

INRS Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

**PROPRIÉTÉS INFLAMMATOIRES DES DENDRIMÈRES
POLYAMIDOAMINES (PAMAM) ET DES NANOPARTICULES D'OR :
ASPECTS IN VITRO ET IN VIVO**

Par
Isabelle Durocher

Mémoire ou thèse présenté(e) pour l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en Biologie

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Mme Géraldine Delbès, PhD
INRS- Centre Armand Frappier Santé
Biotechnologie
Université du Québec

Examineur externe

Mme Caroline Gilbert, PhD
Centre de recherche CHUL
Université Laval

Examineur externe

M. Tamàs Fülöp, M.D., Ph. D.
Département de médecine
Université de Sherbrooke

Directeur de recherche

M. Denis Girard, PhD
INRS- Centre Armand Frappier Santé
Biotechnologie
Université du Québec

REMERCIEMENTS

Je tiens en premier lieu remercier mon directeur de recherche, Denis Girard. Je te remercie pour cette belle atmosphère de travail que tu offres au sein de ton laboratoire. Ce bel esprit d'équipe que tu sais instaurer ainsi que ta passion pour tes projets de recherches créent une atmosphère de travail idéale pour réaliser un projet de doctorat. Je te suis reconnaissante pour la confiance que tu m'as accordée, pour ta disponibilité et pour la liberté que tu m'as accordée afin de réaliser plusieurs autres projets en plus de mon doctorat.

J'aimerais aussi remercier les nombreux collègues que j'ai côtoyés tout au long de mon projet. Merci à Francis Vallières, Jean-Christophe Simard, Rafael de Liz et David Gonçcalves, qui, en plus de rendre la vie au laboratoire joviale et conviviale, ont été des mentors lors de mon arrivée au laboratoire et m'ont donné de précieux conseils. Merci à tous les autres collègues sans qui rien n'aurait été pareil : Claudie Noel, Rafael Silva, Michèle Poirier, Kim Babin, Pascal Chhay, Marion Vanharen, Maxime Murphy, Merve Kulbay, Guillaume Ricaud, Marie-Noelle Séguin Grignon et Mustapha Iddir. Merci à toutes les autres personnes du centre Armand-Frappier que j'ai côtoyé dans de nombreux projets parascolaires ou simplement discuté de science, vous êtes trop nombreux pour tous vous nommer, mais sachez que j'ai apprécié vous rencontrer et que j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler avec vous.

Merci à mon ami Davis et à ma grand-mère Jeannine, chers amis sur qui j'ai toujours pu compter et qui m'ont appuyé et encouragé tout au long de mon parcours. Vos bons mots et votre présence m'ont donné la force nécessaire pour persévérer et terminer ce projet.

RÉSUMÉ

Les nanoparticules (NP) ont gagné en popularité au cours des dernières décennies grâce à leurs propriétés uniques qui leur confèrent de nouveaux avantages pratiques et indispensables dans de multiples applications. Les nanoparticules d'or (AuNP) et les dendrimères poly(amidoamines) (PAMAM) sont des candidats très prometteurs, notamment dans le domaine de la biotechnologie et de la santé, où ils sont convoités pour des fins de diagnostic et de traitements de cancers, ou encore en tant que vecteurs pour solubiliser ou transporter des médicaments ou éléments chimiques de manière plus ciblée dans le corps humain.

En dépit de leurs multiples utilités, quelques études scientifiques rapportent des effets toxiques et indésirables causés par certaines NP, tels que l'inflammation. Pourtant, à ce jour, bien que ces utilisations envisagées des AuNP et des PAMAM impliquent une exposition directe chez l'humain, aucune étude ne s'est intéressée spécifiquement aux impacts de ces NP sur la biologie des neutrophiles, cellules clefs intervenant dans le processus inflammatoire. Le neutrophile est une cellule jouant un rôle essentiel de première ligne de défense de notre système immunitaire. Toutefois, les mécanismes qui contrôlent les fonctions et le nombre de cellules neutrophiles dans le corps se doivent d'être strictement régulés quotidiennement afin d'éviter une réponse amplifiée ou au contraire insuffisante des neutrophiles. En effet, une diminution du nombre de neutrophile peut mener à une incapacité à lutter adéquatement contre les infections. Une réponse amplifiée n'est pas souhaitable non plus, car la réponse rapide et à large spectre du neutrophile est non spécifique, pouvant entraîner des dommages aux cellules de l'hôte également si elle est mal gérée. Cet équilibre peut être perturbé par diverses molécules, dont les NP. L'impact que pourrait avoir les PAMAM et les AuNP sur les neutrophiles pourrait entraîner des conséquences néfastes sur la santé s'ils perturbent l'homéostasie des neutrophiles.

