans les BAL des rats exposés aux NP > 100nm ($7mg/m^3$)	-Inhalation par le nez durant 6 heures : -**Présence du marqueur d'inflammation MCP-1** dans les BAL des rats exposés aux NP > 100 nm ($7mg/m^3$) -**Aucune augmentation de marqueurs d'inflammation (I L-1α, IL-6, TNF-α)** après exposition aux différentes NP -**Effet cytotoxique** causé par les NP < 100 nm ($7mg/m^3$) Technique : libération de LDH -**Augmentation des ROS** causée par les NP < 100 nm ($7mg/m^3$) Technique : essai au 8-Isoprostane -**Présence importante de NP dans les macrophages chez les rats exposés aux NP > 100nm vs rats exposés aux NP < 100nm (**2 et $7mg/m^3$) Technique : Microscopie optique	(Noel *et al.*, 2012)

Tableau 4. Différentes études portant sur les effets des nanoparticules de dioxyde de zinc sur les neutrophiles et le processus inflammatoire.

In vitro / In vivo	**Paramètre utilisé pour évaluer la relation dose/réponse**	**Type de cellule et / ou animal (souche)**	**Caractéristiques des nanoparticules**	**Effets sur les neutrophiles**	**Autres effets sur le processus inflammatoire observés**	**Références**
In vitro	-Concentration massique	-Cellules de type endothéliales vasculaires (HUVEC)	-Taille : 50nm -Aire de surface : 10.8m^2/g Taille : 100nm -Aire de surface : 15-25m^2/g		- **Effet cytotoxique. Diminution des cellules viables** ($\geq$ 45µg/ml) Technique : Activité mitochondriale (essai MTT) -**Augmentation du taux de prolifération cellulaire** (de 0 à 1 ug/ml) Technique : Activité mitochondriale (essai MTT) -**Augmentation du stress oxydatif** (de 0 à 45 ug/ml) Technique : Augmentation de la quantité de GSSG (la forme oxydée du glutathion) - **Augmentation de l'expression de la molécule d'adhésion ICAM-1** de façon concentration dépendante (de 5 à 30 ug/ml) Technique : Western blot - **Augmentation de l'activité de NF-κB** après 24h (30ug/ml) Technique : Infection à l'adénovirus recombinant AdV-NFκB-luciférase	(Tsou *et al.*, 2010)

Étude *In vitro / In vivo*	**Paramètre utilisé pour évaluer la relation dose/réponse**	**Type de cellule et / ou animal**	**Caractéristiques des nanoparticules**	**Effets sur les neutrophiles**	**Autres effets sur le processus inflammatoire observés**	**Références**
In vitro	-Concentration massique	-Cellules bronchiques humaines (lignée BEAS-2B)	-Taille : 20nm -Agrégats : 50 à 300nm -Aire de surface : 47.47m^2/g		**- Effet cytotoxique. Diminution des cellules viables de façon concentration dépendante dommage membranaire à 6, 12 et 24h** (5 à 10ug/ml) Technique : Essai MTS et libération de LDH **-Augmentation des ROS intracellulaires de façon concentration dépendante** après 6 et 24h. (5-10ug/ml) Technique : Sonde H2DCF **-Effet cytotoxique annulé en présence de substance anti-oxydante (N-acétylcysteine ou NAC) à 24h** (8 ug/ml) Technique : Essai MTS	(Huang *et al.*, 2010)

Étude *In vitro / In vivo*	Paramètre utilisé pour évaluer la relation dose/réponse	Type de cellule et / ou animal	Caractéristiques des nanoparticules	Effets sur les neutrophiles	Autres effets sur le processus inflammatoire observés	Références
In vitro	-Concentration massique	-Cellules bronchiques humaines (lignée BEAS-2B) - Cellules de type macrophage murins (lignée RAW – 264.7) -Cellules primaires dendritiques murines	NP de forme spérique : Taille : 20nm Agrégats : 113nm Potentiel zeta (ζ) :-36mV Aire de surface : 35.3 m^2/g NP en forme de feuillet : Taille : 325 x 15nm Agrégats : 420nm Potentiel zeta (ζ) :-31mV Aire de surface : 28.6 m^2/g		-**Effet cytotoxique de façon dose dépendante pour les deux groupes de NP** après 24h (15 à 20ug/ml) *note : Cellules RAW – 264.7 + sensibles aux NP sphériques que cellules BEAS-2B. Technique : Essai WST -**Plus grande internalisation des NP de ZnO sphériques que ZnO en forme de feuillet dans les cellules BEAS-2B** à 1, 4, et 24h. Technique : Cytométrie en flux suite à couplage des NP avec FITC **- Augmentation des ROS intracellulaires de façon concentration dépendante dans les cellules BEAS-2B** après 4 heures (10-20ug/ml) *note : Plus grande production de ROS par NP sphériques. Technique : Sonde H2DCF - **Augmentation de la sécrétion de cytokine pro-inflammatoire IL-6 de façon concentration dépendante pour les deux groupes de NP chez les cellules RAW-264.7** après 6 heures (0.3-10ug/ml) Technique : Elisa -**Augmentation de l'expression de CD80 et CD86 à la surface des cellules dendritiques de façon concentration dépendante pour les deux groupes de NP** après 24h (3-30 ug/ml) Technique :Cytométrie en flux -**Augmentation de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF-α de façon concentration**	(Heng *et al.*, 2011)

					dépendante par les cellules dendritiques après 24h (3-30 ug/ml) *note : Plus grande sécrétion de TNF-α par cellules exposées aux NP sphériques Technique : Elisa	

Étude ***In vitro / In vivo***	**Paramètre utilisé pour évaluer la relation dose/réponse**	**Type de cellule et / ou animal**	**Caractéristiques des nanoparticules**	**Effets sur les neutrophiles**	**Autres effets sur le processus inflammatoire observés**	**Références**
In vitro	-Concentration massique	-Cellules du foie humaine (lignée HepG2)	-Taille : 30nm -Agrégats : 267nm -Potentiel zeta (ζ) :-12mV		-**Internalisation des NP dans les cellules** après 6h Technique : Augmentation de la taille cellulaire (SSC) en cytométrie en flux (14 et 20ug/ml) - **Effet cytotoxique de façon dose dépendante** après 6, 12 et 24h. (> 14 ug/ml) Techniques : essai MTT, LDH et NRU (*neutral red uptake assay*) - **Augmentation des ROS intracellulaires et augmentation de la peroxydation des lipides** après 6h (20ug/ml) Technique :Sonde H2DCF et mesure de la formation de peroxyde d'hydrogène **-Dommage à l'ADN des cellules** après 6 heures (> 14 ug/ml) Technique : essai commette **-Augmentation du taux d'apoptose après** 12 heures (à 14 et 20 ug/ml) Technique : Annexine V / PI et marquage au Hoechst **-Diminution du potentiel membranaire de la mitochondrie** après 12h (20ug/ml) Technique : cytométrie en flux (marqueur fluorescent JC-1) **-Modulation des protéines BAX (augmentation), BCL-2 (diminution), pro-caspase-9 (diminution), caspase-9 clivée (augmentation) et augmentation de la phosphorylation de p53** après 9 heures (20ug/ml) Technique : Western Blot	(Sharma *et al.*, 2012)

					- Effet cytotoxique annulé en présence des substance anti-oxydantes N-Acétylcysteine (ou NAC) et vitamine C ainsi que après 24 heures (20ug/ml) Technique : essai MTT **-Effet sur le taux d'apoptose, sur le potentiel membranaire, sur la modulation Bax/Bcl2 et p53 annulé ou atténué par NAC** (20ug/ml) **-Aucun effet des ions Zn^{2+} sur la viabilité cellulaire** après 6, 12 et 24 heures (18.46 uM) Technique : essai MTT	

Étude ***In vitro / In vivo***	**Paramètre utilisé pour évaluer la relation dose/réponse**	**Type de cellule et / ou animal**	**Caractéristiques des nanoparticules**	**Effets sur les neutrophiles**	**Autres effets sur le processus inflammatoire observés**	**Références**
In vitro	Nombre de particules par million de cellules	-Cellules de type monocytaires humaines (lignée THP-1)	-Taille : 70nm -Agrégat : 108.7nm		**- Effet cytotoxique de façon dose dépendante** après 24 heures (3-300ppm/10^6cellules) Technique : Essai WST, LDH et 7AAD *Note : La cytotxicité des NP de ZnO a été détectée à des doses plus petites avec le test 7AAD **-Rétention des ions de zinc accentuée lorsque les NP sont dans un milieu avec 10% sérum après filtration** Technique : Spéctrométrie d'absorption atomique (AAS)	(Prach *et al.*, 2013)

Étude ***In vitro / In vivo***	**Paramètre utilisé pour évaluer la relation dose/réponse**	**Type de cellule et / ou animal**	**Caractéristiques des nanoparticules**	**Effets sur les neutrophiles**	**Autres effets sur le processus inflammatoire observés**	**Références**
In vitro	-Concentration massique	-Cellules de type kératinocytes primaires humaines et cellules de type kératinocyte (lignée HaCaT)	-Taille : 20nm -Agrégats : 181nm -Potentiel zeta (ζ) :-40mV		- **Effet cytotoxique de façon dose dépendante** après 24 heures (≥ 10ug/ml) Technique : Essai MTT **-Augmentation des ROS intracellulaires et mitochondriaux** après 30 min (≥10ug/ml) Techniques : sonde H2DCF et marquage au *MitoSOX Red* **-Augmentation de la protéine Erg-1 (early growth response-1) de façon concentration dépendante** après 2 heures (5 à 50ug/ml) Technique : Western blot **-Activation des MAPK ERK ½, JNK et p38** à des temps allant jusqu'à 12 heures (10ug/ml) Technique : Western blot **-L'inhibition de la phosphorylation de ERK diminue l'activation de ERG-1** après 2 heures (10ug/ml) Technique : western blot **-Implication des ROS dans l'activation de ERG-1 via la phosphorylation de ERK1/2**. Un prétraitement des cellules avec un antioxydant (NAC) a diminué la phosphorylation de ERK1/2 et l'activation de ERG-1 après 2h (10ug/ml) **-Implication du facteur de transcription ERG-1 dans la production de TNF-α** par les cellules HaCat après 12 heures (10ug/ml) Technique : rtPCR (avec siRNA pour ERG-1) et ELISA pour TNF-	(Jeong *et al.*, 2013)

Étude *In vitro / In vivo*	**Paramètre utilisé pour évaluer la relation dose/réponse**	**Type de cellule et / ou animal**	**Caractéristiques des nanoparticules**	**Effets sur les neutrophiles**	**Autres effets sur le processus inflammatoire observés**	**Références**
In vitro	Concentration massique	-Cellules de type épithéliales pulmonaires humaines (lignée A549)	-Taille : 50-70nm -Agrégats dans le tampon physiologique : 936nm -**Agrégats dans le tampon physiologique + sérum :** 329nm -Potentiel zeta (ζ) dans tampon physiologique: (-2.4mV) -**Potentiel zeta (ζ) dans tampon physiologique + sérum**: -7mV		-**Plus grande toxicité causée par les NP de ZnO dans le tampon physiologique sans sérum vs avec sérum** après 24 heures (≥20ug/ml) Technique : essai MTT **Plus grande libération d'ions Zn^{2+} dans le surnageant de NP dans tampons physiologiques sans sérum vs avec sérum** après 24h (10-40ug/ml) Technique : Centrifugation et analyse du surnageant par spectrométrie de masse couplée au plasma -**Plus grande toxicité causée par les ions Zn^{2+} provenant du surnageant de NP dans tampon physiologique sans sérum vs avec sérum** après 24h (10-40ug/ml) *Note : Aucune toxicité observée par les ions Zn^{2+} provenant du SN des NP dans tampon physiologique avec sérum Technique : essai MTT -**Les ions ne sont pas plus cytotoxiques que les NP elles-même.**	(Hsiao *et al.*, 2013)

Étude ***In vitro / In vivo***	**Paramètre utilisé pour évaluer la relation dose/réponse**	**Type de cellule et / ou animal**	**Caractéristiques des nanoparticules**	**Effets sur les neutrophiles**	**Autres effets sur le processus inflammatoire observés**	**Références**
In vivo	-Nombre de particules par volume	-Rats mâles	-Taille : 35nm	-Inhalation pendant 6 heures. Mesure des paramètres 24h post inhalation. Concentrations utilisées allant de $1.5x10^6NP/cm^3$ à $7.9x10^6NP/cm^3$ **-Augmentation du nombre de neutrophiles de façon concentration dépendante dans les BAL** **-Bonnes corrélations entre la masse et l'aire de surface des NP vs le pourcentage de PMN (R^2 = ~0.95)** **-Bonnes corrélations entre la masse et l'air de surface des NP vs le nombre de PMN (R^2 = ~0.83)**	-Inhalation pendant 6 heures. Mesure des paramètres 24h post inhalation. Concentrations utilisées allant de $1.5x10^6NP/cm^3$ à $7.9x10^6NP/cm^3$ **-Cytotoxicité : Augmentation de la concentration de LDH et de la quantité de protéines totales de façon concentration dépendante dans les BAL** Techniques : Autoanalyser (spotchem sp4410) pour LDH et t*otal protein assay kit.* -**Augmentation de la concentration du marqueur de stress oxydatif 8-OHdG de façon concentration dépendante dans les BAL**Technique : Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. -**De mauvaises corrélations entre la masse et le nombre de NP vs la concentration de LDH, TP et 8-OHdG**.	(Ho *et al.*, 2011)

Étude *In vitro / In vivo*	**Paramètre utilisé pour évaluer la relation dose/réponse**	**Type de cellule et / ou animal**	**Caractéristiques des nanoparticules**	**Effets sur les neutrophiles**	**Autres effets sur le processus inflammatoire observés**	**Références**
In vivo	-masse par aire de surface par rat -En réalité c'est la masse seulement	-Rats femelles	-Taille : <10nm -Agrégats : 306nm -Potentiel zeta (ζ) :-27mV Aire de surface : 40.2 m^2/g	Instillation intratrachéale – mesure des paramètres 24h et 4 semaines post-instillation (103 et 310 ug par rat) -**Augmentation du nombre de PMN** dans les BAL après 24 heures (103 et 310 ug par rat) -**Analyses histologiques : inflammation associée à une infiltration neutrophilique dans les poumons** (alvéoles, espace vasculaire et bronches) après 24h (310 ug par rat)	Instillation intratrachéale – mesure des paramètres 24h et 4 semaines post-instillation (103 et 310 ug par rat) -**Augmentation très significative du nombre d'éosinophiles** dans les BAL après 24 heures (103 et 310 ug par rat) -**Augmentation significative du nombre de cellules totales** dans les BAL après 4 semaines (103 et 310 ug par rat) - **Augmentation très significative du nombre d'éosinophiles** dans les BAL après 4 semaines (310 ug par rat) -**Effet cytotoxique. Augmentation des niveaux de LDH et de protéines totales** dans les BAL après 24 heures (103 et 310 ug par rat) -**Analyses histologiques : Inflammation associée à une infiltration éosinophilique dans les poumons** (alvéoles, espace vasculaire et bronches) après 24h (310 ug par rat) -**Analyses histologiques : Inflammation associée à une infiltration d'éosinophiles et de macrophages avec présence de fibrose** après 4 semaines (310 ug par rat) -**Augmentation d'IL-1β** dans les BAL après 24h (310 ug par rat) -**Augmentation d'IL-13** dans les BAL après 24h (310 ug par rat)	(W. S. Cho *et al.*, 2010)

					-**Augmentation d'IFN-γ** après 4 semaines (310 ug par rat)	

Étude *In vitro / In vivo*	**Paramètre utilisé pour évaluer la relation dose/réponse**	**Type de cellule et / ou animal**	**Caractéristiques des nanoparticules**	**Effets sur les neutrophiles**	**Autres effets sur le processus inflammatoire observés**	**Références**
In vivo	-Masse par souris	-Souris mâles	-Taille : 70nm -Aggrégats : Entre 300 et 400nm -Potentiel zeta (ζ) :-19 mV Aire de surface : 14.7 m^2/g	Instillation intratrachéale - mesure des paramètres 2, 7, 14 et 28 jours post-instillation (à 80ug/souris) : -**Augmentation du nombre de neutrophiles** dans les BAL au jour 2 P.I.	Instillation intratrachéale - mesure des paramètres 2, 7, 14 et 28 jours post-instillation (à 80ug/souris) : -**Augmentation de la concentration de protéines totales** dans les BAL aux jours 2, 7 et 14 -**Augmentation de quantité de cellules totales** dans les BAL aux jours 2,7, 14 et 28 -**Augmentation du nombre de macrophages** et dans les BAL aux jours 7 et 14 P.I. -**Augmentation du nombre de lymphocytes** dans les BAL aux jours 2, 7 et 14 -**Aucun recrutement d'éosinophiles observé** dans les BAL -**Augmentation de l'expression des gènes TNF-α, IL-6, CXCL-1, MCP-1, IL-10 et IL-13 dans les tissus de poumons dont l'ARN a été isolé**, 2 et/ou 7 jours P.I. Technique : séparation de l'ARN total, suivi d'une synthèse d'ADNc, et ensuite qPCR avec amorces pour les gènes mentionés + GAPDH	(Chang *et al.*, 2013)

Étude *In vitro / In vivo*	**Paramètre utilisé pour évaluer la relation dose/réponse**	**Type de cellule et / ou animal**	**Caractéristiques des nanoparticules**	**Effets sur les neutrophiles**	**Autres effets sur le processus inflammatoire observés**	**Références**
In vivo	-masse par volume	-Souris femelles -Souris males wild type C3H/NeH -Souris males TLR4^{-} C3H/NeH	-Taille: 9nm -Aggrégats: 60-250nm -Potentiel zeta (ζ) :-27 mV Aire de surface : 88 m^2/g	Inhalation pendant 5 heures/jour pendant 1 jour ou 5 jours pour souris balb/c (à 0.21, 0.43 ou 0.86mg/m^3). Mesure des paramètres 24h P.I. : **-Augmentation du nombre de PMN dans les BAL** de façon concentration dépendante après 1 jour (0.43-0.86mg/m^3)	Inhalation pendant 5 heures/jour pendant 1 jour ou 5 jours pour souris balb/c (à 0.21, 0.43 ou 0.86mg/m^3). Mesure des paramètres 24h P.I. : - **Diminution du nombre de macrophages dans les BAL** à dose élevée après 1 jour (0.86mg/m^3) - **Effet cytotoxique : Augmentation de la concentration de protéines totales et de LDH** dans les BAL après un jour (0.21-0.86mg/m^3) -**Augmentation des cytokines pro-inflammatoires MCP-1 et CXCL-1dans les BAL** à dose élevée après 1 jour (0.86mg/m^3) -**Hépato-toxicité : Augmentation des niveaux de Glutamate oxaloacetate transaminase (GOT); glutamate pyruvate transaminase (GPT); créatine phosphokinase (CPK)** à dose élevée après 1 et 5 jours (0.86mg/m^3) Instillation intratrachéale pour souris C3H/NeH wt ou C3H/NeH TLR4 knockout (80ug). Mesure des paramètres 24h P.I. : -**Plus grande réponse inflammatoire chez les souris WT. Implication de TLR4 dans la réponse inflammatoire causée par les NP de ZnO** Observations chez les souris WT : + de neutrophiles, + de macrophages, + de cxcl-1 dans les BAL	(Chen *et al.*, 2014)

Étude ***In vitro / In vivo***	**Paramètre utilisé pour évaluer la relation dose/réponse**	**Type de cellule et / ou animal**	**Caractéristiques des nanoparticules**	**Effets sur les neutrophiles**	**Autres effets sur le processus inflammatoire observés**	**Références**
In vivo	-Masse par volume	-Souris	NP pour exposition de 2 semaines : -Taille : 15nm -Aire de surface : 47 m^2/g NP pour exposition de 13 semaines : -Taille : 26 nm -Aire de surface : 15 m^2/g	Inhalation pendant 2 semaines (aigue) ou 13 semaines (sous-chronique) à 3.5mg/m^3 / jour. Mesure des paramètres (et sacrifice) au t = 0 ou t = 3 semaines P.I. Exposition aigue : -**Augmentation du nombre de PMN** à t = 0 après exposition aigue	Inhalation pendant 2 semaines (aigue) ou 13 semaines (sous-chronique) à 3.5mg/m^3 / jour. Mesure des paramètres (et sacrifice) au t = 0 ou t = 3 semaines P.I. Exposition aigue : -**Augmentation du nombre total de cellules** à t = 0 après T.I. **-cytotoxicité :** **LDH et PT n'augmente pas** à t = 0 après T.I. mais **LDH augmente à t = 3 semaines** P.I. -**Augmentation du nombre de macrophages** à t = 0 après P.I. -**Augmentation d'IL-12 et MIP-1α** à t = 0 après P.I. **(mais pas Il-6, MCP-1, TNF-α**) Exposition sous-chronique : -**Augmentation du nombre de cellules total** à t = 0 et t = 3 semaines P.I. -**Augmentation du nombre de macrophages** à t = 0 et t = 3 semaines P.I. **-cytotoxicité :** **LDH et PT n'augmente pas** à t = 0 et à t = 3 semaines après T.I. **-ROS :** **Pas d'augmentation de MDA**	(Adamcakova-Dodd *et al.*, 2014a)

Tableau 5. Différentes études portant sur les effets des nanoparticules de fullerenol et fullerènes sur les neutrophiles et le processus inflammatoire.

In vitro / In vivo	**Paramètre utilisé pour évaluer la relation dose/réponse**	**Type de cellule et / ou animal (souche)**	**Caractéristiques des nanoparticules**	**Effets sur les neutrophiles**	**Autres effets sur le processus inflammatoire observés**	**Références**
In vitro	-Concentration massique	-Cellules de type endothéliales vasculaires (HUVECs)	-Composition : $C_{60}(OH)_{24}$ -Taille 7.1nm		**-Changements morphologiques et formation de vacuoles** à partir de 10 ug/ml après 24 heures (10 à 100 ug/ml) Technique : Microscopie optique **-Cytotoxicité : Libération de LDH et viabilité cellulaire affectée (essai WST)** après 24 h à 100ug/ml **-N'affecte pas l'apoptose des HUVEC** après 24h à 100 ug/ml Technique : Western Blot (pas de clivage de la caspase -3 et de PARP) **-Ubiquitination des protéines** de façon concentration dépendante (0-100ug/ml) Technique : Western Blot **Augmentation de l'autophagie à concentration élevée** (100ug/ml) Technique : Observation de nombreuses vacuoles et internalisation de fullerenol et Western blot (marqueur d'autophagie LC3-I et LC3-II)	(Yamawaki *et al.*, 2006)

In vitro / In vivo	**Paramètre utilisé pour évaluer la relation dose/réponse**	**Type de cellule et / ou animal (souche)**	**Caractéristiques des nanoparticules**	**Effets sur les neutrophiles**	**Autres effets sur le processus inflammatoire observés**	**Références**
In vitro / In vivo	-Concentration massique (in vivo) et masse par poids corporel (in vivo)	- Cellules de type macrophage murines (lignée RAW – 264.7) Et -Souris males ICR	-Composition : C_{60} -Agrégats : 53.7nm		Cellules RAW264.7 : **-Cytotoxicité :** **Diminution de la viabilité** après 24 heures à 2 ug/ml et **diminution de la viabilité** après 96 heures (0.25 – 2.0 ug/ml) Technique : essai MTT **-Augmentation des ROS : Diminution des niveaux de GSH et augmentation des niveaux de NO** après 24 heures à 2 ug/ml Technique : Dosage en spectrométrie Injection intrapéritonéale de C_{60} – Mesure des paramètres 6, 24, 48, 72 heures P.I. (2mg/kg) : **Augmentation des cytokines pro-inflammatoires IL-1β, IL-6 et TNF-α** 6h P.I.. maintient de la concentration de IL-1 élevée jusqu'à 72h P.I. Maintient de la concentration de IL-6 élevée jusqu'à 24h P.I. Technique : Dosage ELISA	(Park *et al.*, 2010)

In vitro / In vivo	**Paramètre utilisé pour évaluer la relation dose/réponse**	**Type de cellule et / ou animal (souche)**	**Caractéristiques des nanoparticules**	**Effets sur les neutrophiles**	**Autres effets sur le processus inflammatoire observés**	**Références**
In vitro	-Concentration molaire	-Cellules rénales du tubule proximal porcines (LLC-PK1)	Fullerenol : -Taille : 2nm -Agrégats : 20nm -Potentiel zeta (ζ) :-49 mV		**-Cytotoxicité : Diminution de la viabilité de façon concentration dépendante** après 24 et 48 heures ≥ 6 mM (de 6 mM à 100 mM) Techniques : Bleu de trypan et essai sulforhodamine B (SRB) **-Réorganisation du cytosquelette - filaments d'actine** après 24 h (à 0.6 et 3 mM) Technique : Microscopie confocale. **-Augmentation de l'autophagie** après 6, 24 et 48 h de façon concentration dépendante (de 0.01 à 6 mM) Technique : Observation du nombre de vacuoles au TEM, *Lysotracker*, et western blot (marqueur d'autophagie LC3-I et LC3-II) **-Pas d'effet au niveau du stress oxydatif** après 3, 6 et 24h (à 3mM) Technique : Pas d'augmentation de la peroxydation des lipides et diminution minime de la concentration de GSH **-Perte du bon fonctionnement de la mitochondrie :** **Diminution des niveaux d'ATP** de façon concentration dépendante (0.2 à 63 mM) après 24 et 48h. **Altération du potentiel membranaire de la mitochondrie** (0.01-6mM) après 6, 24 et 48 heures Techniques : ATP luminescent assay et Mitotracker red dye assay	(Johnson-Lyles *et al.*, 2010)

In vitro / In vivo	**Paramètre utilisé pour évaluer la relation dose/réponse**	**Type de cellule et / ou animal (souche)**	**Caractéristiques des nanoparticules**	**Effets sur les neutrophiles**	**Autres effets sur le processus inflammatoire observés**	**Références**
In vitro	-Concentration massique	-Cellules de type kératinocytes humaines (HEK)	-$C_{60}(OH)_{20}$ -Taille : 37nm -Agrégats : 165nm à 23,354nm (en fonction du temps et de la concentration) -$C_{60}(OH)_{24}$ -Taille : 97nm -Agrégats : 127nm à 2354 nm (en fonction du temps et de la concentration) -$C_{60}(OH)_{32}$ -Taille : 274.5nm -Agrégats : 147nm à 3645nm (en fonction du temps et de la concentration)		**Effet Cytotoxique :** **-Viabilité non affectée par l'ensemble des NP** après 24 heures (0.0027 à 42.5 ug/ml) **sauf pour $C_{60}(OH)_{32}$ à la concentration la plus élevée** (42.5ug/ml) Technique : Essai Alamar Blue **-Diminution de la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire IL-8** après 24 et 48 heures pour $C_{60}(OH)_{24}$ et $C_{60}(OH)_{32}$ (à 42.5ug/ml) Technique : ELISA	(Saathoff *et al.*, 2011)
In vitro	-Particules par million	-Cellules de type fibroblaste humaines (HDF)	Fullerenol : -Taille : 15nm -Agrégats: 100-240nm -Potentiel zeta (ζ) :-14 mV (eau) et -50mV dans tampon physiologique		**-Cytotoxicité : Diminution de la viabilité cellulaire** après 24 et 48 heures à partir de 10ug/ml (10ppm à 200ppm) **-Viabilité cellulaire moins affectée chez les cellules NF-κB knockdown.** Technique : Bleu de trypan ROS : pas de conversion du GSH (ou de son oxydation) induite par le fullerenol.	(Romoser *et al.*, 2012)

In vitro / In vivo	**Paramètre utilisé pour évaluer la relation dose/réponse**	**Type de cellule et / ou animal (souche)**	**Caractéristiques des nanoparticules**	**Effets sur les neutrophiles**	**Autres effets sur le processus inflammatoire observés**	**Références**
In vivo	-Masse	-Souris femelles balb/c	Fullerenol : -Composition : $C_{60}(OH)_{20\pm2}$	Instillation intratrachéale – mesures 24h P.I. (0.02, 0.2, 2, 2 et 200 ug par souris) **-Augmentation du nombre de neutrophiles à dose élevée** dans les BAL (200ug) Prétraitement des souris par instillation intratrachéale avec diverses doses de fullerenol (0.2, 2.0, 20 ug) suivi de l'instillation de 50 ug de quartz. Mesure des paramètres 24h P.I. **-Diminution de l'infiltration neutrophilique** dans les BAL des souris préalablement exposées au fullerenol (à 0.2, 2 et 20 ug)	Instillation intratrachéale – mesures 24h P.I. (0.02, 0.2, 2, 2 et 200 ug par souris) **-Augmentation de la concentration de MIP2 à dose élevée** dans les BAL (200ug) Prétraitement des souris par instillation intratrachéale avec diverses doses de fullerenol (0.2, 2.0, 20 ug) suivi de l'instillation de 50 ug de quartz. Mesure des paramètres 24h P.I. **-Diminution de la concentration de MIP2** dans les BAL des souris préalablement exposées au fullerenol (à 2ug)	(Roursgaard *et al.*, 2008)
In vivo	-Masse	Rats males Sprague-Dawley	Fullerenol -Taille : 20nm	Instillation intratrachéale – mesures des paramètres 3 jours P.I. (1, 5 ou 10 mg par rat) **-Augmentation du nombre de neutrophiles dans les BAL et dans le sang** à dose élevée (5-10mg)	Instillation intratrachéale – mesures des paramètres 3 jours P.I. (1, 5 ou 10 mg par rat) **-Diminution du nombre de macrophages dans les BAL** à dose élevée (5-10mg) **- Cytotoxicité : Augmentation de la concentration de LDH, de protéines totales, d'albumine** et **de phosphatase alcaline (AKP) dans les BAL** à dose élevée (5-10mg) **-Augmentation du stress oxydatif** : **Augmentation de la quantité de malonaldehyde (MDA), augmentation de l'activité de l'oxyde nitrique synthase (NOS), diminution des concentrations de GSH et de super oxyde dismutase (SOD) à dose élevée (5 et 10 mg)**	(Xu *et al.*, 2009)

In vitro / In vivo	**Paramètre utilisé pour évaluer la relation dose/réponse**	**Type de cellule et / ou animal (souche)**	**Caractéristiques des nanoparticules**	**Effets sur les neutrophiles**	**Autres effets sur le processus inflammatoire observés**	**Références**
In vivo	-Concentration molaire	-Souris	Un dérivé de fullerène		Injection sous cutanée et induction d'un œdème de l'oreille par le PMA et corrélation du poids d'un morceau de 3mm de l'oreille avec l'intensité de la réponse inflammatoire **-Les NP dérivés de fullerènes ont atténué l'œdème** de façon significative après 5 heures à 667uM.	(Dellinger *et al.*, 2009)

CHAPITRE 3 : L'INFLAMMATION

3.1 Définition

L'inflammation peut se définir comme une réponse physiologique normale du corps d'un individu ou organisme à une « blessure, traumatisme » (Denis Girard, 2007). Elle est caractérisée par des symptômes tels que la chaleur et la rougeur. Cela est causé parce qu'il y a une augmentation de la circulation sanguine au niveau du site inflammatoire et également parce qu'il y a vasodilatation des vaisseaux sanguins afin de diminuer la concentration des agents toxiques potentiels. Il y a également une augmentation de la perméabilité capillaire afin de faciliter le passage de molécules et médiateurs d'inflammation à travers l'endothélium. Éventuellement, on observe une migration des leucocytes (des PMN au début) vers le site inflammatoire afin d'éliminer les pathogènes et les débris. Parmi les autres symptômes observés lors d'une inflammation, il y a la douleur. Celle-ci est causée par l'œdème et la libération d'agents algogéniques (qui provoquent la douleur) et finalement perte de fonction causée par l'enflure et la douleur (Chovatiya *et al.*, 2014; Denis Girard, 2007).

3.2 Inflammation aiguë

En général, une inflammation aiguë a un début rapide et s'étend sur une courte période. Elle comprend trois phases distinctes résumées sommairement ici : 1) l'initiation : un agent (biologique, physique, ou chimique) initie la réponse inflammatoire, 2) l'amplification : il y a recrutement de cellules (neutrophiles, macrophages, éosinophiles, basophiles) et produits pro-inflammatoires (cytokines, chimiokines), 3) la résolution : il y a résolution lorsque les cellules meurent par apoptose et les débris sont éliminés par d'autres phagocytes tels que les macrophages et cellules dendritiques. L'œdème diminue et l'homéostasie cellulaire est rétablie également. C'est ainsi qu'une inflammation aiguë typique se déroule. C'est la première réponse déclenchée dans le but d'éliminer ou de contenir le corps étranger (Kuby J, 2000; Serhan, 2010).

3.3 Inflammation chronique

Dans le cas d'une inflammation chronique, la persistance de l'antigène ou de l'agent perturbateur mène à une prolongation dans le temps de la réponse inflammatoire qui vise à rétablir l'état d'homéostasie. L'inflammation chronique se définit aussi par les types cellulaires présents dans les tissus affectés, tels que les lymphocytes, les macrophages et les cellules plasmatiques (Kuby J, 2000; Serhan, 2010). La persistance de la réponse inflammatoire peut mener à des conséquences pathologiques telles que des lésions tissulaires importantes voir même la destruction du tissu (fibrose) (Chovatiya *et al.*, 2014; Serhan, 2010). L'inflammation chronique est un phénomène associé au développement de maladies telles que les maladies cardiovasculaires, le cancer ou encore des maladies auto-immunes comme la sclérose en plaques, l'arthrite rhumatoïde, l'asthme, le lupus ou encore la maladie de Crohn (Kuby J, 2000; Lowe *et al.*, 2011; Mehta *et al.*, 2013; Serhan, 2010; Sorrentino, 2014)

3.4 Rôle du neutrophile

Le premier événement à survenir lors d'un début de réaction inflammatoire, c'est l'activation des cellules endothéliales. À ce moment, des molécules d'adhésion propres aux leucocytes s'expriment à leur surface. Les cellules endothéliales produisent également des cytokines et chimiokines qui attirent alors les PMN. À l'aide de molécules d'adhésion, les sélectines, les neutrophiles se lient alors aux cellules endothéliales, ce qui leur permet ensuite de procéder à la transmigration vers le compartiment extravasculaire. C'est ce qu'on appelle la diapédèse ou extravasation (Serhan, 2010). Un deuxième événement survient également à cette étape, soit l'ouverture des jonctions serrées, ce qui permet alors le passage de fluide et des protéines du compartiment vascularisé au site inflammatoire provoquant de l'œdème (Serhan, 2010). Arrivés au site inflammatoire, les neutrophiles phagocytent les agents exogènes ou endogènes envahisseurs et sécrètent à leur tour des médiateurs qui contribuent à attirer les monocytes de la circulation et les macrophages résidents des tissus environnants. Les PMN meurent ensuite par apoptose et sont phagocytés à leur tour par les phagocytes professionnels (Henson, 2005). Ce retour à l'homéostasie cellulaire est accompagné d'une libération de médiateurs anti-inflammatoires par les macrophages tels que FasL (Fas ligand)

ou TGF-β (Henson, 2005; Maskrey *et al.*, 2011; Serhan, 2010). Toutefois, pour plusieurs raisons, telle qu'une efferocytose (l'élimination des cellules apoptotiques par des cellules phagocytaires) déficiente par exemple, l'inflammation ne se résolut pas toujours et une persistance ou même une augmentation de l'intensité de la réponse inflammatoire survient. Les neutrophiles se dirigent parfois dans état de nécrose secondaire, ce qui peut être nuisible pour le tissu environnant étant donné l'important arsenal de molécules protéolytiques et antimicrobiennes qu'ils contiennent dans leur cytoplasme(Z. Zhang *et al.*, 2008). C'est lors d'un tel dérèglement de la réponse inflammatoire que des maladies peuvent se développer et même durer plusieurs années (Coussens *et al.*, 2002; Henson, 2005; Kuby J, 2000; Li *et al.*, 2009; Rydell-Tormanen *et al.*, 2006; Serhan, 2010; H. Zhang *et al.*, 2012) . L'ensemble des fonctions du neutrophile lui permetant d'accomplir les rôles mentionnés sera décrit en détails dans la section 4.2 dans un ordre logique en lien avec la réponse inflammatoire

CHAPITRE 4 : LES NEUTROPHILES

Les neutrophiles représentent 50 à 70% de tous les leucocytes présents dans le sang périphérique chez l'humain. Ils sont les acteurs principaux de la première ligne de défense immunitaire. Le développement de cette cellule est un processus qui prend environ 14 jours (da Rosa, 2013; Serhan, 2010). Une fois formés, les neutrophiles sont libérés par la moelle osseuse dont la tâche principale est la production des neutrophiles. Près de 10^{11} de PMN sont produits quotidiennement. Toutefois, leur demi-vie très courte de 6 à 12 heures (da Rosa, 2013; Serhan, 2010).

4.1 Différenciation

Durant les trois premiers stades de différenciation des neutrophiles, les cellules sont capables de se diviser et proliférer, alors que lors des trois derniers stades ils ne peuvent que se différencier. Parmi les facteurs qui induisent les cellules souches pluripotentes à se différencier en neutrophiles, il y a le *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF). Il provoque la différenciation des cellules de la lignée myéloïde, stimule la prolifération des cellules précurseur des granulocytes et provoque la libération des PMN de la moelle osseuse (Richards *et al.*, 2003; Serhan, 2010). Parmi les autres facteurs hématopoïétiques contribuant au développement du neutrophile il y a le GM-CSF, l'IL-6 et l'IL-3 (Metcalf *et al.*, 1987; Pojda *et al.*, 1990; Serhan, 2010). Les trois premiers stades précurseurs du neutrophile sont (en ordre) les myéloblastes, les promyélocytes et les myélocytes. Parmi les changements qu'on observe au fur et à mesure de la progression de ces 3 stades de développement, il y a l'augmentation de la taille cellulaire et l'apparition de granules primaires ou azurophiliques (ont une affinité envers le colorant bleu azur) (Borregaard *et al.*, 1993; Serhan, 2010). La maturation des granules primaires est complète au stade myélocyte. Également au stade myélocyte, les granules secondaires (ou spécifiques) font leur apparition. Ils sont plus petits que les granules primaires et seront, à terme, deux à trois fois plus nombreux que les granules primaires. Au quatrième stade, le stade métamyélocyte, des granules primaires, secondaires et tertiaires sont abondamment présents dans le cytoplasme. De plus, le noyau adopte une forme de fer à cheval ou en forme de saucisson et il n'y a pas de constriction (Nader D, 2013). À l'avant dernier stade de développement (*neutrophil band*) il y a poursuite de la condensation de la chromatine. Enfin, au dernier stade de développement la configuration polylobée du noyau caractéristique du neutrophile prend forme avec au moins une constriction et au moins deux lobes (Nader D, 2013; Serhan, 2010).

4.2 Principales fonctions et rôles chez l'humain

4.2.1 Chimiotaxie, adhésion et diapédèse

Les neutrophiles expriment à leur surface une large gamme de molécules d'adhésion et de récepteurs chimiotactiques. Ils ont la capacité de se lier rapidement aux récepteurs de surface activés des cellules endothéliales en réponse à des signaux pro-inflammatoires. Les événements qui surviennent lors de l'adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales sont 1) le roulement, 2) l'activation cellulaire et finalement 3) l'adhésion ferme (Ley, 2002; Luster *et al.*, 2005).

Parmi les cytokines qui attirent le neutrophile par chimiotaxie vers le site inflammatoire, il y a l'IL-8. Le roulement des neutrophiles est dépendant des sélectines, soit les L-sélectines sur les neutrophiles et les E- et P-sélectines exprimées sur les cellules endothéliales activées(Serhan, 2010). Des ligands des sélectines comme la P-sélectine glycoprotéine ligand-1 (PSGL-1) présente sur les neutrophiles se lient et permettent ainsi le roulement (Ley, 2002). Cette liaison n'est que temporaire à cause de la force tangentielle du sang qui circule. Les cytokines chimio-attractantes IL-8 et la protéine inflammatoire des macrophages (MIP-1β) sont toutes deux impliquées dans l'activation des neutrophiles. Parmi d'autres facteurs qui activent les neutrophiles, il y a le facteur d'activation des plaquettes (PAF), les produits du complément C5a, C3a et C5b67, le TNF-α ou encore des produits de dégradation bactérienne comme le LPS (Ley, 2002; Ley *et al.*, 2007). L'activation des neutrophiles, induit un changement conformationnel des intégrines présentes à leur surface, qui les rend plus adhérentes envers leurs récepteurs d'adhésion cellulaire de la super famille des immunoglobulines comme la molécule d'adhésion intracellulaire-1 (ICAM-1) et la molécule d'adhésion vasculaire-1 (VCAM-1), tous deux présents sur les cellules endothéliales activées (Luster *et al.*, 2005; Serhan, 2010). Cela permet alors aux neutrophiles d'adhérer fermement aux cellules endothéliales. Les PMN pourront ensuite procéder à la diapédèse, c'est-à-dire le passage de la circulation sanguine au site inflammatoire dans les tissus. (Denis Girard, 2007; Kuby J, 2000; Ley, 2002; Luster *et al.*, 2005; Serhan, 2010).

Les étapes de la migration trans-endothéliale et les mécanismes y étant associés sont complexes. Les neutrophiles peuvent emprunter deux voies distinctes afin d'effectuer une migration transendothéliale, soit la voie paracellulaire (le PMN traverse entre les cellules endothéliales) et la voie transcellulaire (le PMN passe à travers la cellule endothéliale)(Ley *et al.*, 2007). Dans les deux cas, les récepteurs d'adhésion cellulaire ICAM-1 et VCAM-1 sont impliqués. Dans le cas du passage paracellulaire, il y a d'abord une perte temporaire des jonctions adhérentes stabilisées au départ par les protéines homophiliques (mêmes molécules se liant ensemble et qui sont présentes sur les cellules endothéliale adjacentes) telles que les VE-cadhérines (Kuby J, 2000; Ley *et al.*, 2007). Par la suite, d'autres molécules hémophiliques telles que la molécule d'adhésion cellulaire des plaquettes / cellules endothéliales (PECAM-1) et la molécule d'adhésion de la jonction (JAM) sont mobilisées au niveau des jonctions cellulaires créant ainsi un gradient haptotactique qui amène les leucocytes présents sur la surface luminale vers les jonctions endothéliales (Ley *et al.*, 2007). Il n'y a pas si longtemps, la communauté scientifique pensait que la migration cellulaire transendothéliale n'avait lieu que par la voie paracellulaire. Ce n'est que vers les années 60, avec l'aide des MET, que les microscopistes ont découvert la capacité des monocytes mais surtout des neutrophiles de générer des pseudopodes qui pénètrent à l'intérieur des cellules endothéliales (Feng *et al.*, 1998) Les PMN qui réalisent la diapédèse transcellulaire, le font à des endroits où l'endothélium est plus mince et où la distance à traverser est moins grande. Après l'adhésion des PMN avec ICAM-1, il y a alors translocation de ICAM-1 vers des régions riches en actine et cavéoline (Ley *et al.*, 2007). Un réarrangement du cytosquelette permet alors la création d'un canal intracellulaire riche en protéines ICAM-1, à travers lequel les PMN peuvent passer. C'est ce qu'on appelle les organelles vésiculo-vacuollaires (VVO). Le mouvement de ICAM-1 le long du canal permet le mouvement de la cellule à travers ce canal vers la membrane plasmique endothéliale basale. L'ezrine, la radixine et la moésine permettent de faire le lien entre ICAM-1 et les protéines du cytosquelette (actine, vimentine), permettant ainsi le mouvement de ICAM-1 et par le fait même, le mouvement du neutrophile et sa transmigration transcellulaire. En finale, les molécules qui participent à la migration paracellulaire sont les mêmes que celles qui participent également à la migration transcellulaire. Toutefois, des différences cellule-spécifique résident en ce qui concerne le phénomène de la transmigration cellulaire (Ley *et al.*, 2007; Luster *et al.*, 2005; W. A. Muller, 2003; W. A. Muller *et al.*, 1993; Serhan, 2010)

4.2.2 La phagocytose

Les neutrophiles sont des cellules phagocytaires actives. Une fois recrutées dans le site inflammatoire, ces cellules reconnaissent, phagocytent et détruisent les pathogènes et agents causals de l'inflammation. La phagocytose est le processus par lequel les PMN étirent leurs pseudopodes et ingèrent une particule (≥0.5μm) avec leur membrane formant ainsi un phagosome. Les neutrophiles ont à leur surface plusieurs récepteurs PRR (*pattern recognition receptors*), dont la classe des TLR (*toll-like receptors*) est la plus connue. Les PRR reconnaissent les molécules virales et bactériennes, c'est-à-dire les PAMPs (*Pathogen-associated molecular patterns*). Il a été démontré que lorsque les TLR reconnaissent des PAMPs, comme le LPS, la flagéline ou encore le zymosan, ces derniers peuvent déclencher une diversité de réponses dont une augmentation du taux de phagocytose (Hayashi *et al.*, 2003; Serhan, 2010).