Nos résultats montrent que les PAMAM de génération 0, 1, 2 et 3 (G0, G1, G2 et G3) et les AuNP peuvent altérer la durée de vie et la biologie des neutrophiles humains *in vitro*, en fonction de leur charge (AuNP) ou de la taille de la NP (PAMAM) et des doses testées. Les PAMAM induisent l'apoptose des neutrophiles de manière dose et taille dépendante. Une exposition au PAMAM mène également à une libération des granules MMP9 et de cytokines, ainsi qu'à une augmentation du mouvement des neutrophiles et des taux de phagocytose *in vitro*. Les AuNP chargée négativement ont également augmenté l'apoptose des neutrophiles. Les AuNP chargées positivement et négativement ont toutes deux induits une libération de granules MMP9 ainsi qu'une augmentation du chimiotactisme des neutrophiles, alors que la production de cytokines

est plus marquée pour les AuNP à charge positive. Les PAMAM et les AuNP possèdent tous les deux un potentiel inflammatoire *in vivo*, puisqu'ils ont provoqué une infiltration neutrophilique lors de l'étude via le modèle de la poche d'air murine, accompagnée d'une libération de divers médiateurs inflammatoires comme des cytokines et chimiokines et des métalloprotéinases.

Ce projet de doctorat a permis d'avoir une meilleure compréhension des interactions et des impacts des PAMAM et des AuNP sur les neutrophiles humains et de leur potentiel inflammatoire *in vivo* étudié via un modèle murin. Ceci pourra permettre une utilisation plus éclairée lors de leur utilisation dans les diverses applications.

ABSTRACT

Nanoparticles (NP) have increased in popularity over the past decades thanks to their unique properties which give them new practical advantages that are indispensable in multiple applications. Gold nanoparticles (AuNP) and poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers are very promising molecules, mainly in biotechnology and health field, where they are coveted for diagnostic purposes and cancer treatments, or even as vectors to solubilize or transport drugs or chemicals in targeted way into the human body.

Despite their multiple uses, some scientific studies report toxic and unwanted effects caused by some NP, such as inflammation. However, to date, although these purposes of AuNP and PAMAMs involve direct human exposure, no study has focus on the impacts of these NP on the biology of neutrophils, key cells player involved in inflammation.

Neutrophils are cells that play an essential role in the first line of defense of our immune system. However, the mechanisms which control the functions and the number of neutrophils in the body must be strictly regulated to not amplified or minimise the neutrophils response. Indeed, a decrease in the number of neutrophils can lead to an inability to adequately fight infections. An amplified response is also unwanted, because the rapid, broad-spectrum neutrophil response is nonspecific, which can lead to damage to host cells if inappropriately managed. This balance can be disturbed by various molecules, including NP. The potential impact of PAMAMs and AuNP on neutrophils could lead to adverse health consequences if they disrupt neutrophil homeostasis.

We found that PAMAMs generation 0, 1, 2 and 3 (G0, G1, G2 and G3) and AuNPs can alter the lifespan and the biology of human neutrophils *in vitro*, according to the surface charges (AuNP) or the size of the NP (PAMAM). PAMAMs induce neutrophil apoptosis in a dose- and size-dependent manner. Exposure to PAMAM leads to MMP9 granules and cytokines release, and an increased neutrophil chemotaxis and phagocytosis rate *in vitro*. Negatively charged AuNPs also increased neutrophil apoptosis. Both positively and negatively charged AuNPs induced MMP9 granule release and increased neutrophil chemotaxis; whereas positively charged AuNPs produced more cytokines. Both PAMAMs and AuNPs exhibit inflammatory potential *in vivo*, as they induced neutrophilic infiltration when studied via the murine air pouch model. Increased levels of various inflammatory mediators such as cytokines and chemokines and metalloproteinases were observed.