Les opsonines sont des molécules qui se fixent à la fois sur l'antigène et le neutrophile favorisant ainsi la phagocytose. Les opsonines incluent principalement les fragments du complément et les anticorps. Les anticorps IgG qui composent 85 % des immunoglobulines chez l'humain vont se lier aux récepteurs des IgG sur le neutrophile, les récepteurs FCγ. Les PMN en expriment deux types de façon constitutive soit les FcγRIIa (CD32) et FcγRIIIb (CD16) (Seely *et al.*, 2003). Lorsque ces derniers se lient aux cibles opsonisées par des IgG, ils ont une influence importante sur les fonctions cellulaires des PMN et ce, de façon tyrosine kinase dépendante. Le FcγRI (CD64) quand à lui est un récepteur de haute affinité qui est exprimé en présence de cytokines inflammatoires, mais n'est pas exprimé de façon constitutive (Seely *et al.*, 2003) Quant aux récepteurs du complément (C3a, C5a, C5b67, etc.), le neutrophile est doté du CR1(*type-1 complement receptor*) et le CR3. Ces derniers reconnaissent les cibles opsonisées par les facteurs du complément (Berger *et al.*, 1989). La phagocytose est suivie par la libération des granules des neutrophiles dans les phagosomes qui deviennent alors des phagolysosomes. Un mélange d'espèces réactives oxygénées, d'enzymes protéolytiques et de substances antimicrobiennes détruit l'agent envahissant dans le phagolysosome. Les mécanismes sont dépendants ou indépendants de l'oxygène et feront l'objet de discussion dans les chapitres 4.2.3 et 4.2.4 (Berger *et al.*, 1989; Indik *et al.*, 1995; Kuby J, 2000; Seely *et al.*, 2003; Serhan, 2010).

4.2.3 La destruction des corps étrangers – élimination dépendante de l'oxygène

La dégradation dépendante de l'oxygène se définit comme l'augmentation du métabolisme oxydatif des neutrophiles suivant l'ingestion d'un corps étranger, qui mène à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). La production des ROS par les neutrophiles résulte de l'activation d'un complexe protéique enzymatique nommé nicotinamide adénine dinucléotide phosphatase ou simplement la NADPH oxydase. L'importance de la NADPH oxydase dans la réponse immunitaire est mise en évidence chez les patients atteints de la granulomatose chronique (CGD) qui sont déficitaires pour cet enzyme. Les personnes atteintes développent des granulomes formés par la fusion de cellules inflammatoires n'ayant pas réussi à détruire l'agent causal de l'inflammation présent dans les phagolysosomes. La NADPH oxydase, lorsqu'elle est activée, est composée de quatre protéines cytosoliques soit p47phox, p67phox, p40phox et la GTPase Rac ½, en plus d'être composée de l'hétérodymère flavocytochrome b_{558} (cyt558) associé à la membrane. Le cyt558 est un hétérodimère membranaire formé de gp91phox et de p22phox. Il suffit qu'une des sous-unités de la NADPH soit affectée par une mutation pour qu'une personne soit atteinte de CGD (Denis Girard, 2007; Nauseef, 2007; Quinn *et al.*, 2004). Suite à la stimulation du neutrophile, par un agent comme le fMLP par exemple, la protéine p47phox subit de nombreuses phosphorylations sur ses résidus sérine et se déplace alors vers la membrane du phagosome conjointement avec p67phox et p40phox pour se lier au cyt b588. En même temps, la GTPase Rac ½ subit un échange d'ion phosphore et migre aussi vers la membrane de façon indépendante au complexe de protéines phox La NADPH est alors dans un état activé. Elle peut ensuite déplacer des électrons du NADPH présents du coté cytosolique à travers le groupe hème de gp91phox pour le transférer aux molécules d'oxygène (O_2), générant ainsi un anion superoxide (O_2^-) (Denis Girard, 2007; Nauseef, 2007). Une fois dans le phagosome, l'anion superoxyde peut interagir avec l'hydrogène, et, à l'aide de la superoxyde dismutase (SOD), se transformer en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Le H_2O_2 peut également être converti à son tour à l'aide de la myéloperoxydase (MPO) en acide hypochlorique (HOCL), qui lui aussi a une activité antimicrobienne importante. De plus, l'anion superoxyde et le H_2O_2 peuvent spontanément réagir (c'est la réaction de Fenton) ensemble générant à leur tour un radical hydroxyle OH qui lui aussi est hautement réactif (Denis Girard, 2007; Nauseef, 2007; Quinn *et al.*, 2004; Segal, 2005).

4.2.4 La destruction des corps étrangers – élimination indépendante de l'oxygène

Le nom de la cellule neutrophile est directement lié à ses granules qui peuvent être marqués avec des solutions au pH neutre tel que l'a démontré Paul Ehrlich (Borregaard *et al.*, 1997). Les granules sont concentrés à l'intérieur de réservoirs ou organelles qu'on appelle tout simplement granules ou vésicules sécrétoires. Ils ont pour fonction de conserver les protéines protéolytiques et antibactériennes pour éventuellement les libérer à l'extérieur de la cellule ou dans le phagolysosome après fusion avec la membrane plasmique. Il y a différents types de granules classés en fonction de leur contenu, mais également en fonction de leur ordre d'apparition lors de la maturation du neutrophile. Les premiers, les granules azurophiliques (ou primaires), peuvent être identifiés à l'aide du marqueur azur A. Ils sont peroxydase-positifs et contiennent la MPO ainsi que diverses protéinases (cathepsin G, élastase et protéinase 3). Ils comportent également les défensines, des peptides aux propriétés antibactériennes ainsi qu'un tiers de l'ensemble des lysozymes retrouvés dans les granules.(Faurschou *et al.*, 2003) Les deuxièmes, soit les granules spécifiques (ou secondaires), n'ont pas d'affinité envers le marqueur azure A et sont peroxydase négatives. Parmi les protéines importantes qui s'y retrouvent, il y a la famille des métalloprotéinases (MMP) qui incluent par exemple la collagénase-2 (MMP-8) et la gélatinase-B (MMP-9). Une fois activées, les MMP peuvent interagir et cliver de nombreuses protéines bactériennes ou encore de la membrane cellulaire. Enfin, les nombreuses substances antimicrobiennes des granules spécifiques sont diffusées autant dans le phagosome qu'à l'extérieur de la cellule. Pour ces deux raisons, les MMP sont importantes à la fois pour leur capacité à détruire des pathogènes, mais également pour le rôle qu'elles peuvent jouer dans le processus de l'extravasation et de la migration (Borregaard *et al.*, 1997; Faurschou *et al.*, 2003).

Contrairement aux granules spécifiques qui sont riches en substances antimicrobiennes, les granules gélatinase (ou tertiaires) ne le sont pas. Ces granules contiennent évidemment de grandes concentrations de gélatinase. C'est une enzyme capable de dégrader les tissus. Les granules tertiaires sont encore plus facilement capables d'exocytose que les granules spécifiques et ils jouent aussi un rôle très important dans la dégradation des enzymes de la matrice extracellulaire durant la

diapédèse. Quant aux vésicules sécrétoires, elles sont plus petites, contiennent beaucoup moins d'enzymes protéolytiques, mais ont beaucoup de récepteurs pouvant être exprimés à la surface cellulaire. Ce sont de véritables réservoirs de protéines membranaires. Les vésicules sécrétoires peuvent être mobilisées suite à divers stimulus. Leurs membranes contiennent entre autres, le récepteur du complément (CR1), le récepteur du fMLP, le corécepteur du TLR4 (CD14) et le récepteur FcγIII (ou CD16). Enfin, l'ensemble des différents types de granules contient des récepteurs d'adhésion aux cellules endothéliales et des protéines de la matrice extracellulaire. Par l'ensemble de ces rôles, la fonction de dégranulation du neutrophile permet au neutrophile d'être une cellule effectrice très efficace et un acteur très important de la réponse immunitaire innée (Borregaard *et al.*, 1997; Faurschou *et al.*, 2003; Segal, 2005; Serhan, 2010).

4.2.5 L'apoptose

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée est un processus physiologique rigoureusement bien contrôlé et permet la régulation homéostatique des neutrophiles (ainsi que d'autres types cellulaires). Puisqu'en moyenne, il y a 10^{11} neutrophiles qui sont produits quotidiennement chez l'humain, une baisse du taux d'apoptose perturberait rapidement l'homéostasie cellulaire et tissulaire. Une perturbation à la hausse (donc plus de mort cellulaire que la normale) mène à une immunosuppression, car les comptes de PMN diminuent alors (neutropénie) et cela rend l'individu plus susceptible aux infections bactériennes et fongiques (Denis Girard, 2007). À l'inverse, une perturbation à la baisse du taux d'apoptose mène à une accumulation de neutrophiles (neutrophilie) et à un maintien de l'état activé du PMN, ce qui pourrait causer des dommages tissulaires importants étant donné les nombreuses enzymes protéolytiques et des espèces oxydées qu'il renferme (Akgul *et al.*, 2001; Arruda *et al.*, 2004). L'apoptose n'exacerbe donc pas la réponse inflammatoire locale contrairement à la nécrose, où la cellule éclate et libère tout son contenu dans le milieu. L'apoptose est fortement liée au processus de résolution de l'inflammation, où une fois mortes par le mécanisme apoptotique, les cellules PMN (mais aussi les éosinophiles ou autres cellules) sont phagocytées et emportées du site inflammatoire par les macrophages, prévenant ainsi le dommage tissulaire et l'inflammation chronique. Pour cette raison, il s'agit d'un processus dont la mécanistique est fortement régulée. Les modifications que subissent les neutrophiles sont

nombreuses lors de l'apoptose. Tout d'abord, on observe une réduction de la taille cellulaire, un réarrangement important du cytosquelette, une augmentation du nombre de vacuoles dans le cytoplasme et le noyau devient pycnotique (réduction de la taille du noyau et la chromatine se compacte) (Haslett, 1997). De plus, malgré le fait que l'intégrité de la membrane est maintenue, il y a perte de certains récepteurs, dont le récepteur aux IgG, spécifiquement le FcγRIII (ou CD16), et une surexpression des phosphatidylsérines (PS) sur la surface externe de la membrane (Haslett, 1997). Les PS permettent la reconnaissance des PMN apoptotiques par les cellules phagocytaires. À terme, ces modifications entraînent une perte des fonctions du neutrophile durant l'apoptose (Akgul *et al.*, 2001; Arruda *et al.*, 2004; Haslett, 1997; Serhan, 2010).

L'apoptose du neutrophile est un processus hautement régulé qui requiert la participation de nombreuses molécules et cascades protéolytiques. Plusieurs molécules ont la capacité de moduler cette fonction du neutrophile. Tout d'abord, chez le neutrophile il y a trois mécanismes qui contrôlent l'apoptose soit la voie intrinsèque (voie mitochondriale), la voie extrinsèque (voie des récepteurs de mort cellulaire) et finalement la voie induite en réponse au stress du réticulum endoplasmique. En ce qui concerne les deux premières voies, elles sont activées par des facteurs internes et externes aux PMN, respectivement. Ces deux voies diffèrent au niveau des événements qui déclenchent l'apoptose. Les deux voies finissent toutefois par activer une même famille d'enzymes protéolytiques appelées caspases qui sont capables de s'autocliver et former des dimères. (Santos-Beneit *et al.*, 2000)

La voie extrinsèque est dépendante des récepteurs transmembranaires appelés récepteurs de mort ou *death receptors* (DR) qui font partie de la famille des TNFR (*tumor necrosis factor receptors*), comme Fas et TNFR1. Parmi les DR les plus connus et prédominants, il y a le CD95 (Fas) qui se lie à son ligand, le CD95L ou FasL. Les DR, en se liant à des protéines adaptatrices cytoplasmiques, forment alors le *death inducing signalling complex* (DISC). La formation de c complexe permet alors l'activation de la caspase 8, une caspase initiatrice (Luo *et al.*, 2008). Par la suite il y aura activation des caspases effectrices, telle que la caspase 3, qui elle, active à son tour un grand nombre de protéases et d'autres substrats impliqués dans l'apoptose (Rossi *et al.*, 2013). De plus, une augmentation de la perméabilité mitochondriale est associée à cette voie. En effet, en plus de l'activation de la caspase 8, le facteur pro-apoptotique Bid est activé par cette voie. Il migre alors vers la mitochondrie, provoque une augmentation de la perméabilité membranaire mitochondriale

ce qui mène à la production de cytochrome c et fini par provoquer l'apoptose après l'activation de caspases exécutrices en aval (Luo *et al.*, 2008). Cette voie est un mécanisme clé permettant de contrôler l'apoptose spontanée du neutrophile après avoir été relâchés par la moelle épinière (Santos-Beneit *et al.*, 2000).

La voie intrinsèque quant à elle, est intimement liée à la perte du potentiel membranaire de la mitochondrie suite à des stimuli tels que des infections virales, des radicaux libres ou radiations par exemple. Ce potentiel membranaire peut être également affecté par des dommages à l'ADN, la perte de protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, ou encore par le stress du réticulum endoplasmique (voir plus loin) (Kroemer *et al.*, 2007; Luo *et al.*, 2008).. Il y a alors libération du cytochrome c, un facteur pro-apoptotique, dans le cytoplasme. La présence de cyt c dans le cytoplasme permet la formation d'un complexe protéique nommé apoptosome qui est formé de cyt c mais comprend aussi la molécule *Apoptotic protease activating factor 1* (Apaf1), de désoxyadénosine triphosphate (dATP) et la pro-caspase 9, la caspase initiatrice (Kroemer *et al.*, 2007). C'est la caspase initiatrice classiquement activée dans cette voie (Simon, 2003). Après que le processus d'apoptose ait été déclenché, deux types de protéines contrôlent ensuite ce processus, soit les caspases ainsi que les protéines de la famille de type Bcl-2, qui incluent à la fois des protéines pro (Bax, Bid, Bak, Bad) et anti-apoptotiques (Mcl-1, Bcl-X_l) (Akgul *et al.*, 2001; Santos-Beneit *et al.*, 2000).

Le réticulum endoplasmique (RE) a pour fonction principale de permettre le bon repliement des protéines (Kuby J, 2000). Lorsqu'il y a un surplus de protéines non-repliés (qui attendent la maturation) qui sont présentes à l'intérieur du RE et que leur nombre est tel que la machinerie nécessaire au bon repliement des protéines du RE a de la difficulté à s'ajuster (soit en diminuant la quantité de protéines à l'intérieur du RE, soit en augmentant la quantité de protéines chaperonnes à l'intérieur du RE), c'est ce qu'on appelle le stress du réticulum endoplasmique (ER stress) (Ron *et al.*, 2007). L'existence de ce phénomène chez le neutrophile a été confirmée pour la toute première fois par l'équipe de Dr. Denis Girard en 2009 (Binet *et al.*, 2010) Si l'ajustement face à ce nombre accrue de protéine non-repliés est impossible, alors un mécanisme de mort cellulaire est enclenché suite à ce stress. Le déclanchement de diverses voies de signalisation suite à ce stress est appelé *unfolded protein response* (UPR) (Ron *et al.*, 2007). Le ER stress est un marqueur de

cytotoxicité important. Une réponse UPR prolongée peut induire l'apoptose. La cellule adopte cette stratégie pour protéger l'organisme de cellules ayant synthétisé trop de protéines mal conformées (Binet *et al.*, 2010; Ron *et al.*, 2007). Le mode d'action de l'apoptose provoquée par le ER stress est peu connu. Toutefois, une libération de calcium par le RE pourrait être impliquée, ce qui déclencherait la voie intrinsèque (Deniaud *et al.*, 2008). De plus, des protéines de la famille Bcl-2, présentes également dans le RE, contrôleraient cette relâche de calcium présent à l'intérieur du RE (Nutt *et al.*, 2002).

Les stimuli anti-apoptotiques activent des voies de survie cellulaire importantes telles que les MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*) et la voie PI3K/AKT. En général, les MAPK p38 et ERK½ jouent toutes deux un rôle sur l'apoptose du neutrophile (p38 régule à la hausse ou à la baisse alors que ERK inhibe l'apoptose), tandis que la MAPK JNK (c-jun N-terminal kinase) ne semble jouer aucun rôle sur ce processus. Également, une augmentation de l'activité de la PI3K/Akt, mène à une phosphorylation de Bad (une protéine de la famille Bcl-2) qui, lorsque phosphorylée, joue un rôle anti-apoptotique (Arruda *et al.*, 2004; Klein *et al.*, 2000; Simon-Vazquez *et al.*, 2014). Aussi, le facteur de transcription NF-κB est un joueur clé dans le neutrophile car il régule l'expression de gènes pro-inflammatoires et anti-apoptotiques. Des études ont démontré l'implication des MAPK p38 et ERK½ dans l'activation de ce facteur de transcription important (Castro-Alcaraz *et al.*, 2002; Luo *et al.*, 2008; Rossi *et al.*, 2013).

Enfin, plusieurs molécules peuvent stimuler ou inhiber la fonction d'apoptose du neutrophile. Parmi les protéines qui retardent l'apoptose il y a les cytokines IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-15, TNF-α, INF-γ, G-CSF, GM-CSF mais aussi le LPS, fMLP, l'ATP, le PMA et les C5a (Akgul *et al.*, 2001; Luo *et al.*, 2008). Les stimuli extracellulaires étant capables d'accélérer l'apoptose du neutrophile sont, par exemple, FasL, TNF-α (à dose élevée) et TRAIL qui accomplissent leur effet par l'intermédiaire des DR. Lorsque présentes en trop grande concentration, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) peuvent déclencher à elles seules les récepteurs de mort cellulaire (par la génération de céramides), provoquant ainsi la mort cellulaire prématurée des neutrophiles (Luo *et al.*, 2008; Scheel-Toellner *et al.*, 2004). Quant aux substances connues pour leur capacité à provoquer l'apoptose du neutrophile, il y a entre autres: la lectine de plante *Viscum album*

agglutinin (VAA), le trioxyde d'arsenic, les nanoparticules d'argent, le cycloheximide, l'actinomycine D et l'oxyde nitrique (Akgul *et al.*, 2001; Denis Girard, 2007; Haslett, 1997).

CHAPITRE 5 : LES DIVERS MODÈLES D'INFLAMMATION *IN VIVO*

Différents modèles animaux sont utilisés pour étudier les effets toxiques et inflammatoires des nanoparticules. À eux seuls, les modèles *in vitro* ne suffisent pas à prédire la toxicité et le potentiel inflammatoire des NP. Il faut des modèles *in vivo* pour comprendre le mode d'action des NP dans un environnement multicellulaire complexe (Elsaesser *et al.*, 2012; Maynard *et al.*, 2011; G. Oberdorster *et al.*, 2005b).

Brièvement, parmi les modèles d'inflammation utilisés pour évaluer le potentiel inflammatoire des NP (mais aussi d'autres molécules), le plus couramment utilisé est celui qui permet d'évaluer le cas spécifique d'une inflammation pulmonaire (voir tableaux 3 à 5). Après une exposition (d'une durée courte ou prolongée) à des NP sous forme d'aérosol, par inhalation ou encore par instillation par la trachée, les constituants du liquide broncho-alvéolaire (BAL) sont analysés. Plusieurs informations peuvent être obtenues à partir des BAL : Présence d'enzymes ou de protéines (LDH, albumine, protéines totales, Glutathion, malondialdéhyde, etc.); présence de cytokines inflammatoires; présence de types cellulaire prédominants; présence d'espèces réactives de l'oxygène; etc. (Arya *et al.*, 2013; Gustafsson *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2011; G. Oberdorster *et al.*, 1994; Warheit *et al.*, 2006). Il existe aussi des modèles d'inflammation pulmonaires utilisés pour évaluer le potentiel allergène des molécules. Certaines NP peuvent agir comme des adjuvants et ont donc le potentiel d'exacerber des maladies inflammatoires chroniques comme l'asthme (Larsen *et al.*, 2010). Brièvement, les souris sont préalablement sensibilisées (toujours par voie respiratoire) à un allergène connu (ex : l'ovalbumine ou OVA) et sont par la suite exposés de nouveau à cet allergène. La deuxième exposition peut se faire en combinaison avec une molécule dont le potentiel allergène est l'objet de l'étude. Dans le cas du TiO_2 par exemple. Larsen et al. ont démontré la capacité de cette NP à potentialiser l'effet allergène de l'ovalbumine. Ainsi, la concentration dans les BAL des anticorps IgE et IgG1, des cytokines IL-4 et IL-5, ainsi que la quantité de leucocytes totaux a significativement augmenté en présence de cette NP (Larsen *et al.*, 2010; Serhan, 2010). D'autres modèles d'inflammation tels que la péritonite expérimentale sont couramment utilisés pour évaluer la capacité des molécules à l'étude de faciliter la résolution de l'inflammation. Une péritonite peut être simulée à l'aide de l'agent zymosan (peptide dérivé de la membrane de levure

saccharomyces cerevisiae). Une injection intrapéritonéale de cet agent implique un recrutement leucocytaire important (monocytes, macrophages, neutrophiles) jusqu'à 48 post-injection. Ainsi, ces conditions permettent alors l'étude du potentiel anti-inflammatoire de la molécule à l'étude. Dans le cas des NP, cette procédure a été employé quelques rares fois (Alves *et al.*, 2011; Gadde *et al.*, 2014; Serhan, 2010). Enfin, d'autres modèles inflammatoires évaluent l'œdème au niveau de l'oreille ou de la patte des souris. Dellinger et al. ont constaté qu'une exposition des souris aux NP de fullerène (par injection sous-cutanée) atténue significativement l'inflammation et l'œdème (évalués d'après l'inflammation apparente à l'œil nu et par le poids de l'oreille) causés par une injection subséquente de PMA (Dellinger *et al.*, 2009). De nombreux autres modèles permettent également de simuler des pathologies comme l'arthrite, des maladies inflammatoires intestinales, la sclérose en plaque, etc.

5.1 Le modèle de la poche d'air murine

Tel que mentionné, il existe donc de nombreux tests inflammatoires *in vivo* qui peuvent être utilisés pour étudier les NP. Toutefois, dans la plupart des modèles mentionnés, ce sont les cellules épithéliales qui sont exposées aux NP. Or, la plupart des nanoparticules et nanomatériaux qui sont en développement pour être utilisés en biomédecine, seront injectables. Ce sera donc plutôt les cellules endothéliales, mésothéliales et les leucocytes qui seront exposés aux nanoparticules (Vandooren *et al.*, 2013). De plus, dans certains cas, les NP sont également capables de traverser les compartiments tissulaires par translocation (Kandlikar *et al.*, 2007; G. Oberdorster *et al.*, 2005b). En ce sens le modèle de la poche d'air murine est bien adapté à l'étude du potentiel inflammatoire des NP. Ce modèle a été développé en 1953 par Hans Selye (Selye, 1953). Son nom alternatif peut-être aussi la poche à granulomes car il y a formation d'un mince tissu granuleux parsemé de petits vaisseaux sanguins. Ce tissu est similaire à la structure de la membrane synoviale qui est composé de cellules fibroblastes et de macrophages. Ce modèle a été développé dans le but d'étudier l'inflammation de la membrane synoviale (synovite) qui est intimement associée à l'arthrite rhumatoïde lors de laquelle il y a une infiltration importante de leucocytes (surtout des neutrophiles). Brièvement, on injecte de l'air stérile au jour zéro ainsi qu'au jour trois sous la peau du côté dorsal de la souris. Il y a alors formation d'une grande cavité stérile. Cinq à six jours après la première injection, une couche cellulaire, structurellement similaire à la membrane synoviale

qu'on retrouve au niveau des jointures, est présente. Cette couche peut retenir la solution de NP injectée dans la poche d'air (Edwards *et al.*, 1981; Sedgwick *et al.*, 1983).

Parmi les avantages que possède ce modèle pour évaluer l'effet inflammatoire d'une molécule par rapport à d'autres modèles il y a sa versatilité et sa simplicité d'un point de vue technique. Il permet d'obtenir des réponses immunologiques rapides, robustes et reproductibles. En effet, il est techniquement plus facile de récolter une quantité d'exsudat suffisante pour analyse, contrairement à d'autres modèles *in vivo* comme l'injection intrapéritonéale par exemple, où la récolte peut être plus variable et où la solution d'échantillon injecté s'étend et se dilue dans la cavité péritonéale (Vandooren *et al.*, 2013). Ce faisant, il est plus aisé de récupérer les exsudats et d'analyser ensuite le recrutement de leucocytes dans la poche d'air, i.e. de les identifier et de les dénombrer. De plus, d'autres paramètres de la réponse inflammatoire peuvent être mesurés dans ces fluides, soit la quantité de protéines totales ainsi que les cytokines et chimiokines présentes. Un autre avantage de ce modèle est qu'il permet d'étudier les trois phases de l'inflammation, soit l'initiation, l'amplification et la résolution. Dans le cas des LPS par exemple, la phase d'amplification se situe autour de 6 heures après injection de cet agent pro-inflammatoire dans la poche d'air. Il y a à ce moment une infiltration importante de neutrophiles. Dans le cas d'autres agents pro-inflammatoires, tel que la caragénine, les trois phases sont plus tardives (infiltration est maximale vers 24 heures postinjection). Il est donc important d'évaluer l'effet de la molécule à l'étude à des temps différents. De plus, en fonction de l'agent testé, ce ne seront pas toujours des neutrophiles qui seront attirés vers la poche d'air. Ainsi, une injection d'éotaxine attirera en majorité des éosinophiles, tandis que le zymosan ou la carragénine attireront un mélange de neutrophiles, monocytes/macrophages et autres leucocytes. Il est également possible d'effectuer des analyses histologiques pour évaluer des effets chroniques (vascularisation / angiogénèse / poids du tissu granuleux formé) causés par l'injection des molécules testées, 7, 14 ou 28 jours post-injection (Appleton *et al.*, 1996; Colville-Nash *et al.*, 1995; Garcia-Ramallo *et al.*, 2002; D. Girard, 2014; Serhan, 2010; Vandooren *et al.*, 2013).

OBJECTIF DU PROJET DE RECHERCHE :

Caractérisation des propriétés inflammatoires de différentes nanoparticules en vue d'une classification en fonction de leur potentiel inflammatoire.

Tous les agents qui ont le potentiel de moduler le processus inflammatoire ont également le potentiel d'exercer une influence sur l'état d'activation et les fonctions du neutrophile, cellule clé lors de l'inflammation. Toutefois, seulement une dizaine d'études se sont intéressées directement aux effets directs des NP sur ce type cellulaire (Bartneck *et al.*, 2010a; Bartneck *et al.*, 2010b; Dianzani *et al.*, 2006; Hedenborg, 1988b; Kumazawa *et al.*, 2002; Memisoglu-Bilensoy *et al.*, 2006; R. H. Muller *et al.*, 1996; Papatheofanis *et al.*, 1991) . Étant donné l'importance du neutrophile en inflammation et puisque les réponses biologiques associées aux NP semblent être cellules-dépendantes (d'après l'ensemble de la littérature), les objectifs de recherche de ce projet sont de:

1) Déterminer les effets *in vitro* (sur le neutrophile) et *in vivo* (modèle de la poche d'air murine) suite à une exposition aux NP de TiO_2.
2) Déterminer les effets *in vitro* (sur le neutrophile) et *in vivo* (modèle de la poche d'air murine) suite à une exposition aux NP de ZnO.
3) Déterminer les effets *in vitro* (sur le neutrophile) et *in vivo* (modèle de la poche d'air murine) suite à une exposition aux NP de Fullerenol.

L'ensemble de nos observations, corrélées à celles d'autres équipes de recherche portant sur d'autres aspects de la toxicité des NP, permettront d'entamer une classification des NP selon leur potentiel inflammatoire. D'un point de vue de gestion de risques reliés à une exposition aux NP, ce projet contribuera à identifier les NP sécuritaires d'un point de vue inflammatoire (inertes) versus les NP qui ne le sont pas et qui ont également le potentiel d'interagir avec d'autres molécules.

PARTIE 2 – ARTICLES

Article I : Présentation

Titre

Titanium dioxide (TiO_2) nanoparticles induce neutrophil influx and local production of several pro-inflammatory mediators in vivo.

Auteurs

David Gonçalves et Denis Girard

Publié dans la revue

International Immunopharmacology. 2011 Aug;11(8):1109-15. Epub 2011 Mar 21.

Contribution personnelle

Cet article contient des résultats révélant la capacité des NP de TiO_2 à déréguler les premières étapes de la réponse inflammatoire *in vivo* à l'aide du modèle de la poche d'air murine. J'ai effectué toutes les expériences de cet article et j'ai effectué l'analyse des résultats, la mise en forme des figures, la rédaction et les corrections du manuscrit.

Contribution des coauteurs

Denis Girard a participé à l'ensemble des étapes de préparation de l'article : Planification des expériences, analyse des résultats, rédaction et correction du manuscrit.

Résumé en français de l'article

Nous avons récemment décrit les effets in vitro des nanoparticules de dioxyde de titane (TiO_2) chez les neutrophiles humains. L'objectif de la présente étude était de déterminer si les NP de TiO_2 provoquent une infiltration leucocytaire dans le modèle in vivo murin de la poche d'air, et le cas échéant, d'identifier laquelle des populations cellulaires principales ont été attirées. Les NP de TiO_2, ont provoqué une infiltration leucocytaire après 3 à 9 heures de traitement, étant donné que le nombre de leucocytes présents était significativement plus élevé lorsque comparé aux souris témoins. Les neutrophiles sont les leucocytes les plus attirés par le TiO_2, représentant plus de 80% des cellules présentes, le reste étant des cellules mononucléaires. En utilisant une technique de criblage d'anticorps pour détecter 40 médiateurs d'inflammation différents, nous avons observé que le TiO_2 a augmenté la production locale de plusieurs analytes dans les exsudats, y compris diverses chimiokines. En utilisant un test ELISA, nous avons trouvé que la concentration de MIP-1β a été significativement augmentée par la présence de TiO_2, par rapport aux souris témoin confirment les résultats obtenus par criblage d'anticorps.

International Immunopharmacology 11 (2011) 1109–1115

Contents lists available at ScienceDirect

International Immunopharmacology

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

Titanium dioxide (TiO_2) nanoparticles induce neutrophil influx and local production of several pro-inflammatory mediators in vivo

D.M. Gonçalves, D. Girard *

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

ARTICLE INFO

Article history:
Received 25 January 2011
Received in revised form 5 March 2011
Accepted 9 March 2011
Available online 21 March 2011

Keywords:
Inflammation
In vivo
Neutrophils
Nanoparticles
Cytokines
Antibody array

ABSTRACT

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

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The field of nanoscience has witnessed a rapid growth in the last decade. Applications are numerous and include aerospace, defense, national security, electronics, biology and biomedicine [1]. For example, in biomedicine, "nanoparticle (NP)-oligonucleotide" hybrids can perform many chemical and biological tasks, including molecule and protein targeting or drug and gene delivery vehicles. These new nanodevices have many novel properties that are valuable for the medical biotechnology sector [2]. Consequently, most researchers working in nanoscience focus mainly on technological applications, rather than on concerns regarding the safety of nanomaterial exposure. In light of this, there has been a recent surge of interest in the expanding field of nanotoxicology [3] investigating the safety evaluation of engineered nanostructures and nanodevices [4].

Titanium dioxide (TiO_2), an odorless white powder that naturally occurs in minerals such as anatase, rutile, and brookite, is widely used as white pigment for paints, paper, plastic, ceramics, etc. However, TiO_2 NPs are transparent at the nanoscale and are able to absorb and reflect UV light. This explains their usefulness in sunscreens and in solar cells used to make solar panels [3]. At the macrometer scale, TiO_2 has always been considered nontoxic and biologically inert [5]. However, at the nanoscale, it has different physical properties. TiO_2 has been shown to be able to penetrate skin [6] and catalyze oxidative damage to DNA in vitro and in vivo [7]. A distribution experiment also revealed that after intraperitoneal injection in mice, TiO_2 NPs were retained in multiple organs and tissues, and induced various degrees of organ lesions. [8]. From an inflammatory perspective, it appears that TiO_2 NPs possess pro-inflammatory properties similar to those exhibited by other nanomaterials. Some pro-inflammatory effects of TiO_2 NPs were observed in vitro in pulmonary cells and in animals following lung instillation. In fact, the vast majority of studies investigating the inflammatory properties of nanomaterials target pulmonary cells, airways and lungs [5,9–11]. However, NPs can also gain entry into human systems through ingestion and via dermal routes [6,12]. Curiously, there are few in vivo and in vitro studies interested in cytokine production to assess potential inflammatory responses following cell stimulation by TiO_2. In one report, TiO_2 NPs administered intravenously in rats caused no significant chemokine, cytokine or any other parameter of immune modulation variation [12]. In another study, a 24 h treatment of A549 human lung epithelial cells with TiO_2 NPs caused a significant increase in interleukin (IL)-8 [11].

It is a well-known fact that polymorphonuclear neutrophil (PMN) cell numbers increase in TiO_2-lung inflammation in vivo [8,10,13]. However, research on this phenomenon in other tissues is scarce. There is also a lack of literature concerning the role of TiO_2 on neutrophil cell physiology, particularly in PMNs of human origin. We have addressed this problem and found that TiO_2 exerts important human neutrophil agonistic properties in vitro, including the capacity to induce morphological cell change and phosphorylation events, to delay apoptosis and to increase the production of cytokines and

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

1567-5769/$ – see front matter © 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.intimp.2011.03.007

Article II: Présentation

Titre

Evidence that polyhydroxylated C_{60} fullerenes (fullerenols) amplify the effect of lipopolysaccharides to induce rapid leukocyte infiltration in vivo.

Auteurs

David Gonçalves et Denis Girard

Publié dans la revue

Chemical research in toxicology, 2013 Dec 16;26(12):1884-92. Epub 2013 Nov 14.

Contribution personnelle

Cet article contient les résultats concernant les NP de fullerenol qui peuvent agir en concert avec les lypopolysaccharides *in vivo* et provoquer ainsi un état inflammatoire chez la souris (modèle de la poche d'air murine). J'ai effectué toutes les expériences de cet article et j'ai effectué l'analyse des résultats, la mise en forme des figures, la rédaction et les corrections du manuscrit.

Contribution des coauteurs

Denis Girard a participé à l'ensemble des étapes de préparation de l'article : Planification des expériences, analyse des résultats, rédaction et correction du manuscrit.

Résumé en français de l'article

Les nanoparticules (NP) de fullerenols $C_{60}(OH)_n$ ont un potentiel thérapeutique, mais il y a débat entourant leur toxicité. Nous avons testé l'hypothèse que le $C_{60}(OH)_n$ possède un effet pro-inflammatoire *in vivo*. Des expériences de type cinétique et dose dépendantes ont été effectuées avec le modèle de la poche d'air murine d'inflammation aiguë et elles ont révélé que contrairement aux NP de TiO_2, ces NP ne sont pas pro-inflammatoires chez des souris CD-1, C57BL/6 et BALB/c. Cependant, après 3 heures de traitement, les NP de fullerenol ont amplifié l'effet causé par les lypopolysaccharides (LPS) provoquant un influx rapide de leucocytes, la majorité étant des neutrophiles. Un criblage d'anticorps utilisé pour détecter la présence de plusieurs analytes de façon simultanée indique que le phénomène d'amplification peut s'expliquer, au moins partiellement, par une production locale accrue de plusieurs cytokines / chimiokines dans les exsudats, incluant la cytokine pro-inflammatoire IL-6. L'utilisation d'un essai ELISA pour quantifier la concentration d'IL-6 présente dans les exsudats des poche d'air a permis de démontrer que le $C_{60}(OH)_n$ potentialise l'effet du LPS dans la production de cette cytokine. Par conséquent, bien que les NP de fullerenol seules n'exercent pas d'effets pro-inflammatoires, elles peuvent agir en concert avec d'autres agents pour provoquer une inflammation, une situation qui est susceptible de se reproduire *in vivo*.

Chemical Research in Toxicology

Article

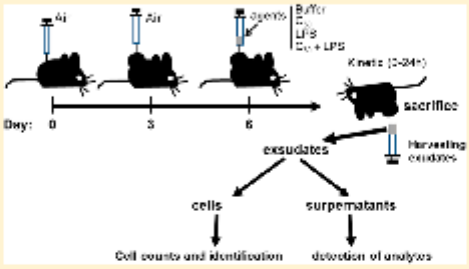
pubs.acs.org/crt

Evidence That Polyhydroxylated C_{60} Fullerenes (Fullerenols) Amplify the Effect of Lipopolysaccharides to Induce Rapid Leukocyte Infiltration in Vivo

D. M. Gonçalves and D. Girard*

Laboratoire de Recherche en Inflammation et Physiologie des Granulocytes, INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 Boulevard des Prairies, Laval, Quebec, Canada H7V 1B7

ABSTRACT: Fullerenols $C_{60}(OH)$ have therapeutic potential, but there is debate regarding their toxicity. Here, we tested the hypothesis that $C_{60}(OH)_n$ possesses a pro-inflammatory effect in vivo. Kinetic and dose-dependent experiments performed with the murine air pouch model of acute inflammation revealed that, unlike TiO_2 used as a positive control in this model, $C_{60}(OH)_n$ NPs were not pro-inflammatory in CD-1, C57BL/6, and BALB/c mice. However, after 3 h of treatment, $C_{60}(OH)_n$ NPs were found to amplify the effect of lipopolysaccharides (LPS) causing a rapid leukocyte influx in which the major cells observed are neutrophils. The use of an antibody array assay to detect different analytes simultaneously indicates that the amplification effect is, at least partially, explained by an increased local production of several cytokines/chemokines in the exudates, including the pro-inflammatory cytokine IL-6. Using an ELISA to quantify the amount of IL-6 produced into air pouch exudates, we demonstrated that $C_{60}(OH)_n$ increases the LPS-induced local production of this cytokine. Therefore, although $C_{60}(OH)_n$ NPs alone do not exert proinflammatory activity under certain conditions, they can act in concert with other agents to cause inflammation, a situation that is likely to occur in vivo.



INTRODUCTION

Research in the field of nanotechnology has increased tremendously in the past few years, due to the expectation that nanomaterials may improve practically all types of products; more than 1000 nanoproducts already exist on the market.[1] However, because of several properties, including their size, nanoparticles (NPs) are potentially biologically active and may interfere with normal biological systems and cell mechanisms. Water-soluble fullerenes were successfully synthesized about 20 years ago as polyhydroxylated C_{60}, named fullerenols ("bucky balls") or $C_{60}(OH)_x$ (where $x = 12–26$).[2] Together, they form a unique spherical cage structure to which side chains can be added to modify the physicochemical and/or pharmacological characteristics of the molecule.[3,4] Unlike fullerenes, the fact that these hydroxylated "bucky balls" are water-soluble makes it easier them to study in biological systems.[5] Fullerenols have enormous therapeutic potential mostly because of their antioxidant properties.[4,6] It has been shown that they can deactivate various reactive oxygen species (ROS), including singlet oxygen, superoxide anion, hydroxyl radicals, and nitric oxide.[7−9] Because of their free-radical scavenging capabilities, $C_{60}(OH)_x$ were reported to be able to act as neuroprotective agents against ROS-mediated neuronal death.[8,10,11] Fullerene derivatives are capable of enzyme inhibition; they can inhibit enzymes such as the nitric oxide synthase or the human immune-deficiency virus protease, essential for the virus survival.[12−14] Despite their enormous potentials, there is little existing data about their biocompatibility and cytotoxicity, probably because most of the literature tends to demonstrate that fullerenols have no or very few cytotoxic properties. However, there are debates regarding the toxicity of fullerenols. For example, when tested at 1−100 μg/mL, $C_{60}(OH)_{24}$ has a direct effect on human umbilical vein endothelial cells causing cell injury, cell death, and inhibition of growth.[15] NPs or different engineered particles with various sizes can cause inflammation, one of the major toxic effect of NPs reported in the literature.[16−19]

Because exposure to NPs is increasing rapidly and no clear guidelines on the testing and evaluation of NPs are presently available, the use of in vitro experiments in nanotoxicology studies is becoming extremely relevant and important.[1] However, it is impossible to recreate the complex inflammatory process in vitro, and therefore, in addition to in vitro assays, the use of in vivo models of inflammation is needed. The murine air pouch model of acute inflammation is probably the most versatile and simplest model to use for evaluating acute proinflammatory effects of NPs. This model was previously shown to be a convenient model for studying the behavior of lining cells involved in the formation of a structure similar to that of synovial lining cells.[20−22] Effectively, in this model, administration of air under the skin produced a pouch wall that

Received: July 18, 2013
Published: November 5, 2013

ACS Publications © 2013 American Chemical Society

dx.doi.org/10.1021/tx4002622 | Chem. Res. Toxicol. 2013, 26, 1884−1892

Article III: Présentation

Titre

Zinc oxide nanoparticles delay human neutrophil apoptosis by a de novo protein synthesis-dependent and reactive oxygen species-independent mechanism.

Auteurs

David Gonçalves et Denis Girard

Publié dans la revue

Toxicology in vitro. 2014 Aug;28(5):926-31. Epub 2014 Apr 20.

Contribution personnelle

Cet article contient plusieurs résultats obtenus avec les NP de dioxyde de Zinc *in vitro*. Nous y montrons des résultats qui illustrent le potentiel agonistique de ces NP, qui est en partie dépendante d'une synthèse protéique *de novo* du neutrophile. J'ai effectué toutes les expériences de cet article et j'ai effectué l'analyse des résultats, la mise en forme des figures, la rédaction et les corrections du manuscrit.

Contribution des coauteurs

Denis Girard a participé à l'ensemble des étapes de préparation de l'article : Planification des expériences, analyse des résultats, rédaction et correction du manuscrit.

Résumé en français de l'article

L'inflammation est l'un des principaux effets toxiques décrits dans la littérature suivant l'exposition à une nanoparticule (NP). Connaissant l'importance de neutrophiles à orchestrer l'inflammation, il est surprenant qu'il y ait peu d'études traitant du rôle direct des NP sur la biologie du neutrophile. Lors de ces travaux, nous avons investigué si les NP de ZnO peuvent altérer la physiologie du neutrophile. Nous avons constaté que ces NP peuvent augmenter la taille cellulaire, provoquer des changements morphologiques cellulaires et augmenter l'étalement cellulaire sur verre, mais ne peuvent induire la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Le traitement des neutrophiles avec les NP de ZnO a inhibé de façon significative leur taux d'apoptose et a augmenté leur synthèse protéique *de novo*, tel que démontré en gel d'électrophorèse avec des cellules préalablement incubées avec des acides aminés marqués au soufre 35. L'utilisation d'un inhibiteur de synthèse protéique, le cycloheximide, a annulé en partie l'effet antiapoptique du ZnO. Nous concluons que les NP de ZnO sont des agonistes du neutrophile capable d'activer diverses fonctions du neutrophile et que ces NP inhibent l'apoptose par un mécanisme dépendant d'une synthèse protéique de novo et indépendant d'une production de ROS. C'est le premier exemple d'une NP qui a une influence importante sur la néo-synthèse de polypeptides.

Toxicology in Vitro 28 (2014) 926–931

Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology in Vitro

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

Zinc oxide nanoparticles delay human neutrophil apoptosis by a *de novo* protein synthesis-dependent and reactive oxygen species-independent mechanism

David M. Goncalves, D. Girard *

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

ARTICLE INFO

Article history:
Received 19 November 2013
Accepted 5 March 2014
Available online 20 April 2014

Keywords:
Inflammation
Neutrophils
Apoptosis
Nanoparticle
ZnO
Protein synthesis

ABSTRACT

Inflammation is one of the major toxic effects reported in the literature following nanoparticle (NP) exposure. Knowing the importance of neutrophils to orchestrate inflammation, it is surprising that the direct role of NPs on neutrophil biology is poorly documented. Here, we investigated if ZnO NPs can alter neutrophil biology. We found that ZnO NPs increased the cell size, induced cell shape changes, activated phosphorylation events, enhanced cell spreading onto glass, but did not induce the generation of reactive oxygen species (ROS). Treatment of neutrophils with ZnO NPs markedly and significantly inhibited apoptosis and increased *de novo* protein synthesis, as demonstrated by gel electrophoresis of metabolically [^{35}S]-labeled cells. Utilization of the protein synthesis inhibitor, cycloheximide, reversed such antiapoptotic effect. We conclude that ZnO NPs are activators of several human neutrophil functions and that they inhibit apoptosis by a *de novo* protein synthesis-dependent and ROS-independent mechanism. This is the first example that a NP acts on the neo-synthesis of polypeptides.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Nanomaterials are increasingly produced and the use of engineered nanoparticles (NPs) in a variety of sectors, including biomedical sciences, pharmaceutical industry, electronics, cosmetics, etc., is getting more and more common because the physicochemical properties of their small 1–100 nm size differ from standard bulk materials. Consequently the probability of exposure to NP has risen (Oberdorster et al., 2005). NPs could enter human body not only via inhalation, but also via ingestion and dermal exposure, reaching blood circulation. Therefore, it is crucial to evaluate the risk that NPs represent to human health. One of the major toxic effects of NPs frequently reported in the literature is inflammation. In in vivo model, airway NP exposure lead to an increased number of polymorphonuclear neutrophil (PMN) cells in lungs and bronchoalveolar lavages (Morimoto et al., 2011; Noel et al., 2012; Roursgaard et al., 2011); PMN counts are used as biomarkers of inflammation.