This PhD project will provide a better understanding of the interactions and impacts of PAMAMs and AuNP on human neutrophils and their inflammatory potential in vivo. This could give a better understanding for the use of NP for various applications.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
RÉSUMÉ	V
ABSTRACT	VII
TABLE DES MATIÈRES	IX
LISTE DES FIGURES	XIII
LISTE DES TABLEAUX	XV
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XVII
INTRODUCTION GENERALE	3
SECTION 1 : REVUE DE LITTÉRATURE	5
CHAPITRE 1 : LES NANOPARTICULES	7
1.1 DEFINITIONS.....	7
1.2 ORIGINE DES NANOPARTICULES	8
1.3 LA MATIÈRE A LA NANOECHELLE	8
1.4 PROPRIÉTÉS DES NANOPARTICULES	10
1.5 FABRICATION DES NANOPARTICULES	12
1.6 NANOTOXICOLOGIE ET EXPOSITION AUX NANOPARTICULES	13
1.7 DENDRIMÈRES PAMAM	19
1.8 NANOPARTICULES D'OR (AUNP)	23
1.9 TOXICITÉ DES DENDRIMÈRES PAMAM ET DES AUNP.....	25
CHAPITRE 2: L'INFLAMMATION	33
2.1 GENERALITES	33
2.2 CELLULES IMPLIQUÉES DANS L'INFLAMMATION	34
2.3 PHASES DE L'INFLAMMATION : INITIATION.....	38
2.4 PHASES DE L'INFLAMMATION : AMPLIFICATION	42
2.5 PHASES DE L'INFLAMMATION : RESOLUTION.....	43
2.6 PHASE AIGÛE VS CHRONIQUE.....	45
2.7 MODELE D'ÉTUDE DE L'INFLAMMATION.....	47
CHAPITRE 3: LE NEUTROPHILE	51
3.1 ORIGINE ET MORPHOLOGIE DU NEUTROPHILE.....	51
3.2 FONCTIONS DU NEUTROPHILE	54
3.2.1 CHIMIOTACTISME ET MOUVEMENT DES NEUTROPHILES	54
3.2.2 PHAGOCYTOSE	57
3.2.3 GRANULOPOÏÈSE ET DEGRANULATION	60

3.2.4 PRODUCTION DE REACTIFS OXYGENES (ROS)	64
3.2.5 PRODUCTION DE CYTOKINES ET LEURS ROLES DANS LA BIOLOGIE DES NEUTROPHILES	65
3.3 MORT DU NEUTROPHILE.....	68
3.3.1 APOPTOSE.....	68
3.3.2 AUTRES MORTS CELLULAIRES	71
MISE EN CONTEXTE, HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE RECHERCHE	73
SECTION 2 : ARTICLES SCIENTIFIQUES	77
CHAPITRE 4: PREMIER ARTICLE	79
IN VIVO PROINFLAMMATORY ACTIVITY OF GENERATIONS 0-3 (G0-G3) POLYAMIDOAMINE (PAMAM) NANOPARTICLES	79
4.1 ABSTRACT	81
4.2 INTRODUCTION.....	81
4.3 MATERIALS AND METHODS.....	82
4.3.1 <i>Dendrimers and other reagents</i>	82
4.3.2 <i>Dendrimer sterility</i>	83
4.3.3 <i>Murine air pouch model</i>	83
4.3.4 <i>Zymography assay</i>	84
4.3.5 <i>Detection of cytokines/chemokines</i>	84
4.3.6 <i>Statistical analysis</i>	84
4.4 RESULTS	85
4.4.1 <i>Dendrimer sterility</i>	85
4.4.2 <i>PAMAM NP induce a neutrophilic inflammation in vivo</i>	86
4.4.3 <i>PAMAM NP treatments increase the gelatinase activity detected in the murine air pouch exudates</i>	87
4.4.4 <i>Increased expression of several analytes, including chemokines, in PAMAM NP-induced murine air pouch fluids</i>	88
4.5 DISCUSSION.....	94
4.6 ACKNOWLEDGMENTS.....	95
4.7 BIBLIOGRAPHIE 1 ^{ER} ARTICLE	96
CHAPITRE 5: DEUXIÈME ARTICLE.....	99
EVALUATION OF THE IN VITRO AND IN VIVO PROINFLAMMATORY ACTIVITIES OF GOLD (+) AND GOLD (-) NANOPARTICLES.....	99
5.1 ABSTRACT	101
5.2 INTRODUCTION.....	101
5.3 MATERIALS AND METHODS.....	102