The metal oxide group of NPs are among the families of NPs that generate increasing attention from the scientific community. One of the most ubiquitous NPs among metal-oxide NPs is zinc oxide (ZnO). Besides having great anti-microbial properties, ZnO NPs are widely used in a variety of compounds, including cosmetics, sunscreens and toothpastes, to name a few (Heng et al., 2011; Vandebriel and De Jong, 2012). Despite the widespread use of ZnO NPs, its safety for humans is unknown and the intracellular regulatory mechanisms involved in ZnO NPs-induced cytotoxicity reported in a variety of cells are unclear (Heng et al., 2011; Sahu et al., 2013; Vandebriel and De Jong, 2012; Wilhelmi et al., 2013). The direct interaction between NPs and PMNs is poorly documented. In recent few studies, we and others demonstrated that human neutrophil biology could be altered in response to NPs (Abrikossova et al., 2012; Babin et al., 2013; Goncalves et al., 2010; Goncalves and Girard, 2011). Among these, ZnO was found to induce degranulation in PMNs (Babin et al., 2013). Although it is relatively well known how PMNs can respond to pathogens, especially bacteria and fungi, as well as to a plethora of modulators like cytokines (Kato and Kitagawa, 2006), our knowledge regarding how PMNs react to NPs is unknown. Since the cytotoxicity and inflammatory properties of ZnO NPs appear to be cell type-dependent (Heng et al., 2011; Sahu et al., 2013; Vandebriel and De Jong, 2012; Wilhelmi et al., 2013), the need to investigate how PMNs respond to these NPs is important. The aim of this study was to determine how ZnO NPs alter the biology of PMNs.

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

http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2014.03.002
0887-2333/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Article (IV) de synthèse: Présentation

Titre

Activation of neutrophils by nanoparticles

Auteurs :

David Gonçalves, Rafaël de Liz et Denis Girard

Publié dans la revue :

Scientific world journal. 2011;11:1877-85. Epub 2011 Oct 24.

Contribution personnelle :

Cet article de revue a été rédigé dans le but d'identifier et de décrire les principaux travaux portant sur les propriétés inflammatoires des NP. J'ai contribué à la rédaction de l'ensemble du manuscrit.

Contribution des coauteurs :

Rafaël de Liz a également contribué à la rédaction du manuscrit. Denis Girard a rédigé, corrigé et retravaillé le manuscrit.

Résumé en français de l'article

L'utilisation de nanoparticules (NP) a augmenté au cours des dernières années dans divers domaines, y compris la défense, de l'aérospatiale, de l'électronique, la biologie, la médecine ainsi que dans des applications telles que les technologies de diagnostic, de bio-imagerie et de ciblage de médicaments. Ainsi, l'exposition humaine aux NP et nanomatériaux est inévitable et va certainement s'accroitre à l'avenir, résultant en un plus grand intérêt de la part des scientifiques envers la nanotoxicologie, l'étude de la toxicité des nanomatériaux. Un certain nombre d'études ont rapporté les effets des NP sur l'inflammation pulmonaire en effectuant des tests *in vitro* et *in vivo* où les neutrophiles semblent être le type cellulaire prédominant dans les fluides des lavages bronchoalvéolaires suite à l'inhalation ou l'instillation intratrachéale des NP. Malgré le fait que plusieurs études ont rapporté une augmentation du nombre de neutrophiles, la littérature traitant de l'activation directe des neutrophiles par une NP donnée est peu documentée. Ce document résume l'ensemble de la littérature actuelle dans ce domaine de recherche et se termine avec une perspective d'avenir dans laquelle notre laboratoire jouera un rôle dans les années à venir.

Review Article
TheScientificWorldJOURNAL (2011) 11, 1877–1885
ISSN 1537-744X; doi:10.1100/2011/768350

TheScientificWorldJOURNAL
www.thescientificworld.com

Activation of Neutrophils by Nanoparticles

David M. Goncalves, Rafael de Liz, and Denis Girard

Laboratoire de Recherche en Inflammation et Physiologie des Granulocytes, INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, QC, Canada H7V 1B7

Received 23 July 2011; Accepted 23 August 2011

Academic Editor: Claude Ostiguy

The use of nanoparticles (NPs) *has* increased in the past few years in various fields, including defence, aerospace, electronics, biology, medicine, and so forth. and in applications such as diagnostic technology, bioimaging, and drug/gene delivery. Thus, human exposure to NPs and nanomaterials is unavoidable and will certainly expand in the future resulting in a growing interest in nanotoxicology, the study of toxicity of nanomaterials. A number of studies have reported the effects of NPs in respect to pulmonary inflammation by investigating in vitro activation of pulmonary cells with NPs and in vivo in a variety of models in which neutrophils appear to be the predominant leukocyte cell type in lungs and in bronchoalveolar lavages following inhalation or intratracheal instillation of NPs. Despite the fact that several studies have reported an increased number of neutrophils, the literature dealing with the direct activation of *neutrophils by a given NP is* poorly documented. This paper will summarize the current literature in this latter area of research and will end with a perspective view in which our laboratory will be involved in the following years.

KEYWORDS: inflammation, nanotoxicology, neutrophils, nanoparticles

Correspondence should be addressed to Denis Girard, denis.girard@iaf.inrs.ca
Copyright © 2011 David M. Goncalves et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.
Published by TheScientificWorldJOURNAL; http://www.tswj.com/

DISCUSSION ET CONCLUSION

L'exposition des humains aux NP s'accroit au fil des ans étant donné la multiplication de nouvelles applications dans lesquelles elles sont incorporées (Nanoproject.org, 2014). Les nombreuses études mentionnées dans cet ouvrage permettent de constater l'l'impact que peuvent avoir les NP sur les réactions biologiques déclenchées à la suite des interactions entre les NP et les cellules. Les résultats présentés dans cette thèse s'inscrivent dans ce contexte. Une variété de réponses / fonctions cellulaires ont été affectées et modulées par les NP de TiO_2, ZnO et le fullerenol. Toutefois, les tests *in vitro* à eux seuls ne peuvent définir le caractère toxique ou inflammatoire de façon définitive, d'où notre méthodologie qui fait appel à la fois à des tests *in vitro,* mais aussi à des tests *in vivo* avec le modèle de la poche d'air. La façon d'étudier le potentiel toxique et inflammatoire d'une NP s'est raffinée au cours des dernières années et celle-ci implique également une caractérisation rigoureuse de la NP testée. La figure 3, traduit sous forme illustrée le concept associé à une étude comme celle-ci (W. S. Cho *et al.*, 2010).

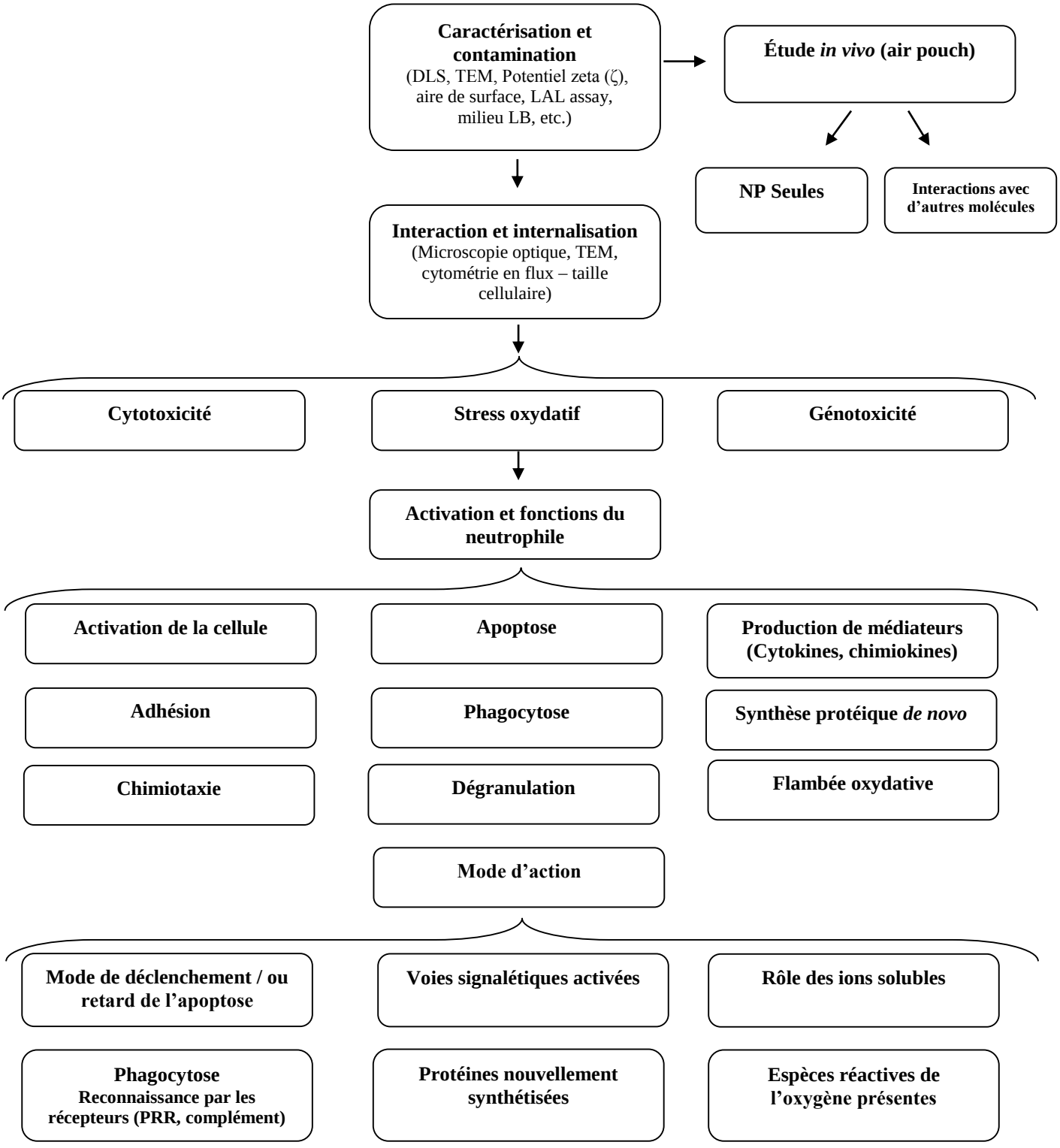


Figure 3. Conceptualisation schématisée de l'étude des nanoparticule au laboratoire.
Inspiré de Sharma et al. 2012 et adapté à l'étude de l'impact des nanoparticules sur les neutrophiles.

L'importance de la caractérisation dans des conditions similaires aux paramètres expérimentaux.

Tel que mentionné en introduction, il est conseillé pour les équipes de recherche qui étudient le comportement des NP, d'utiliser une diversité d'appareils et de techniques de mesure pour les caractériser (Wilkinson, 2013). Toutefois, pour des raisons logistiques et financières, la majorité des études s'intéressent aux trois paramètres qui sont la taille initiale ainsi que de leurs agrégats, le potentiel électrique de surface (ou potentiel zeta) et la structure ou la forme de la NP. Également, de plus en plus d'études s'intéressent à l'effet de la température et des composantes présentes dans le tampon où la caractérisation s'effectue, car leurs caractéristiques physiques et chimiques (taille, forme, aire de surface, biodisponibilité, taux de sédimentation, libération d'ions dans le milieu, etc.) en seront nécessairement affectées (Adamcakova-Dodd *et al.*, 2014b; Hsiao *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2013). Nous avons constaté cela à maintes reprises lorsque nous avons effectué des mesures en DLS. Dans le cas de l'oxyde de zinc, par exemple, nous avons d'abord déterminé le diamètre hydrodynamique moyen des NP en solution dans le tampon physiologique RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) sans sérum. Après mesure, 50% des NP avaient un diamètre hydrodynamique moyen de 11.5 nm. Dans un milieu plus proche des conditions physiologiques réelles, c'est-à-dire dans un milieu RPMI supplémenté de 10% sérum (le sérum contient toutes les protéines et molécules favorisant la survie cellulaire *in vitro*), le diamètre hydrodynamique moyen de plus de 50% des NP a augmenté à 80.1 nm. Il est fort possible que certains des constituants du sérum nouvellement adsorbés sur les agrégats de NP puissent interférer avec l'effet biologique causé par la NP. Ceci a déjà été constaté pour le ZnO comme pour d'autres NP telles que les NP de carbone, de cuivre, d'argent ou encore des NP de TiO_2 par exemple (Hsiao *et al.*, 2013; Murdock *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2009). Cependant, milieu sans sérum affecte le taux de croissance, le taux de transcription et la survie cellulaire, il est préférable d'être le plus proche possible des conditions expérimentales dans lesquelles on évalue les réponses cellulaires pour caractériser la NP. Au sérum, s'ajoute également le facteur température. En effet, l'ensemble des essais biologiques se déroule à la température interne du corps humain, soit à 37°C. Il est de plus en plus courant de voir les mesures de DLS être effectuées à cette température plutôt qu'à température pièce. Encore une fois, ceci est fait dans le cadre d'une tendance générale à la caractérisation dans les mêmes conditions expériementales. Il est également important de se soucier de l'harmonie de la méthode

(ou de sa standardisation) lorsque vient le temps de comparer des mesures de diamètres entre NP. Aussitôt qu'un paramètre est modifié au niveau de la solution, il ne sert à rien d'essayer d'interpréter les différences de résultats. Par exemple, si l'expérimentateur décide d'effectuer ses mesures au DLS (dont les solutions *stock* sont la plupart du temps conservées à 4°C), il est impératif d'attendre que les solutions de NP atteignent la température de la pièce avant d'effectuer les mesures. Le même raisonnement s'applique au sérum choisi, au pH, etc. Également, tel que mentionné dans la section 1.1, les nanomatériaux et NP peuvent être contaminés aux endotoxines durant leur synthèse (dans l'industrie ou le milieu académique) qui ne se fait pas toujours dans un environnement stérile. C'est d'ailleurs une nouvelle et récente préoccupation en ce qui concerne les NP, comme en témoignent les travaux récents de Smulders et al. ainsi que Dobrovolskaia et al. Nous avons également été conscientisés de cette problématique et, pour pallier ce problème, nous avons eu recours à une alternance de techniques dans la séquence suivante : 1- Évaluation de la contamination de la NP nouvellement procurée par essai LAL et gélose LB, 2- Caractérisation au DLS 3,- Filtration (22µm) et autoclavage, 4- Deuxième évaluation de la contamination (LAL et gélose), 5- Deuxième caractérisation au DLS, 6- Comparaison des résultats obtenus au DLS après les étapes d'autoclavage et de filtration, 7- Si aucune différence observée, choisir les NP ayant été autoclavées et filtrées même si au départ elles n'étaient pas contaminées d'après les essais LAL et la gélose LB. Cette méthode n'atteste pas à 100% la stérilité de la solution de NP, mais constitue un bon indicateur du niveau de contamination de la solution. Tel que discuté en introduction, il est également possible d'effectuer des tests d'interférence et de diminuer la concentration de la solution à tester pour essayer d'obtenir un résultat satisfaisant avec le LAL essai.

Cytotoxicité relative des nanoparticules de TiO_2, ZnO et fullerenol

Il est difficile de comparer les résultats concernant la cytotoxicité causée par des NP sur différents types cellulaires. Le neutrophile se distingue car dans son cas, la plupart des molécules vont provoquer une toxicité (à faible dose) par apoptose plutôt que par nécrose étant donné l'efficacité de la machinerie apoptotique du neutrophile. C'est le cas par exemple de la cytotoxicité induite par le méthylmercure (7.5 µM). En effet, les PBMC sont bien plus sensibles à cette substance que les

PMN chez qui l'effet est même antiapoptotique à faible dose (D. Girard, 2014; Moisan *et al.*, 2002; Serhan, 2010). Le spectre de concentrations de NP utilisées pour des tests *in vitro* dans les diverses études en nanotoxicologie est très large. Les concentrations varient de 0.25µg/ml à 1mg/ml selon l'étude (voir tableaux 3 à 5). De plus, les types cellulaires (surtout des lignées cellulaires) étudiés sont nombreux. Enfin, il est important d'ajouter que les effets des NPs sur le neutrophile sont très peu documentés (voir tableaux 3 à 5). Les trois NP testées lors de ce projet n'ont aucunement provoqué de nécrose cellulaire (bleu de trypan) et de dommage de la membrane cellulaire (LDH) et ce même à des concentrations très élevées (200 µg/ml) après des expositions prolongées (1-24h). Dans le cas du fullerenol, très peu d'études se sont intéressées à la toxicité de ce dérivé du fullerène précisément, mais parmi celles qui l'ont fait, il n'y a pas de tendance généralisée marquée. En effet, lorsque des cellules de type endothéliales du cordon ombilical (HUVEC) ont été exposés au NP de $C_{60}(OH)_{24}$ (1-100µg/ml), une toxicité importante a été observée : Augmentation de l'ubiquitination des protéines ; cytotoxicité élevée, augmentation de l'autophagie, etc. (Yamawaki *et al.*, 2006). Par contre les cellules de type kératinocytes humaines (Hek) ces NP (0.1-42.5 µg/ml) ne sont pas affectées (viabilité) et leur production d'IL-8 diminue lorsqu'exposées au fullerenol de façon concentration dépendante. Dans le cas des Np de ZnO toutefois, malgré que nous n'ayons pas décelé de cytotoxité envers les neutrophiles, les conclusions de la majorité des études *in vitro* dans ce cas-ci suggèrent que ces NP ont un fort potentiel cytotoxique sur une diversité de types cellulaires (cellules endotheliales (HUVEC) ; bronchiques (BEAS-2B) ; macrophages et cellules dendritiques murins ; cellules du foie (HepG2) ; etc.) et dans la plupart des cas, à des concentrations moindres que celles que nous avons utilisé. (Heng *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2012) En ce qui concerne le TiO_2, l'absence de cytotoxicité concorde avec l'étude de l'équipe de Hedenborg et al. qui avaient eux aussi évalué l'effet cytotoxique des NP de TiO2 sur des lignées primaires de neutrophiles humains 0µg/ml) (Hedenborg, 1988a). Tout comme les NP de ZnO, les autres types cellulaires sont pour la plupart sensibles (libération de LDH, dommage à l'ADN, nécrose cellulaire, etc.) au TiO_2 (Bernier *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2008; Sayes *et al.*, 2006). Ainsi donc, les trois NP se sont toutes avérées cytotoxiques à des concentrations moins élevées pour les cellules de type endothéliales, macrophages, fibroblastes bronchiques et les hépatocytes, par exemple. Une fois de plus, le fait que les neutrophiles tombent plus difficilement dans un état nécrotique que les autres types cellulaires pourraient expliquer la résistance plus élevé de ces cellules versus d'autres types cellulaires.

En plus de nous baser sur l'effet des NP sur la viabilité cellulaire pour effectuer un choix de concentrations de NP à tester, nous nous sommes également donnés comme objectif de comparer les NP entre elles et de les classer en fonction de leur potentiel inflammatoire (objectif à long terme). Ainsi, à des fins de comparaison et de standardisation, nous avons effectué la majorité de nos tests à 100 µg/ml. Toutefois, nous avons également étudié l'impact des concentrations plus élevées ou plus petites en parallèle en fonction de leur capacité à moduler les fonctions les plus importantes du neutrophile comme l'apoptose. Le choix des concentrations était également effectué en fonction des études précédentes réalisées avec les mêmes NP. Par exemple dans le cas du fullerenol, Roursgaard et al. a effectué des instillations intra-trachéales chez des souris avec la même molécule de fullerenol que nous utilisions. De plus, ils s'intéressaient particulièrement au recrutement de neutrophiles dans les BAL. Nous avons donc effectué nos expériences en conséquence à des concentrations variées qui sont similaires aux leurs (50 – 500 µg/ml) à des fins de comparaison. Également, nous avons décidé d'évaluer s'il y a une corrélation entre la concentration de masse et les effets observés (plutôt que l'aire de surface ou des ions présents en solution). Tel que mentionné en introduction, la notion de dose effet est floue en nanotoxicologie. Dans le cas des NP de ZnO par exemple, l'équipe d'Ho et al. ont trouvé qu'autant la masse des NP de ZnO que l'aire de surface de ces NP étaient des bons paramètres pour évaluer la dose(Ho *et al.*, 2011). Ils ont obtenu de belles corrélations entre ces deux paramètres et le nombre de PMN détectés dans les BAL, alors que l'aire de surface est encore souvent mentionnée comme étant le paramètre de référence à utiliser. Cela dit, ces constats soulignent l'importance de bien caractériser les NP, car si on compare une même masse de NP de même composition, mais dont les diamètres sont radicalement différents, l'aire de surface ainsi que le nombre de particules présentes dans une solution versus l'autre varieront énormément. Pourtant, la masse des deux reste identique (Ho *et al.*, 2011; Maynard *et al.*, 2011; Roursgaard *et al.*, 2008)

Les nanoparticules, de vrais agonistes du neutrophile

Au cours des nombreux tests effectués avec les NP de TiO_2, de ZnO et de fullerenol, nous avons observé plusieurs corrélations concentrations dépendantes. En effet, les NP de ZnO et de TiO_2

(pour le TiO_2, voir annexe A, article 1) ont diminué le taux d'apoptose du neutrophile en fonction de la dose utilisée, tandis que le $C_{60}(OH)_n$ n'a eu aucun effet sur cette fonction. Le fait de retarder l'apoptose du neutrophile peut être considéré comme un phénomène hautement pro-inflammatoire. Le contenu (en enzymes protéolytiques et en espèces réactives de l'oxygène) que possède le neutrophile et qui est sensé nous protéger en cas d'infection est le même contenu qui peut causer préjudice aux tissus au niveau du site inflammatoire, ceci est le paradoxe du neutrophile. Ainsi, en cas de retard d'apoptose, les neutrophiles s'accumulent et deviennent nuisibles. Tel que mentionné auparavant, la machinerie apoptotique du neutrophile est extrêmement bien développée et parmi l'ensemble des leucocytes, les PMN sont ceux qui deviennent apoptotiques le plus rapidement (Denis Girard, 2007; Moisan *et al.*, 2002). L'effet anti-apoptique des NP de ZnO et de TiO_2 ne concorde pas avec des études précédentes ayant utilisé des lignées cellulaires (cellules épithéliales, endothéliales hépatocytes, macrophages, etc.) où l'apoptose est en fait induite par ces NP (Heng *et al.*, 2011; Montiel-Davalos *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2012; Takaki *et al.*, 2014; Vandebriel *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014). Puisque le mécanisme d'apoptose chez le neutrophile est très efficace, il est fort possible que le retard d'apoptose causé par ces NP soit dû à l'implication d'une ou plusieurs voies de signalisation. Dans le cas du ZnO, nous avons constaté que le retard d'apoptose semble être en partie dépendant d'une synthèse protéique *de novo*, car l'inhibiteur de synthèse protéique CHX (cycloheximide) a en partie renversé l'effet du la NP. D'autres agents physiologiques sont connus pour agir ainsi, soit l'IL-4, l'IL-13, l'IL-15 ou encore le GM-CSF. Puisque les NP sont connues pour activer une panoplie de voies de signalisation telles (MAPK, NF-κB, protéines de la famille Bcl-2, etc.) nous avons étudié l'effet de différents inhibiteurs sur le retard d'apoptose causé par ces NP (résultats qui ne sont pas présentés dans l'article) pour mieux comprendre le mode d'action des NP de ZnO. Seuls les inhibiteurs de JNK (JNK inhibitor) et l'inhibiteur des tyrosines kinases (génistéine) ont partiellement renversé l'effet de ZnO. Le fait que ces NP aient provoqués la phosphorylation des tyrosines kinases et qu'il ait déjà été démontré par Jeong et al. (chez les kératinocytes humains) qu'elles soient également capables de provoquer la phosphorylation de JNK met en évidence une fois de plus, le mode d'action complexe des NP, surtout si on considère que ce sont principalement les MAPK p38 et ERK½ qui sont connues pour jouer un rôle dans le processus apoptotique (Goncalves *et al.*, 2010; Jeong *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2012; Tsou *et al.*, 2010). Nous avons observé un retard similaire de l'apoptose des PMN en réponse aux NP de TiO_2. Mentionnons toutefois, que les NP de TiO_2 ont justement provoqué une phosphorylation rapide des

MAPK p38 et ERK1/2, et ce, même à de très petites concentrations (0.002 µg/ml) . Le Fullerenol quand à lui n'a aucunement modifié le taux d'apoptose spontanée du neutrophile. Les quelques études s'étant intéressées à l'effet sur l'apoptose de cette NP (sur d'autres types cellulaires) observent des résultats différents à cet égard avec des cellules de type endothéliales (HUVEC et A549) (Gelderman *et al.*, 2008; Yamawaki *et al.*, 2006; Ye *et al.*, 2014) .

Il est intrigant de constater que le TiO_2 a augmenté la production d'espèces réactives de l'oxygène par les PMN tout en retardant leur apoptose, puisque les ROS sont considérés comme des facteurs limitants très importants de la durée de vie des neutrophiles. Ils peuvent avoir une influence directe sur les voies de signalisation (telles que les MAPK et NF-κB) jouant un rôle important dans la survie cellulaire (Luo *et al.*, 2008; Scheel-Toellner *et al.*, 2004). Le fullerenol n'a eu aucune influence sur cette fonction tout comme les NP de ZnO (fullerenol et TiO_2 : résultats qui ne sont pas présentés dans un article compris dans la thèse). Dans le cas, du TiO_2 la production de ROS par les PMN est également observée chez de nombreux autres types cellulaires, mais a également déjà été observée chez le neutrophile dans l'étude de Hedenborg et al. 1988 (100-200µg/ml) (Han *et al.*, 2013; Hedenborg, 1988a; Montiel-Davalos *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2008). Tandis que dans le cas des NP de ZnO, l'absence de production d'espèces réactives de l'oxygène produites par le neutrophile contraste avec de nombreuses observations avec les cellules épithéliales, bronchiques, du foie et de type kératinocytes par exemple (Heng *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2012; Tsou *et al.*, 2010). Le fullerenol est connu pour ses propriétés anti-oxydantes et pour sa capacité à bloquer les effets négatifs associés aux espèces réactives de l'oxygène (Djordjevic *et al.*, 2006; Johnson-Lyles *et al.*, 2010). Dans ce contexte, il n'est pas trop surprenant de constater que le fullerenol (1-200µg/ml) n'a eu aucun effet sur la production de ROS totaux. Ceci vient une fois de plus confirmer le mode d'action complexe associé aux NP, et surtout, cela souligne les effets cellules spécifiques associées aux NP (Luo *et al.*, 2008; Scheel-Toellner *et al.*, 2004).

Nous avons constaté que les trois NP d'oxyde métal (le CeO_2, ne fait pas l'objet de cette thèse, article en annexe, article 2) testées (ZnO, CeO_2 et TiO_2) ont également affecté la fonction de dégranulation du neutrophile de manière plus significative que le témoin positif FMLP, classiquement utilisé pour activer cette fonction. En effet, ces NP ont toutes trois modulé différemment (à la hausse ou à la baisse) l'expression de marqueurs (CD63, CD66b, CD35) des différentes classes de granules à la surface cellulaire des PMN. La libération ainsi qu'une

augmentation de l'activité des enzymes et protéinases associées aux différents granules (MPO, MMP-9, Albumine) a également été constatée suite à la stimulation par ces NP. Le TiO_2 s'est d'ailleurs révélé être la NP la plus apte à moduler cette fonction de dégranulation, car parmi les trois NP testées, c'est le TiO_2 qui a le plus augmenté l'activité gélatinase de la MMP-9. C'est la première étude portant directement sur l'effet d'une NP sur la dégranulation du neutrophile humain (Babin *et al.*, 2013). Les dissemblances dans les effets causés par ces NP, qui appartiennent à une même classe, sur le processus de dégranulation, illustrent une fois de plus le caractère spécifique de chaque NP.

Enfin, des résultats obtenus au laboratoire (non-publiés) ont permis de révéler la capacité des NP de ZnO à augmenter l'efficacité de la fonction de phagocytose chez le neutrophile. Les NP de TiO_2 sont très efficaces tandis que les deux autres (ZnO et CeO_2) provoquent une augmentation de cette fonction cellulaire plus modérée. Il est intéressant de noter que les NP de TiO_2 (100µg/ml) ont eu l'effet inverse sur une lignée de type macrophage (J774A.1) dans les travaux de Möller et al. Cette NP a plutôt modulé à la baisse le taux de phagocytose de ces cellules de façon significative (Moller *et al.*, 2002). L'effet du fullerenol sur cette fonction n'a pas été testé. Cela fut déterminé par une technique de phagocytose de globules rouges de mouton opsonisés avec des IgG (qui permet d'évaluer la phagocytose contrôlée par les récepteurs Fc) et également avec la technique de phagocytose de billes de latex. Il est important de souligner qu'un agent qui augmente l'efficacité de phagocytose du neutrophile favorise ainsi sa capacité à éliminer les agents envahissants et pathogènes. Il est intéressant d'émettre, à ce stade-ci, l'hypothèse qu'une NP qui augmente la phagocytose du neutrophile augmente par le fait-même sa chance d'être internalisée à l'intérieur de ces derniers si des agrégats ($\geq$0.5µm) sont présents. Cela étant dit, il faut également souligner qu'il est possible que des NP soient internalisés à l'intérieur des PMN par l'intermédiaire d'autres voies : endocytose contrôlée par les clathrines ; endocytose contrôlée par les calvéolines ; macropinocytose ; diffusion passive (da Rosa, 2013; Swanson *et al.*, 1995).

Le modèle de la poche d'air murine, pertinent pour évaluer le potentiel inflammatoire d'une nanoparticule

De nombreuses études *in vivo* démontrent l'implication du neutrophile dans les réponses inflammatoires observées dans divers modèles animaux (Ho *et al.*, 2011; Larsen *et al.*, 2010; Srinivas *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2009). Toutefois, il y a un manque évident d'études *in vivo* s'intéressant aux effets des NP sur des organes autres que les poumons (Hubbs *et al.*, 2013). Le modèle de la poche d'air s'insère bien dans ce contexte, car il a été développé dans le but de permettre l'identification et la quantification d'une infiltration leucocytaire dans un site inflammatoire autre que le poumon. Ce modèle devient donc intéressant dans le cas spécifique des NP. En effet, la plupart des futurs médicaments à base de nanomatériaux seront probablement administrés par injection et non pas par inhalation (Vandooren *et al.*, 2013). Dans le cas des NP de TiO_2, en plus d'une infiltration leucocytaire importante avec prédominance (90%) de neutrophiles à 3, 6 et 9 heures (100 et 200 µg/ml), plusieurs de médiateurs d'inflammation ont pu être détectés et identifiés. Le médiateur le plus présent était l'IL-6, une cytokine hautement inflammatoire. D'autres équipes de recherche ont observé la présence d'IL-6 dans les BAL des rats et de souris ayant été exposés par instillation intratrachéale aux NP de TiO_2 (Gustafsson *et al.*, 2011; Roursgaard *et al.*, 2011). Également, la grande quantité de cytokines détectées ainsi que l'infiltration hâtive des leucocytes (dès 3 heures) dans la poche d'air contraste avec l'effet que peuvent avoir des cytokines telles que l'IL-4, l'IL-15 ou l'IL-21 ou même les lipopolysaccharides (Pelletier *et al.*, 2004; Pelletier *et al.*, 2005; Ratthe *et al.*, 2009). Toutefois, comme c'est le cas pour les autres molécules testées avec ce modèle, une résolution s'est effectuée par la suite.

La capacité que possèdent les diverses molécules à induire une infiltration leucocytaire à différents moments dans le temps, souligne l'importance d'effectuer différentes cinétiques et cela doit s'appliquer également à l'étude du potentiel inflammatoire des NP. Les résultats obtenus avec le TiO_2 suggèrent une fois de plus que son mode d'action est très complexe et peut être analogue à celui de molécules naturelles comme les cytokines. En effet, l'ensemble des molécules présentes dans les exsudats ne peuvent avoir été libérées que par les PMN. Les fibroblastes, mastocytes et macrophages synoviaux sont également responsables de la présence importante et hâtive de cytokines (dès 30 minutes pour MIP-1β) qui ultimement attireront le neutrophile ensuite au site inflammatoire. Dans l'étude du potentiel inflammatoire d'une NP chez l'humain, il faut également considérer que ces derniers sont couramment exposés à des polluants, pathogènes, bactéries etc. Il est donc pertinent d'évaluer les éventuelles interactions qu'il pourrait y avoir entre ces agents

nuisibles avec les NP. Ainsi, dans le cas des fullerenols, une étude s'est penchée sur cette question. L'équipe de Roursgaard et al. s'est demandé si une inflammation pulmonaire causée par l'exposition à des particules de quartz (qui provoquent une silicose) pouvait être atténuée par un prétraitement aux NP de fullerenol. Une infiltration neutrophilique ainsi qu'une production importante de ROS caractérisent l'inflammation causée par le quartz. Après avoir effectué une instillation intratrachéale de NP de fullerenol, les souris ont été ensuite exposées aux particules de quartz par la même méthode. Vingt-quatre heures post-exposition, les auteurs ont observé une diminution importante de l'infiltration neutrophilique (environ 50%) causée par le quartz. L'effet anti-inflammatoire du fullerenol a été observé à toutes les doses (0.2µg à 20 µg par souris) sauf à 200 µg/souris, où il a causé une infiltration leucocytaire à lui-seul. De plus, ils ont constaté une diminution de la cytokine MIP-2 (chimioattractant connu du neutrophile) chez les souris préexposées au fullerenol (≥ 2 µg à 20µg/souris). Cette étude montre que les effets que produira cette NP dépendront de la dose (mesurée en concentration massique), mais également de l'état de l'individu pré-exposition. En effet, il a été démontré également qu'un dérivé de cette NP est capable d'interagir avec des enzymes, dont la protéase du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) inhibant ainsi son activité. Ces NP ont également démontré leur capacité à empêcher la liaison des agonistes du récepteur au glutamate sur les cellules neuronales de rats (Jin *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2007; Roursgaard *et al.*, 2008). Les possibilités d'interactions sont donc nombreuses entre ces NP et d'autres molécules, qu'elles soient de nature biologique ou pas. La fonctionnalisation des fullerènes (C_{60}) a d'ailleurs pour objectif d'augmenter cette capacité d'interaction cellulaire et moléculaire que possèdent les fullerènes. La fonctionnalisation avec des groupements hydrophiles (tels que - NH_2, -OH, -COOH, etc.) de ces sphères de carbone leur confère donc une plus grande capacité à interagir avec leur environnement biologique (Saathoff *et al.*, 2011). En fonction des résultats obtenus avec les fullerenols que nous avons testés, nous pouvons affirmer qu'il y a une interaction directe entre le LPS et le $C_{60}(OH)_n$. En effet, lorsqu'injectées chez la souris en même temps, ces deux molécules ont agi en concert pour provoquer une initiation et une amplification de la réponse inflammatoire de façon hâtive (dès 3h). Toutefois, lorsqu'injectés séparément, au temps t = 3h, cette situation ne se reproduit pas. De plus, il y avait un profil différent de cytokines et chimiokines présentes dans les exsudats des souris exposées au $C_{60}(OH)_n$, au LPS ou au mélange $C_{60}(OH)_n$ + LPS. Chez les souris exposées au mélange, les cytokines IL-1β, TNF-α et IL-6 (classiquement rapportées dans les études s'intéressant au processus inflammatoire) sont toutes

trois présentes en plus grande concentration, ce qui révèle un mode d'action spécifique à ce mélange. Cette étude est la première qui démontre que deux agents, lorsque combinés, peuvent avoir des effets pro-inflammatoires, tandis que séparément, ils sont inertes (à t = 3heures). Cette NP qui semble inerte (divers tests *in vitro* ont également été effectués) peut amplifier les effets causés par un autre agent auxquels les humains sont également exposés. C'est le genre de phénomène qui pourrait avoir lieu fréquemment lors d'une situation inflammatoire chez l'humain. Il faut également se questionner sur la manière (quelles voies? ; quels récepteurs?) dont les neutrophiles reconnaissent les NP et sont activés par celles-ci. Est-ce que les NP dont la taille est similaire à celle de beaucoup de molécules biologiques fait en sorte qu'elles pourraient être reconnues par les PMN comme le sont les PAMPs et les DAMPs (*damage-associated molecular pattern molecules*)? Est-ce que les différents états physicochimiques (pH, température, forme, charge de surface, etc.) pourraient favoriser une telle interaction avec les récepteurs PRR ou encore avec les récepteurs du complément? Fadeel et al. décrit les NP comme pouvant être des NAMPs (*nanoparticle-associated molecular patern*), qui, une fois associées aux protéines et molécules présentes *in vivo*, dictent les réponses immunitaires. Ainsi, des NP de type *carbon-black*, TiO_2 ou encore SiO_2, ont toutes trois activé des composantes de l'inflammasome qui est nécessairement activé par les récepteurs TLR. Dans le cas des nanotubes de carbone, par exemple, après avoir été opsonisés par certains facteurs du complément (C3b, iC3b), ces NP ont également activé la cascade du complément. (Fadeel, 2012; D. Girard, 2014; Salvador-Morales *et al.*, 2006; Simard *et al.*, 2011).

CONTRIBUTION A L'AVANCEMENT DES CONNAISSANCES ET PERSPECTIVES

Ce projet a permis de mieux saisir et interpréter les interactions NP-PMN. Cette étude est la première à étudier l'effet direct d'une diversité de NP sur ce type cellulaire. De plus, le fait d'utiliser un modèle *in vivo* évaluant la réponse inflammatoire pour un site autre que les poumons permet de mieux prédire le comportement inflammatoire global de la NP à l'étude. Également, le fait d'effectuer des tests sur des cellules primaires humaines plutôt que sur des lignées cellulaires nous a permis d'évaluer le potentiel inflammatoire de ces NP de façon plus exacte. Bien que l'objectif primaire de ce projet était de classer les NP en fonction de leur potentiel inflammatoire, les résultats obtenus permettent plutôt de dresser un portrait plus nuancé des effets biologiques des NP étudiées.

En effet, les dissimilitudes entre les effets causés par les NP membres d'une même famille (oxyde-métal), le phénomène d'amplification associé aux NP de fullerenol ainsi que les effets contrastants de NP similaire en tout point excepté un paramètre (composition chimique, diamètre) mènent à cette conclusion. Il est clair, toutefois, que les NP de type oxyde-métal étudiées ont un fort pouvoir activateur envers les neutrophiles. En effet, leur potentiel activateur, leurs effets sur les fonctions principales (apoptose, production de cytokines, phagocytose, synthèse protéique *de novo*, dégranulation, flambée oxydative) ainsi que leur capacité à moduler ou activer des voies signalétiques en témoignent. Il serait donc intéressant de poursuivre l'étude de ces NP et d'investiguer par exemple le rôle que pourraient jouer les protéines antiapoptotiques de la famille Bcl-2 (Mcl-1, A1, Bcl-xL), ainsi que les voies de survie cellulaire PI3K/Akt ou encore du facteur de transcription NF-κB dans le retard d'apoptose causé par le ZnO (Luo *et al.*, 2008; Simon, 2003).

Dans le but d'avoir une meilleure vue d'ensemble du potentiel inflammatoire des NP, il serait également intéressant d'effectuer d'autres tests qui exploreraient le potentiel d'interaction des NP avec d'autres agents ou molécules auxquels les humains sont déjà exposés. C'est véritablement un domaine dont le potentiel de recherche est illimité. Il est également envisageable de préstimuler les neutrophiles *in vitro* ou les souris *in vivo* avec d'autres molécules et cytokines connues pour leur effet sur l'inflammation (ex. : IL-4, IL-15, IL-21, TNF-α, LPS, CRGN, TiO_2, etc.). En effet, ce sont des interactions qui pourraient avoir lieu fréquemment *in vivo*. C'est le genre d'étude qu'ont déjà effectué certaines équipes de recherche avec différentes sortes de molécules stimulatoires ou états comme l'hypoxie, le PMA, l'ovalbumine, etc. (Arya *et al.*, 2013; Dellinger *et al.*, 2009; Larsen *et al.*, 2010).

D'autres fonctions du neutrophile devraient être investiguées suite aux stimulations par les NP. De récents travaux (non publiés) ont permis de déterminer la capacité des NP de TiO_2 et de ZnO à augmenter le taux de phagocytose de globules rouges opsonisés dépendante des récepteurs Fc . Il serait intéressant d'aller vérifier l'expression à la surface des PMN des récepteurs Fc (FcγRs) CD16, CD32 et CD64, en cytométrie en flux à l'aide d'anticorps spécifiques, suite à une stimulation par ces NP. Il faudrait poursuivre dans l'exploration des effets des NP sur cette fonction importante en allant vérifier également leur capacité à moduler la phagocytose dépendante des

récepteurs du complément pour mieux comprendre le mode d'action des NP. Une stratégie envisageable pour y arriver, serait d'utiliser des globules rouges de mouton opsonisés avec du sérum humain dépourvu en anticorps provenant de patients atteints du VIH (Chan *et al.*, 2001; Mosser *et al.*, 2011). Enfin, il serait également intéressant d'investiguer si ces deux NP de la même famille activent les mêmes kinases, telles que la *spleen tyrosine kinase* (Syk), PI3K/AKT et les MAPK. Il faudrait également procéder aux mêmes tests d'apoptoses ci-mentionnés mais en utilisant différents inhibiteurs pour ces kinases pour confirmer leur implication. Avec ces résultats, il sera possible par la suite d'effectuer des comparaisons avec d'autres molécules connues pour augmenter la phagocytose des neutrophiles (ex. IL-4, S100A9) et ainsi comparer leur mode d'action.

Il serait également envisageable d'investiguer plus en profondeur la biosynthèse de nouveaux peptides par les PMN suite à la stimulation par le ZnO et de vérifier quelles sont les protéines impliquées (par spectrométrie de masse) étant donné le potentiel thérapeutique que possèdent ces NP. Également, il faudrait vérifier si la synthèse protéique est induite de façon continue (à 6, 12, 24, 48 heures) comme le font les cytokines telles que l'IL-4, l'IL-13 et l'IL-15 par exemple. Cela contribuerait également à répondre à des questions de type mode d'action. Il ne serait pas étonnant de découvrir à l'aide de cette technique, une synthèse accrue d'actine par les PMN stimulés par ZnO étant donné le retard d'apoptose observé (dépendant de la synthèse protéique) et la polymérisation d'actine observée en cytométrie (résultats non présentés dans cette thèse). L'implication de l'actine dans le retard d'apoptose est bien connue puisque celle-ci interagit et inhibe la DNase I, elle-même impliquée dans la fragmentation de l'ADN, processus essentiel lors de l'apoptose (Babin *et al.*, 2013; D. Girard *et al.*, 1997; D. Girard *et al.*, 1996; Kayalar *et al.*, 1996; Ratthe *et al.*, 2004; Simard *et al.*, 2011).

La problématique de la dose à choisir pour corréler aux effets observés est encore bien présente. Ceci est un problème intimement associé à l'étude des NP et toutes sortes de corrélations peuvent être effectuées en fonction de la métrique choisie pour exprimer la dose. Puisque le potentiel de recherche sur les NP est inépuisable, puisque les études *in vitro* à elles seules ne peuvent prédire les interactions qu'effectueront les NP avec leur environnement et puisque les risques pour la santé

reliés aux NP ne peuvent être associés à des groupes ou des familles de NP, il est impératif d'étudier les effets des NP déjà abondamment utilisées dans nos applications, comme le sont déjà les NP étudiées ici. La priorité devra être accordée à l'étude des effets des NP sur le processus inflammatoire des travailleurs, du personnel ou encore des consommateurs directement exposés aux NP en circulation. Il serait donc judicieux de poursuivre cette avenue et d'assembler une cohorte de personnes susceptibles d'avoir été exposées aux NP, pour faire suite à cette étude, tout en continuant à effectuer la démarche schématisée sur la figure 3 (W. S. Cho *et al.*, 2010; Roursgaard *et al.*, 2011).

Au cours de cette étude, nous avons appris l'importance d'une caractérisation proche des conditions expérimentales ainsi qu'une évaluation de la contamination des NP. En effet, certaines NP étaient fortement contaminées (gélose LB, LAL essai). De plus, chaque changement de condition physicochimique a provoqué des lectures différentes aux TEM, DLS et Zeta Potentiel. Une caractérisation rigoureuse de ces nouvelles substances ainsi qu'une amélioration constante des techniques de caractérisation permettront de déterminer plus rapidement les facteurs causals associés aux effets cellulaires et inflammatoires des NP. Pour les échantillons solides, il est intéressant d'utiliser la technique de microscopie AFM (*atomic force microscopy)* qui contrairement au TEM permet de visualiser les NP sans avoir à créer un vide. Également, en ce qui concerne les techniques de spectroscopie, il est possible d'utiliser la technique NTA (*Nanoparticle tracking analysis*) qui mesure en temps réel les déplacements des NP (au lieu de mesurer l'intensité de la lumière dispersée) ou encore la technique FCS (*fluorescence correlation spectroscopy*) qui peut-être utilisée dans le cas des NP fluorescentes. Ces techniques compléteraient bien l'analyse des particules par le DLS. Toutefois, il faut tenir compte du fait que chacune de ces techniques comporte des inconvénients et des avantages qui leur sont propres. (W. S. Cho *et al.*, 2010; Noel *et al.*, 2012; Wilkinson, 2013).