5.3.1 Nanoparticles.....	102
5.3.2 Size distribution and zeta potential measurements.....	103
5.3.3 Neutrophil isolation.....	103
5.3.4 Cell viability.....	103
5.3.5 Transmission electron microscopy.....	103
5.3.6 Determination of neutrophil apoptosis.....	103
5.3.7 Zymography assay with human neutrophils.....	104
5.3.8 Chemokine detection.....	104
5.3.9 Neutrophil migration.....	104
5.3.10 Murine air pouch model.....	105
5.3.11 Detection of cytokines/chemokines.....	105
5.3.12 Murine IL-6 and CCL3 (MIP-1a) production.....	106
5.3.13 Statistical analysis.....	106
5.4 RESULTS.....	106
5.4.1 Characterization and cellular uptake of the AuNP (+) and AuNP (-).....	106
5.4.2 Activation of human neutrophils by AuNP (+) and AuNP (-) <i>in vitro</i>	106
5.4.3 Proinflammatory effects of AuNP (+) and AuNP (-) <i>in vivo</i>	111
5.5 DISCUSSION.....	116
5.6 ACKNOWLEDGEMENTS.....	118
5.7 BIBLIOGRAPHIE 2 ^E ARTICLE.....	119
CHAPITRE 6 : DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION.....	123
6.1 CARACTÉRISATION DES NP.....	124
6.2 LES AUNP ET LES PAMAM MODULATEURS DE LA BIOLOGIE DES NEUTROPHILES.....	126
6.3 MODULATION DES FONCTIONS DES NEUTROPHILES PAR LES NP <i>IN VITRO</i>	130
6.3.1 Mouvement et chimiotaxie des neutrophiles et libération de médiateurs.....	131
inflammatoires.....	131
6.3.2 Phagocytose.....	133
6.4 LES PAMAM ET LES AUNP INDUISENT UNE INFILTRATION NEUTROPHILIQUE <i>IN VIVO</i>	135
6.5 CONSÉQUENCE DU POTENTIEL INFLAMMATOIRE DES NP.....	138
6.6 LIMITE DES MODÈLES D'ÉTUDE.....	139
6.7 CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	140
BIBLIOGRAPHIE.....	143
ANNEXE I.....	171

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.1 : SCHEMATISATION DE LA CORRELATION ENTRE LA TAILLE ET LA SURFACE SPECIFIQUE	6
FIGURE 1.2 : PRINCIPALES VOIES D'EXPOSITION ET DE DISTRIBUTION DES NP	12
FIGURE 1.3 : SCHEMATISATION D'UN DENDRIMERE PAMAM.....	17
FIGURE 2.1 : SCHEMATISATION DES TROIS PHASES DE L'INFLAMMATION : INITIATION, AMPLIFICATION ET RESOLUTION.....	28
FIGURE 2.2 : SCHEMATISATION SIMPLIFIEE DES PRINCIPALES INTERACTIONS ENTRE LES ACTEURS CLES DE LA REPONSE INFLAMMATOIRE AIGUE.....	30
FIGURE 2.3 : SCHEMATISATION SIMPLIFIEE DES PRINCIPALES COMPOSANTES DE LA REPONSE INFLAMMATOIRE AIGUE.....	35
FIGURE 3.1 : SCHEMATISATION SIMPLIFIEE DE L'HEMATOPOÏESE ET ETAPES DE DIFFERENTIATION DU NEUTROPHILE.....	46
FIGURE 3.2 : PRODUCTION D'ANION SUPEROXYDE PAR LA NADPH OXYDASE	57