Les NP sont présentes dans notre environnement depuis toujours. En effet, on peut considérer certaines molécules ou enzymes cellulaires comme des NP (ADN, ribosome, protéasome, certains virus). Plusieurs particules en suspension dans l'air de façon naturelle possèdent des dimensions

nanométriques et étaient appelées des « particules ultra-fines » par les toxicologistes. Il est donc envisageable de penser que le système immunitaire humain est bien équipé pour répondre efficacement aux expositions à ces particules. De plus, il est important de souligner que certains effets pouvant sembler néfastes pour le corps et les cellules des humains pourraient en fait être bénéfiques pour combattre les cellules cancéreuses ou des bactéries pathogènes par exemple. Toutefois, en regard des résultats obtenus, il est évident que les NP testées ont la capacité d'interagir directement avec les cellules et de générer des réponses inflammatoires aigües. Ainsi, en attendant des données supplémentaires, le principe de précaution doit s'appliquer, et il vaut donc mieux éviter l'exposition aux NP, surtout dans un contexte de sécurité au travail. De plus, les particules de petites tailles (≤100nm) et qui gagnent accès à l'intérieur d'un organisme par la voie respiratoire ont plus de chances de posséder les caractéristiques suivantes (que n'ont pas les particules de plus grande taille ≥500nm) : 1- Un ratio d'aire de surface par masse très élevé. 2- Un haut potentiel à s'agréger. 3- Ont tendance à diffuser à travers les tissus au lieu de se déposer par gravité. 4- Un haut potentiel de faire de translocation à travers les membranes cellulaires. 5- Peuvent causer des dommages à des sites autres que celui du point d'entrée (G. Oberdorster, 2010). Ainsi, travailler avec des NP en solution (plutôt que sous forme de poudre) est une bonne pratique à adopter que nous avons toujours suivie au laboratoire. La nanotoxicologie est une science qui en regroupe plusieurs à la fois (chimie, biologie, physique). Pour cette raison, il est important de favoriser la communication et les échanges scientifiques entre les différents acteurs des différentes sphères du domaine des nanosciences. Nous avons entrepris la création d'un regroupement de recherche avec cette philosophie en tête également. Il s'agit du "regroupement de recherche en nanosciences" (ou R^2nanos) qui regroupe au moment de la rédaction de cette thèse environ 70 membres de divers horizons scientifiques (chimistes, ingénieurs, biologistes, épidémiologistes, etc.). Des rencontres entre membres ainsi qu'un partage des connaissances sont régulièrement effectués. C'est un ensemble de connaissances et d'expériences acquises au fil des années que nous avons passées à étudier les NP, que font en sorte que nous sommes en mesure de coordonner un tel regroupement (Buzea *et al.*, 2007; Fadeel, 2012; G. Oberdorster *et al.*, 2007)

Enfin, cette thèse traite de l'effet direct de diverses NP sur l'ensemble des fonctions des neutrophiles humains et aborde des questions de type mode d'action. Nous sommes les premiers à

effectuer une telle étude sur ce type cellulaire. En effet, la plupart des autres équipes de recherche se limitent à effectuer des essais de cytotoxicité et s'intéressent à une ou quelques fonctions cellulaires seulement. De plus, il est très rare de voir des études en nanotoxicologie qui présentent en parallèle des résultats *in vitro* et *in vivo* pour l'étude d'une même NP. Également, il faut souligner qu'au fil du temps, l'approche expérimentale s'est raffinée en ce qui concerne la caractérisation et la contamination des NP. Aussi, sachant que la plupart des nanodrogues seront injectées de façon intramusculaire ou intraveineuse et que ces NP rencontreront d'abord des leucocytes et des cellules endothéliales, le modèle *in vivo* utilisé dans cette thèse présente un énorme avantage par rapport aux modèles d'inhalation et d'ingestion couramment utilisés dans la littérature. Enfin, l'ensemble de la démarche y incluant le modèle simple et éprouvé de la poche d'air, pourrait être considérée comme expériences standards, requises lors de l'évaluation du potentiel pro-inflammatoire (et contrôle de qualité) d'une NP quelconque (D. Girard, 2014; Vandooren *et al.*, 2013). À tout de moins, elles devraient être inclues dans une démarche d'évaluation globale du risque des NP, qui comprendrait alors une batterie de tests *in vitro* sur différents types cellulaires (macrophages, cellules dendritiques, neutrophiles, lymphocytes), et *in vivo*, une analyse des paramètres sanguins (comptes des différents types cellulaires) et des paramètres immunitaires (niveaux d'anticorps, histopathologie des organes immunitaires et le modèle de la poche d'air). Ce projet à long terme nécessitera des expériences additionnelles qui permettront alors de caractériser davantage le potentiel inflammatoire des NP en vue de l'établissement d'une classification détaillée et nuancée de ces dernières, dépendamment de leurs caractéristiques respectives (D. Girard, 2014; Hedenborg, 1988a; Ho *et al.*, 2011; Vandooren *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2009).

RÉRENCES

Adamcakova-Dodd A, Stebounova LV, Kim JS, Vorrink SU, Ault AP, O'Shaughnessy PT, Grassian VH & Thorne PS (2014a) Toxicity assessment of zinc oxide nanoparticles using sub-acute and sub-chronic murine inhalation models. *Particle and fibre toxicology* 11(1):15.

Adamcakova-Dodd A, Stebounova LV, Kim JS, Vorrink SU, Ault AP, PT OS, Grassian VH & Thorne PS (2014b) Toxicity assessment of zinc oxide nanoparticles using sub-acute and sub-chronic murine inhalation models. *Particle and fibre toxicology* 11(1):15.

AFFSET (2008) Les nanomatériaux effets sur la santé de l'homme et sur l'environnement. (Agence Française de sécurité sanitaire de l'environement et du travail (AFSSET)), p 248pp.

Akgul C, Moulding DA & Edwards SW (2001) Molecular control of neutrophil apoptosis. *FEBS letters* 487(3):318-322.

Alves C, de Melo N, Fraceto L, de Araujo D & Napimoga M (2011) Effects of 15d-PGJ(2)-loaded poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanocapsules on inflammation. *British journal of pharmacology* 162(3):623-632.

Appleton I, Brown NJ, Willis D, Colville-Nash PR, Alam C, Brown JR & Willoughby DA (1996) The role of vascular endothelial growth factor in a murine chronic granulomatous tissue air pouch model of angiogenesis. *The Journal of pathology* 180(1):90-94.

Arruda MA, Rossi AG, de Freitas MS, Barja-Fidalgo C & Graca-Souza AV (2004) Heme inhibits human neutrophil apoptosis: involvement of phosphoinositide 3-kinase, MAPK, and NF-kappaB. *J Immunol* 173(3):2023-2030.

Arya A, Sethy NK, Singh SK, Das M & Bhargava K (2013) Cerium oxide nanoparticles protect rodent lungs from hypobaric hypoxia-induced oxidative stress and inflammation. *Int J Nanomedicine* 8:4507-4520.

AVICENN (2013) *Lettre veille nanos n°8/9.* AVICENN, Paris),

Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F & Cogliano V (2006) Carcinogenicity of carbon black, titanium dioxide, and talc. *The lancet oncology* 7(4):295-296.

Babin K, Antoine F, Goncalves DM & Girard D (2013) TiO2, CeO2 and ZnO nanoparticles and modulation of the degranulation process in human neutrophils. *Toxicology letters* 221(1):57-63.

Baker TJ, Tyler CR & Galloway TS (2014) Impacts of metal and metal oxide nanoparticles on marine organisms. *Environ Pollut* 186:257-271.

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 letters* 10(1):59-63.

base de données SCOPUS (2014)), http://www.scopus.com/search/submit/basic.url

Berger M, Sorensen RU, Tosi MF, Dearborn DG & Doring G (1989) Complement receptor expression on neutrophils at an inflammatory site, the Pseudomonas-infected lung in cystic fibrosis. *The Journal of clinical investigation* 84(4):1302-1313.

Bernier MC, El Kirat K, Besse M, Morandat S & Vayssade M (2012) Preosteoblasts and fibroblasts respond differently to anatase titanium dioxide nanoparticles: a cytotoxicity and inflammation study. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* 90:68-74.

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 / [publiee pour l'A.A.I.C.I.G.]* 27(9-10):354-357.

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

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. *European journal of haematology* 51(4):187-198.

Buzea C, Pacheco I & Robbie K (2007) Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases* 2(4):MR17-MR71.

Carlini L & Nadeau JL (2013) Uptake and processing of semiconductor quantum dots in living cells studied by fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM). *Chemical Communications* 49(17):1714-1716.

Castro-Alcaraz S, Miskolci V, Kalasapudi B, Davidson D & Vancurova I (2002) NF-kappa B regulation in human neutrophils by nuclear I kappa B alpha: correlation to apoptosis. *J Immunol* 169(7):3947-3953.

Chan H-T, Kedzierska K, O'Mullane J, Crowe SM & Jaworowski A (2001) Quantifying complement-mediated phagocytosis by human monocyte-derived macrophages. *Immunol Cell Biol* 79(5):429-435.

Chang H, Ho CC, Yang CS, Chang WH, Tsai MH, Tsai HT & Lin P (2013) Involvement of MyD88 in zinc oxide nanoparticle-induced lung inflammation. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie* 65(6):887-896.

Chen JK, Ho CC, Chang H, Lin JF, Yang CS, Tsai MH, Tsai HT & Lin P (2014) Particulate nature of inhaled zinc oxide nanoparticles determines systemic effects and mechanisms of pulmonary inflammation in mice. *Nanotoxicology* 10.3109/17435390.2014.886740.

Cho EJ, Holback H, Liu KC, Abouelmagd SA, Park J & Yeo Y (2013) Nanoparticle characterization: state of the art, challenges, and emerging technologies. *Mol Pharm* 10(6):2093-2110.

Cho WS, Duffin R, Poland CA, Howie SE, MacNee W, Bradley M, Megson IL & Donaldson K (2010) Metal oxide nanoparticles induce unique inflammatory footprints in the lung: important implications for nanoparticle testing. *Environ Health Perspect* 118(12):1699-1706.

Chovatiya R & Medzhitov R (2014) Stress, Inflammation, and Defense of Homeostasis. *Mol Cell* 54(2):281-288.

Colville-Nash PR, Alam CA, Appleton I, Brown JR, Seed MP & Willoughby DA (1995) The pharmacological modulation of angiogenesis in chronic granulomatous inflammation. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 274(3):1463-1472.

Coussens LM & Werb Z (2002) Inflammation and cancer. *Nature* 420(6917):860-867.

da Rosa EL (2013) Kinetic effects of TiO2 fine particles and nanoparticles aggregates on the nanomechanical properties of human neutrophils assessed by force spectroscopy. *BMC Biophys* 6(1):11.
Dellinger A, Zhou Z, Lenk R, MacFarland D & Kepley CL (2009) Fullerene nanomaterials inhibit phorbol myristate acetate-induced inflammation. *Experimental dermatology* 18(12):1079-1081.
Deniaud A, Sharaf el dein O, Maillier E, Poncet D, Kroemer G, Lemaire C & Brenner C (2008) Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. *Oncogene* 27(3):285-299.
Dianzani C, Cavalli R, Zara GP, Gallicchio M, Lombardi G, Gasco MR, Panzanelli P & Fantozzi R (2006) Cholesteryl butyrate solid lipid nanoparticles inhibit adhesion of human neutrophils to endothelial cells. *British journal of pharmacology* 148(5):648-656.
Djordjevic A, Bogdanovic G & Dobric S (2006) Fullerenes in biomedicine. *Journal of B.U.ON. : official journal of the Balkan Union of Oncology* 11(4):391-404.
Dobrovolskaia MA, Neun BW, Clogston JD, Ding H, Ljubimova J & McNeil SE (2010) Ambiguities in applying traditional Limulus amebocyte lysate tests to quantify endotoxin in nanoparticle formulations. *Nanomedicine (Lond)* 5(4):555-562.
Donaldson K, Stone V, Tran CL, Kreyling W & Borm PJ (2004) Nanotoxicology. *Occupational and environmental medicine* 61(9):727-728.
Douglas T & Young M (2006) Viruses: making friends with old foes. *Science* 312(5775):873-875.
Edwards JC, Sedgwick AD & Willoughby DA (1981) The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air: an in vivo tissue culture system. *The Journal of pathology* 134(2):147-156.
Elsaesser A & Howard CV (2012) Toxicology of nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews* 64(2):129-137.
EPA-Nanotechnology-White-Paper (2007) Nanotechnology White Paper. Édit (Epa) USEPAWashington), p 120p.
Fadeel B (2012) Clear and present danger? Engineered nanoparticles and the immune system. *Swiss medical weekly* 142:w13609.
Fatisson J, Quevedo IR, Wilkinson KJ & Tufenkji N (2012) Physicochemical characterization of engineered nanoparticles under physiological conditions: effect of culture media components and particle surface coating. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* 91:198-204.
Faurschou M & Borregaard N (2003) Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 5(14):1317-1327.
Feng D, Nagy JA, Pyne K, Dvorak HF & Dvorak AM (1998) Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP. *The Journal of experimental medicine* 187(6):903-915.
Gadde S, Even-Or O, Kamaly N, Hasija A, Gagnon PG, Adusumilli KH, Erakovic A, Pal AK, Zhang XQ, Kolishetti N, Shi J, Fisher EA & Farokhzad OC (2014) Development of therapeutic polymeric nanoparticles for the resolution of inflammation. *Advanced healthcare materials* 3(9):1448-1456.
Garcia-Ramallo E, Marques T, Prats N, Beleta J, Kunkel SL & Godessart N (2002) Resident cell chemokine expression serves as the major mechanism for leukocyte recruitment during local inflammation. *J Immunol* 169(11):6467-6473.

Gelderman MP, Simakova O, Clogston JD, Patri AK, Siddiqui SF, Vostal AC & Simak J (2008) Adverse effects of fullerenes on endothelial cells: fullerenol C60(OH)24 induced tissue factor and ICAM-I membrane expression and apoptosis in vitro. *Int J Nanomedicine* 3(1):59-68.

Girard D (2007) *Phenotypic and Functional changes of neutrophils activated by recently identified modulators.* Research Signpost, Kerala, India. 134p. p

Girard D (2014) Using the air pouch model for assessing in vivo inflammatory activity of nanoparticles. *Int J Nanomedicine* 9:1105-1107.

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

Girard D, Paquin R, Naccache PH & Beaulieu AD (1996) Effects of interleukin-13 on human neutrophil functions. *J Leukoc Biol* 59(3):412-419.

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

Guillet-Nicolas R, Laprise-Pelletier M, Nair MM, Chevallier P, Lagueux J, Gossuin Y, Laurent S, Kleitz F & Fortin MA (2013) Manganese-impregnated mesoporous silica nanoparticles for signal enhancement in MRI cell labelling studies. *Nanoscale* 5(23):11499-11511.

Gustafsson A, Lindstedt E, Elfsmark LS & Bucht A (2011) Lung exposure of titanium dioxide nanoparticles induces innate immune activation and long-lasting lymphocyte response in the Dark Agouti rat. *J Immunotoxicol* 8(2):111-121.

Han SG, Newsome B & Hennig B (2013) Titanium dioxide nanoparticles increase inflammatory responses in vascular endothelial cells. *Toxicology* 306:1-8.

Hanley C, Layne J, Punnoose A, Reddy KM, Coombs I, Coombs A, Feris K & Wingett D (2008) Preferential killing of cancer cells and activated human T cells using ZnO nanoparticles. *Nanotechnology* 19(29):295103.

Haslett C (1997) Granulocyte apoptosis and inflammatory disease. *British medical bulletin* 53(3):669-683.

Hayashi F, Means TK & Luster AD (2003) Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* 102(7):2660-2669.

Hedenborg M (1988a) Titanium-Dioxide Induced Chemi-Luminescence of Human Polymorphonuclear Leukocytes. *Int Arch Occ Env Hea* 61(1-2):1-6.

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

Heng BC, Zhao X, Tan EC, Khamis N, Assodani A, Xiong S, Ruedl C, Ng KW & Loo JS (2011) Evaluation of the cytotoxic and inflammatory potential of differentially shaped zinc oxide nanoparticles. *Archives of toxicology* 85(12):1517-1528.

Henson PM (2005) Dampening inflammation. *Nat Immunol* 6(12):1179-1181.

Ho M, Wu KY, Chein HM, Chen LC & Cheng TJ (2011) Pulmonary toxicity of inhaled nanoscale and fine zinc oxide particles: mass and surface area as an exposure metric. *Inhal Toxicol* 23(14):947-956.

Hsiao IL & Huang YJ (2013) Effects of serum on cytotoxicity of nano- and micro-sized ZnO particles. *J Nanopart Res* 15:1829.

Huang CC, Aronstam RS, Chen DR & Huang YW (2010) Oxidative stress, calcium homeostasis, and altered gene expression in human lung epithelial cells exposed to ZnO nanoparticles. *Toxicol In Vitro* 24(1):45-55.

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. *Toxicologic pathology* 41(2):395-409.

Hurley JC (1995) Endotoxemia: methods of detection and clinical correlates. *Clinical microbiology reviews* 8(2):268-292.

Indik ZK, Park JG, Hunter S & Schreiber AD (1995) The molecular dissection of Fc gamma receptor mediated phagocytosis. *Blood* 86(12):4389-4399.

International Organisation for Standardization (2008) Nanotechnologies -- Terminology and definitions for nano-objects -- Nanoparticle, nanofibre and nanoplate. Édit Standardization IOF).

Jain S, Thakare VS, Das M, Godugu C, Jain AK, Mathur R, Chuttani K & Mishra AK (2011) Toxicity of multiwalled carbon nanotubes with end defects critically depends on their functionalization density. *Chemical research in toxicology* 24(11):2028-2039.

Jeong SH, Kim HJ, Ryu HJ, Ryu WI, Park YH, Bae HC, Jang YS & Son SW (2013) ZnO nanoparticles induce TNF-alpha expression via ROS-ERK-Egr-1 pathway in human keratinocytes. *Journal of dermatological science* 72(3):263-273.

Jin H, Chen WQ, Tang XW, Chiang LY, Yang CY, Schloss JV & Wu JY (2000) Polyhydroxylated C(60), fullerenols, as glutamate receptor antagonists and neuroprotective agents. *Journal of neuroscience research* 62(4):600-607.

Johnson-Lyles DN, Peifley K, Lockett S, Neun BW, Hansen M, Clogston J, Stern ST & McNeil SE (2010) Fullerenol cytotoxicity in kidney cells is associated with cytoskeleton disruption, autophagic vacuole accumulation, and mitochondrial dysfunction. *Toxicology and applied pharmacology* 248(3):249-258.

Johnston HJ, Hutchison GR, Christensen FM, Peters S, Hankin S & Stone V (2009) Identification of the mechanisms that drive the toxicity of TiO(2)particulates: the contribution of physicochemical characteristics. *Particle and fibre toxicology* 6:33.

Kandlikar M, Ramachandran G, Maynard A, Murdock B & Toscano WA (2007) Health risk assessment for nanoparticles: A case for using expert judgment. *J Nanopart Res* 9(1):137-156.

Kayalar C, Ord T, Testa MP, Zhong LT & Bredesen DE (1996) Cleavage of actin by interleukin 1 beta-converting enzyme to reverse DNase I inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(5):2234-2238.

Klein JB, Rane MJ, Scherzer JA, Coxon PY, Kettritz R, Mathiesen JM, Buridi A & McLeish KR (2000) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor delays neutrophil constitutive apoptosis through phosphoinositide 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase pathways. *J Immunol* 164(8):4286-4291.

Kroemer G, Galluzzi L & Brenner C (2007) Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological reviews* 87(1):99-163.

Kuby J GRA, Osborne B A, Kindt T J (2000) *Immunologie.* W.H. Freeman and Company, New York (NY), 4. 660 p. p

Kumazawa R, Watari F, Takashi N, Tanimura Y, Uo M & Totsuka Y (2002) Effects of Ti ions and particles on neutrophil function and morphology. *Biomaterials* 23(17):3757-3764.

Larsen ST, Roursgaard M, Jensen KA & Nielsen GD (2010) Nano titanium dioxide particles promote allergic sensitization and lung inflammation in mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 106(2):114-117.

Lavigne C, Slater K, Gajanayaka N, Duguay C, Arnau Peyrotte E, Fortier G, Simard M, Kell AJ, Barnes ML & Thierry AR (2013) Influence of lipoplex surface charge on siRNA delivery: application to the in vitro downregulation of CXCR4 HIV-1 co-receptor. *Expert opinion on biological therapy* 13(7):973-985.

Lee VS, Nimmanpipug P, Aruksakunwong O, Promsri S, Sompornpisut P & Hannongbua S (2007) Structural analysis of lead fullerene-based inhibitor bound to human immunodeficiency virus type 1 protease in solution from molecular dynamics simulations. *Journal of molecular graphics & modelling* 26(2):558-570.

Ley K (2002) Integration of inflammatory signals by rolling neutrophils. *Immunol Rev* 186:8-18.

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.

Li HN, Barlow PG, Bylund J, Mackellar A, Bjorstad A, Conlon J, Hiemstra PS, Haslett C, Gray M, Simpson AJ, Rossi AG & Davidson DJ (2009) Secondary necrosis of apoptotic neutrophils induced by the human cathelicidin LL-37 is not proinflammatory to phagocytosing macrophages. *J Leukoc Biol* 86(4):891-902.

Liao CM, Chiang YH & Chio CP (2008) Model-based assessment for human inhalation exposure risk to airborne nano/fine titanium dioxide particles. *The Science of the total environment* 407(1):165-177.

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. *American Journal of Hematology* 83(4):288-295.

Luster AD, Alon R & von Andrian UH (2005) Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol* 6(12):1182-1190.

Ma JY, Zhao H, Mercer RR, Barger M, Rao M, Meighan T, Schwegler-Berry D, Castranova V & Ma JK (2011) Cerium oxide nanoparticle-induced pulmonary inflammation and alveolar macrophage functional change in rats. *Nanotoxicology* 5(3):312-325.

MacWilliams MPL, M-K, (2006) *Luria Broth (LB) and Luria Agar (LA) Media and Their Uses Protocol.*American Society for Microbiology), http://www.microbelibrary.org/component/resource/laboratory-test/3031-luria-broth-lb-and-luria-agar-la-media-and-their-uses-protocol

Maskrey BH, Megson IL, Whitfield PD & Rossi AG (2011) Mechanisms of Resolution of Inflammation: A Focus on Cardiovascular Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 31(5):1001-1006.

Maynard AD (2007) Nanotechnology: the next big thing, or much ado about nothing? *The Annals of occupational hygiene* 51(1):1-12.

Maynard AD, Warheit DB & Philbert MA (2011) The new toxicology of sophisticated materials: nanotoxicology and beyond. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 120 Suppl 1:S109-129.

Mehta V, Pei W, Yang G, Li S, Swamy E, Boster A, Schmalbrock P & Pitt D (2013) Iron is a sensitive biomarker for inflammation in multiple sclerosis lesions. *PLoS One* 8(3):e57573.

Memisoglu-Bilensoy E, Dogan AL & Hincal AA (2006) Cytotoxic evaluation of injectable cyclodextrin nanoparticles. *J Pharm Pharmacol* 58(5):585-589.

Metcalf D, Begley CG, Nicola NA & Johnson GR (1987) Quantitative responsiveness of murine hemopoietic populations in vitro and in vivo to recombinant multi-CSF (IL-3). *Experimental hematology* 15(3):288-295.
Moisan E, Arbour S, Nguyen N, Hebert MJ, Girard D, Bernier J, Fournier M & Kouassi E (2002) Prolongation of human neutrophil survival by low-level mercury via inhibition of spontaneous apoptosis. *Journal of toxicology and environmental health. Part A* 65(2):183-203.
Moller W, Hofer T, Ziesenis A, Karg E & Heyder J (2002) Ultrafine particles cause cytoskeletal dysfunctions in macrophages. *Toxicology and applied pharmacology* 182(3):197-207.
Montiel-Davalos A, Ventura-Gallegos JL, Alfaro-Moreno E, Soria-Castro E, Garcia-Latorre E, Cabanas-Moreno JG, del Pilar Ramos-Godinez M & Lopez-Marure R (2012) TiO(2) nanoparticles induce dysfunction and activation of human endothelial cells. *Chemical research in toxicology* 25(4):920-930.
Mosser DM & Zhang X (2011) Measuring opsonic phagocytosis via Fcgamma receptors and complement receptors on macrophages. *Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al.]* Chapter 14:Unit 14.27.
Muller RH, Maassen S, Weyhers H & Mehnert W (1996) Phagocytic uptake and cytotoxicity of solid lipid nanoparticles (SLN) sterically stabilized with poloxamine 908 and poloxamer 407. *J Drug Target* 4(3):161-170.
Muller WA (2003) Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol* 24(6):327-334.
Muller WA, Weigl SA, Deng X & Phillips DM (1993) PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *The Journal of experimental medicine* 178(2):449-460.
Murdock RC, Braydich-Stolle L, Schrand AM, Schlager JJ & Hussain SM (2008) Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to In vitro exposure using dynamic light scattering technique. *Toxicological Sciences* 101(2):239-253.
Nader D SJ (2013) *Neutrophilia.*), http://emedicine.medscape.com/article/208576-overview (Consulté le august 20th)
Nakamura H, Jun F & Maeda H (2015) Development of next-generation macromolecular drugs based on the EPR effect: challenges and pitfalls. *Expert opinion on drug delivery* 12(1):53-64.
Nanoproject.org (2014) *Consumer Products Inventory - The Project on Emerging Nanotechnologies.* Woodrow Wilson Center,), http://www.nanotechproject.org/cpi/
Nanosight (2014) *Nanoparticle tracking analysis (NTA),.*), http://www.nanosight.com/technology/nanoparticle-tracking-analysis-nta
National Nanotechnology Initiative (2011) Strategic plan - Strategy for Nanotechnology-Related Environnmental, Health, and Safety Research Édit Office NNC (National Science and Technology Council

Arlington, Virginia

), p 52.
Nauseef WM (2007) How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol Rev* 219:88-102.
NIOSH (2005) Evaluation of Health Hazards and Recommendations for Occupational Exposure to Titanium Dioxide.), p 120p.

Noel A, Maghni K, Cloutier Y, Dion C, Wilkinson KJ, Halle S, Tardif R & Truchon G (2012) Effects of inhaled nano-TiO2 aerosols showing two distinct agglomeration states on rat lungs. *Toxicology letters* 214(2):109-119.
Nutt LK, Pataer A, Pahler J, Fang B, Roth J, McConkey DJ & Swisher SG (2002) Bax and Bak promote apoptosis by modulating endoplasmic reticular and mitochondrial Ca2+ stores. *The Journal of biological chemistry* 277(11):9219-9225.
Oberdorster E (2004) Manufactured nanomaterials (fullerenes, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass. *Environ Health Perspect* 112(10):1058-1062.
Oberdorster G (2010) Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. *Journal of internal medicine* 267(1):89-105.
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, Maynard A, Donaldson K, Castranova V, Fitzpatrick J, Ausman K, Carter J, Karn B, Kreyling W, Lai D, Olin S, Monteiro-Riviere N, Warheit D & Yang H (2005a) Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Particle and fibre toxicology* 2:8.
Oberdorster G, Oberdorster E & Oberdorster J (2005b) Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 113(7):823-839.
Oberdorster G, Stone V & Donaldson K (2007) Toxicology of nanoparticles: A historical perspective. *Nanotoxicology* 1(1):2-25.
OCDE (2012) six years of OCDE work on the safety of manufactured nanomaterials.), p 6.
Oh I-h, Min HS, Li L, Tran TH, Lee Y-k, Kwon IC, Choi K, Kim K & Huh KM (2013) Cancer cell-specific photoactivity of pheophorbide a–glycol chitosan nanoparticles for photodynamic therapy in tumor-bearing mice. *Biomaterials* 34(27):6454-6463.
Okuda-Shimazaki J, Takaku S, Kanehira K, Sonezaki S & Taniguchi A (2010) Effects of titanium dioxide nanoparticle aggregate size on gene expression. *International journal of molecular sciences* 11(6):2383-2392.
Osmond MJ & McCall MJ (2010) Zinc oxide nanoparticles in modern sunscreens: an analysis of potential exposure and hazard. *Nanotoxicology* 4(1):15-41.
Ostiguy C (2006) IRSST-Les effets à la santé reliés aux nanoparticules (institut de Recherche Robert-Sauvé en santé et sécurité au travail Montréal), p 55.
Papatheofanis FJ & Barmada R (1991) Polymorphonuclear Leukocyte Degranulation with Exposure to Polymethylmethacrylate Nanoparticles. *J Biomed Mater Res* 25(6):761-771.
Park EJ, Roh J, Kim Y & Park K (2010) Induction of Inflammatory Responses by Carbon Fullerene (C60) in Cultured RAW264.7 Cells and in Intraperitoneally Injected Mice. *Toxicological research* 26(4):267-273.
Park EJ, Yi J, Chung KH, Ryu DY, Choi J & Park K (2008) Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicology letters* 180(3):222-229.
Partha R & Conyers JL (2009) Biomedical applications of functionalized fullerene-based nanomaterials. *Int J Nanomedicine* 4:261-275.
Pelletier M, Bouchard A & Girard D (2004) In vivo and in vitro roles of IL-21 in inflammation. *J Immunol* 173(12):7521-7530.
Pelletier M & Girard D (2005) Interleukin-15 increases neutrophil adhesion onto human respiratory epithelial A549 cells and attracts neutrophils in vivo. *Clinical and experimental immunology* 141(2):315-325.

Pojda Z & Tsuboi A (1990) In vivo effects of human recombinant interleukin 6 on hemopoietic stem and progenitor cells and circulating blood cells in normal mice. *Experimental hematology* 18(9):1034-1037.

Prach M, Stone V & Proudfoot L (2013) Zinc oxide nanoparticles and monocytes: impact of size, charge and solubility on activation status. *Toxicology and applied pharmacology* 266(1):19-26.

Quinn MT & Gauss KA (2004) Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: Comparison with nonphagocyte oxidases. *Journal of Leukocyte Biology* 76(4):760-781.

Rasmussen JW, Martinez E, Louka P & Wingett DG (2010) Zinc oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications. *Expert opinion on drug delivery* 7(9):1063-1077.

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

Ratthe C & Girard D (2004) Interleukin-15 enhances human neutrophil phagocytosis by a Syk-dependent mechanism: importance of the IL-15Ralpha chain. *J Leukoc Biol* 76(1):162-168.

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.

Roduner E (2006) Size matters: why nanomaterials are different. *Chemical Society reviews* 35(7):583-592.

Romoser AA, Figueroa DE, Sooresh A, Scribner K, Chen PL, Porter W, Criscitiello MF & Sayes CM (2012) Distinct immunomodulatory effects of a panel of nanomaterials in human dermal fibroblasts. *Toxicology letters* 210(3):293-301.

Ron D & Walter P (2007) Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature reviews. Molecular cell biology* 8(7):519-529.

Rossi A & Lord JM (2013) Adiponectin inhibits neutrophil apoptosis via activation of AMP kinase, PKB and ERK 1/2 MAP kinase. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 18(12):1469-1480.

Roursgaard M, Jensen KA, Poulsen SS, Jensen NE, Poulsen LK, Hammer M, Nielsen GD & Larsen ST (2011) Acute and subchronic airway inflammation after intratracheal instillation of quartz and titanium dioxide agglomerates in mice. *TheScientificWorldJournal* 11:801-825.

Roursgaard M, Poulsen SS, Kepley CL, Hammer M, Nielsen GD & Larsen ST (2008) Polyhydroxylated C60 fullerene (fullerenol) attenuates neutrophilic lung inflammation in mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 103(4):386-388.

Rydell-Tormanen K, Uller L & Erjefalt JS (2006) Direct evidence of secondary necrosis of neutrophils during intense lung inflammation. *The European respiratory journal* 28(2):268-274.

Saathoff JG, Inman AO, Xia XR, Riviere JE & Monteiro-Riviere NA (2011) In vitro toxicity assessment of three hydroxylated fullerenes in human skin cells. *Toxicol In Vitro* 25(8):2105-2112.

Salvador-Morales C, Flahaut E, Sim E, Sloan J, Green ML & Sim RB (2006) Complement activation and protein adsorption by carbon nanotubes. *Mol Immunol* 43(3):193-201.

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.
Saveyn H, De Baets B, Thas O, Hole P, Smith J & Van der Meeren P (2010) Accurate particle size distribution determination by nanoparticle tracking analysis based on 2-D Brownian dynamics simulation. *J Colloid Interface Sci* 352(2):593-600.
Sayes CM, Wahi R, Kurian PA, Liu Y, West JL, Ausman KD, Warheit DB & Colvin VL (2006) Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 92(1):174-185.
Scheel-Toellner D, Wang K, Craddock R, Webb PR, McGettrick HM, Assi LK, Parkes N, Clough LE, Gulbins E, Salmon M & Lord JM (2004) Reactive oxygen species limit neutrophil life span by activating death receptor signaling. *Blood* 104(8):2557-2564.
Sedgwick AD, Sin YM, Edwards JC & Willoughby DA (1983) Increased inflammatory reactivity in newly formed lining tissue. *The Journal of pathology* 141(4):483-495.
Seely AJE, Pascual JL & Christou NV (2003) Science review: Cell membrane expression (connectivity) regulates neutrophil delivery, function and clearance. *Critical Care* 7(4):291-307.
Segal AW (2005) How neutrophils kill microbes. *Annual review of immunology* 23:197-223.
Selye H (1953) Use of granuloma pouch technic in the study of antiphlogistic corticoids. *Proc Soc Exp Biol Med* 82(2):328-333.
Serhan CNW, P. A. ; Gilroy, D. W. (2010) *Fundamentals of Inflammation.* Cambridge University Press, 1st
Shankar AH & Prasad AS (1998) Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. *Am J Clin Nutr* 68(2 Suppl):447S-463S.
Sharma V, Anderson D & Dhawan A (2012) Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria mediated apoptosis in human liver cells (HepG2). *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 17(8):852-870.
Shvedova AA, Kisin ER, Mercer R, Murray AR, Johnson VJ, Potapovich AI, Tyurina YY, Gorelik O, Arepalli S, Schwegler-Berry D, Hubbs AF, Antonini J, Evans DE, Ku BK, Ramsey D, Maynard A, Kagan VE, Castranova V & Baron P (2005) Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 289(5):L698-708.
Simard JC, Simon MM, Tessier PA & Girard D (2011) Damage-associated molecular pattern S100A9 increases bactericidal activity of human neutrophils by enhancing phagocytosis. *J Immunol* 186(6):3622-3631.
Simon-Vazquez R, Lozano-Fernandez T, Peleteiro-Olmedo M & Gonzalez-Fernandez A (2014) Conformational changes in human plasma proteins induced by metal oxide nanoparticles. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* 113:198-206.
Simon HU (2003) Neutrophil apoptosis pathways and their modifications in inflammation. *Immunological Reviews* 193:101-110.
Smith DM, Simon JK & Baker JR, Jr. (2013) Applications of nanotechnology for immunology. *Nat Rev Immunol* 13(8):592-605.

Smulders S, Kaiser JP, Zuin S, Van Landuyt KL, Golanski L, Vanoirbeek J, Wick P & Hoet PH (2012) Contamination of nanoparticles by endotoxin: evaluation of different test methods. *Particle and fibre toxicology* 9:41.

Sorrentino D (2014) Fibrocytes, inflammation, and fibrosis in Crohn's disease: another piece of the puzzle. *Dig Dis Sci* 59(4):699-701.

Srinivas A, Rao PJ, Selvam G, Murthy PB & Reddy PN (2011) Acute inhalation toxicity of cerium oxide nanoparticles in rats. *Toxicology letters* 205(2):105-115.

Swanson JA & Watts C (1995) Macropinocytosis. *Trends Cell Biol* 5(11):424-428.

Tabet L, Bussy C, Setyan A, Simon-Deckers A, Rossi MJ, Boczkowski J & Lanone S (2011) Coating carbon nanotubes with a polystyrene-based polymer protects against pulmonary toxicity. *Particle and fibre toxicology* 8:3.

Takaki K, Higuchi Y, Hashii M, Ogino C & Shimizu N (2014) Induction of apoptosis associated with chromosomal DNA fragmentation and caspase-3 activation in leukemia L1210 cells by TiO2 nanoparticles. *Journal of bioscience and bioengineering* 117(1):129-133.

Taylor DA (2002) Dust in the wind. *Environ Health Perspect* 110(2):A80-87.

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

Tsou TC, Yeh SC, Tsai FY, Lin HJ, Cheng TJ, Chao HR & Tai LA (2010) Zinc oxide particles induce inflammatory responses in vascular endothelial cells via NF-kappaB signaling. *J Hazard Mater* 183(1-3):182-188.

Vandebriel RJ & De Jong WH (2012) A review of mammalian toxicity of ZnO nanoparticles. *Nanotechnology, Science and Applications* 5(1):61-71.

Vandooren J, Berghmans N, Dillen C, Van Aelst I, Ronsse I, Israel LL, Rosenberger I, Kreuter J, Lellouche JP, Michaeli S, Locatelli E, Franchini MC, Aiertza MK, Sanchez-Abella L, Loinaz I, Edwards DR, Shenkman L & Opdenakker G (2013) Intradermal air pouch leukocytosis as an in vivo test for nanoparticles. *Int J Nanomedicine* 8:4745-4756.

Wang Y, Cui H, Zhou J, Li F, Wang J, Chen M & Liu Q (2014) Cytotoxicity, DNA damage, and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Environmental science and pollution research international* 10.1007/s11356-014-3717-7.

Warheit DB, Webb TR, Sayes CM, Colvin VL & Reed KL (2006) Pulmonary instillation studies with nanoscale TiO2 rods and dots in rats: toxicity is not dependent upon particle size and surface area. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 91(1):227-236.

Webster TJ (2009) *Safety of Nanoparticles: From Manufacturing to medical applications.* Providence (RI), USA. 239p. p

Wilkinson KJ (2013) Emerging issues in ecotoxicology: Characterization of nanoparticles in aqueous media. in *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology* Édit Springer-VerlagBerlin).

Witschger O. FJF (2005) Particules ultra-fines et santé au travail 1. Caractéristiques et effets potentiels sur la santé,. (INRS, Département Métrologie des polluants), p page 27.

Xu JY, Han K, Li SX, Cheng JS, Xu GT, Li WX & Li QN (2009) Pulmonary responses to polyhydroxylated fullerenols, C(60)(OH)(x). *Journal of applied toxicology : JAT* 29(7):578-584.

Yamawaki H & Iwai N (2006) Cytotoxicity of water-soluble fullerene in vascular endothelial cells. *American journal of physiology. Cell physiology* 290(6):C1495-1502.

Ye S, Chen M, Jiang Y, Chen M, Zhou T, Wang Y, Hou Z & Ren L (2014) Polyhydroxylated fullerene attenuates oxidative stress-induced apoptosis via a fortifying Nrf2-regulated cellular antioxidant defence system. *Int J Nanomedicine* 9:2073-2087.

Zhang H, Ji Z, Xia T, Meng H, Low-Kam C, Liu R, Pokhrel S, Lin S, Wang X, Liao YP, Wang M, Li L, Rallo R, Damoiseaux R, Telesca D, Madler L, Cohen Y, Zink JI & Nel AE (2012) Use of metal oxide nanoparticle band gap to develop a predictive paradigm for oxidative stress and acute pulmonary inflammation. *ACS nano* 6(5):4349-4368.

Zhang X, Chibli H, Mielke R & Nadeau J (2011) Ultrasmall gold-doxorubicin conjugates rapidly kill apoptosis-resistant cancer cells. *Bioconjugate chemistry* 22(2):235-243.

Zhang Z, Cherryholmes G & Shively JE (2008) Neutrophil secondary necrosis is induced by LL-37 derived from cathelicidin. *J Leukoc Biol* 84(3):780-788.

Zhao Y, Howe JL, Yu Z, Leong DT, Chu JJ, Loo JS & Ng KW (2013) Exposure to titanium dioxide nanoparticles induces autophagy in primary human keratinocytes. *Small* 9(3):387-392.

Zhu Y, Li WX, Li QN, Li YG, Li YF, Zhang XY & Huang Q (2009) Effects of serum proteins on intracellular uptake and cytotoxicity of carbon nanoparticles. *Carbon* 47(5):1351-1358.

Zolnik BS, Gonzalez-Fernandez A, Sadrieh N & Dobrovolskaia MA (2010) Nanoparticles and the immune system. *Endocrinology* 151(2):458-465.

ANNEXE

Toxicology in Vitro 24 (2010) 1002–1008

Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology in Vitro

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

Activation of human neutrophils by titanium dioxide (TiO_2) nanoparticles

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

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

ARTICLE INFO

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

Keywords:
Human
Neutrophils
Nanoparticles
TiO_2
Cytokines
Signal transduction

ABSTRACT

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

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

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

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

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

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

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

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

Toxicology Letters 221 (2013) 57–63

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Toxicology Letters

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

TiO_2, CeO_2 and ZnO nanoparticles and modulation of the degranulation process in human neutrophils

Kim Babin, Francis Antoine, David Miguel Goncalves, Denis Girard*

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

HIGHLIGHTS

- Nanoparticles can alter the degranulation process in human neutrophils.
- Nanoparticles modulate cell surface expression of granule markers.
- Nanoparticles induce the release of granule proteins into the external milieu.
- Nanoparticles increase the enzymatic activity of MMP-9.

ARTICLE INFO

Article history:
Received 12 March 2013
Received in revised form 15 May 2013
Accepted 18 May 2013
Available online 30 May 2013

Keywords:
Nanotoxicology
Inflammation
Neutrophils
Degranulation

ABSTRACT

Inflammation is frequently associated with nanoparticle (NP) exposures. Given that excessive polymorphonuclear neutrophil cell degranulation is a common feature of inflammatory disorders, and since these cells are key players in inflammation, we decided to test the hypothesis that NPs could act as modulators of degranulation in human neutrophils. TiO_2, CeO_2 and ZnO NPs slightly down-regulated cell surface expression of the granule marker CD35, but increased CD66b and CD63 expression, as assessed by flow cytometry. In addition, expression of myeloperoxidase, MMP-9 and albumin stored in azurophil, specific/gelatinase and secretrory granules, respectively, was significantly increased in the supernatants of NPs-induced neutrophils when compared to untreated cells. Moreover, NPs were more potent than the classical bacterial tripeptide N-formyl-methionine-leucine-phenylalanine (fMLP) agonist. Finally, TiO_2 and CeO_2 markedly increased the enzymatic activity of MMP-9 released into the supernatant, as assessed by gelatin zymography, while ZnO exerted only a modest effect. We conclude that NPs can differentially affect all steps involved during neutrophil degranulation, namely, cell surface expression of granule markers, liberation of proteins in the supernatants and enzymatic activity. These results are expected to be helpful to understand the toxicity of TiO_2, CeO_2 and ZnO.

© 2013 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Nanoparticles (NPs) are used in a vast array of applications. Research in the field of nanotechnology is currently very active, since that nanomaterials may improve several types of products; thus, it is likely that human exposure to NPs will increase. Already, more than 1000 nanoproducts exist on the market, including personal products (sunscreens, textiles, cosmetics, etc.), household commodities (e.g. components of paints, carpets) food and in medicine (Arora et al., 2012). Therefore, the effect of NPs on human health needs greater attention.

Inflammation is frequently associated with nanoparticle (NP) exposure in a variety of in vivo models. Numerous studies have reported increased number of polymorphonuclear neutrophil cells in lungs and bronchoalveolar lavages (Hussain et al., 2011; Jacobsen et al., 2009; Larsen et al., 2010; Peters et al., 2004; Roursgaard et al., 2010; Sayes et al., 2011; Xu et al., 2009). Despite this, few studies have examined the direct effect of NPs on neutrophils, especially human neutrophils (Abrikossova et al., 2012; Goncalves et al., 2010; Moeller et al., 2012).

Given the importance of neutrophils in inflammation, investigating the ability of NPs to modulate neutrophil functions is an excellent way to evaluate potential nanotoxicity of a given NP. Degranulation is one of the most important functions exert by neutrophils for the defense of an organism against an infection. It consists of a rapid release of potent degradative enzymes and several receptors involved in the recognition and ingestion of pathogens localized in different kinds of granules: azurophil, specific/gelatinase and secretory granules (Borregaard et al., 2001). Several mediators have been shown to induce degranulation in human neutrophils, including formyl-methinonine-leucine-phenylalanine (fMLP), interleukin-8, the anticancer drug arsenic trioxide, myeloid related protein S100A9, etc. (Binet and Girard,

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

0378-4274/$ – see front matter © 2013 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.05.010