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1.1 : PRINCIPAUX PARAMETRE CLASSIQUES ET PHYSICO-CHIMIQUE PARTICULIERS A CONSIDERER LORS DES TESTS DE NANOTOXICOLOGIE.....	13
TABLEAU 1.2 : ÉTUDES IN VIVO ILLUSTRANT CERTAINS EFFETS TOXIQUES DES DENDRIMERES PAMAM... ..	22
TABLEAU 1.3 : ÉTUDES IN VIVO ILLUSTRANT CERTAINS EFFETS TOXIQUES DES AUNP.....	23
TABLEAU 1.4 : ÉTUDES IN VIVO SUR LA BIODISTRIBUTION DES DENDRIMERES PAMAM-NH ₂	28
TABLEAU 1.5 : ÉTUDES IN VIVO SUR LA BIODISTRIBUTION DES AuNP.....	29
TABLEAU 2.1 : PRINCIPALES CELLULES INTERVENANT DANS LA REACTION INFLAMMATOIRE ET LEURS FONCTIONS PRINCIPALES.....	31
TABLEAU 2.2 : EXEMPLES DE PATHOLOGIES OU MALADIES A COMPOSANTE INFLAMMATOIRE.....	40
TABLEAU 3.1 : PRINCIPAUX RECEPTEURS MEMBRANAIRES DU NEUTROPHILE HUMAIN	51
TABLEAU 3.2 : CONSTITUANTS DES GRANULES DU NEUTROPHILE	56
TABLEAU 3.3 : PRINCIPALES FAMILLES DE CYTOKINES ET LEURS EFFETS PHYSIOLOGIQUES	61

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA	Acide arachidonique
ADN	Acide désoxyribonucléique
Akt	Protéine kinase B
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adenosine triphosphate
AuNP	Nanoparticules d'or
Bcl	<i>B-cell lymphoma</i>
CCL	<i>C-C motif chemokine ligand</i>
CCR	<i>C-C chemokine receptor</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
C/EBPs	<i>CCAAT enhancer binding protein family</i>
CL	Concentration létale
COX	Cyclooxygénase
CR	Récepteur du complément
CSF	<i>Colony stimulating factor</i>
CXCL	<i>C-X-C motif ligand</i>
DAMPs	<i>Damage-associated molecular patterns</i>
DHA	Acide docosahexaénoïque
DL50	Dose létale 50
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
DM	Dose maximale
ECAM	<i>Epithelial cell adhesion molecule</i>
EPA	Acide eicosapentaénoïque
ERK	<i>Extracellular signal-regulated protein kinase</i>
FasL	<i>Fas-ligand</i>
Fc	Récepteur de la portion constante des immunoglobulines
FMLf	N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine
GM-CSF	<i>Granulocyte/Macrophage-Colony stimulating factor</i>
Gro- α	<i>Growth-related oncogene-alpha</i>
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i>

IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
Jak	<i>Janus kinase</i>
JAMs	<i>Junctional adhesion molecules</i>
LAMP	<i>Lysosome-associated membrane protein</i>
LFA-1	<i>Lymphocyte function-associated antigen 1; CD18/CD11a</i>
LOX	Lipoxigénases
LPS	Lipopolysaccharide
MAC-1	<i>Macrophage-1 antigen; CD18/CD11b; CR3</i>
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein 1</i>
MDL-1	<i>Myeloid DAP12-associating lectin (receptor)</i>
Mincle	<i>Macrophage-inducible C-type lectin (receptor)</i>
MIP	<i>Macrophage inflammatory protein</i>
MMP	Métalloprotéase de la matrice
MPO	Myéloperoxydase
NADP	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NET	<i>Neutrophil extracellular traps</i>
NK	<i>Natural killer cell; cellule tueuse naturelle</i>
NLR	<i>Nod-like receptor</i>
Nm	Nanomètre
NP	Nanoparticules
OVA	Ovalbumine
PAF	<i>Platelet activating factor</i>
PAMAM	Poly(amidoamines)
PAMPs	<i>Pathogen-associated-molecular patterns</i>
PECAM	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule</i>
PEG	Pégylation;
PI3K	<i>Phosphoinositide 3 kinase</i>
PLGA	<i>Poly(lactic-co-glycolic acid)</i>
PMA	<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
PS	Phosphatidylsérine

PSGL-1	<i>P-selectin glycoprotein ligand 1</i>
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
RANTES	<i>Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted</i>
RE	Réticulum endoplasmique
ROS	Espèce réactive de l'oxygène
Syk	<i>Spleen tyrosine kinase</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TIMP	<i>Tissue inhibitors of metalloproteinase</i>
TLR	Récepteur <i>toll-like</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> , facteur nécrosant des tumeurs
UPR	<i>Unfolded protein response</i>
VAA	<i>Viscum album agglutinin</i>
V-ATPase	<i>Vacuolar-type ATPase</i>
VCAM	<i>Vascular adhesion molecule</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> , facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VLA-4	<i>Very late antigen 4</i> ; CD29/CD49d

INTRODUCTION GENERALE

Les nanosciences ont connu au cours des dernières décennies des avancées considérables, notamment grâce à l'utilisation des nanoparticules (NP), qui permettent de nouvelles approches ou applications d'une panoplie de produits. Les champs d'application impliquant l'utilisation des nanoparticules sont donc chaque jour de plus en plus nombreux, passant du domaine agroalimentaire au nanomatériau de construction, sans oublier le domaine biomédical qui accapare une grande part de ce marché. Conséquemment, ce paroxysme mène à une accentuation de l'exposition humaine, alors que les conséquences d'une telle exposition sont très peu connues.

L'engouement pour les nanoparticules est tel que de nouvelles applications sont constamment découvertes, bien que les effets toxicologiques ou indésirables concernant ces nanoparticules soient très peu connus actuellement. Le nombre d'études toxicologiques consacrées aux impacts réels que pourrait avoir une exposition aux nanoparticules sur les systèmes biologiques humains ou animaux, voire même dans l'environnement, est beaucoup moins volumineux en comparaison avec ceux impliquant des nouvelles utilisations ou de nouvelles applications potentielles de ces NP. L'utilisation des nanoparticules se veut de plus en plus nombreuse, alors que les conséquences ne sont pas complètement comprises, très peu documentées et même méconnues.

Toutefois, une autre optique de la problématique qui est non négligeable est la complexité afin de mener à bien les études biologiques en lien avec les NP. En réalité, malgré les meilleures intentions des créateurs et utilisateurs des nanoparticules, il est très complexe, voire impossible de mesurer tous les paramètres de toxicité à la suite de la création d'un nouveau produit ou d'une nouvelle application. Il est donc primordial de promouvoir et de faire appel aux spécialistes de tous domaines scientifiques (chimistes, biologistes, toxicologues...) afin de rallier les compétences de chacun pour parvenir à une compréhension globale et détaillée concernant les NP.

En fait, l'un des effets toxiques le plus souvent rapportés dans la littérature après une exposition aux nanoparticules est l'inflammation. Plusieurs études témoignent en effet d'inflammation, en conséquence d'une l'exposition à diverses NP. D'autres études focalisent sur l'impact causé sur les neutrophiles lors des processus inflammatoires observés à la suite de l'exposition à différentes NP.

Les neutrophiles sont des cellules clés du système immunitaire inné jouant un rôle crucial dans l'inflammation. Ce sont les leucocytes les plus abondants chez l'humain et ce sont les premières cellules à intervenir pour défendre l'organisme contre de nombreuses menaces. En effet, comme il s'agit d'une cellule pouvant déployer un très grand nombre de mécanismes de défense, et ce, de manière non spécifique, ces cellules permettent une réponse rapide et efficace contre de nombreux envahisseurs. Cependant, étant donné la nature non spécifique de ces réponses menées par le neutrophile, il s'agit également d'une cellule qui doit elle-même être fortement régulée par divers mécanismes cellulaires de notre système immunitaire.

Les fonctions du neutrophile sont en fait des armes très puissantes qui peuvent malheureusement se retourner contre l'hôte si elles ne sont pas bien contrôlées. Le neutrophile peut donc s'avérer être une arme à double tranchant, nécessaire d'un côté pour une bonne protection contre les infections, mais dangereuse pour l'organisme s'il y a une mauvaise régulation ou s'il est suractivé.

On peut alors se questionner sur les causes de dérégulation, sur ce qui peut affecter les neutrophiles. Bien qu'il puisse s'agir de dérégulation interne, par exemple lors de maladies auto-immunes ou d'allergie, elles peuvent aussi être dues à des agents pathogènes, des agents chimiques, mais aussi à l'exposition aux nanoparticules.

L'étude de l'inflammation pour recueillir des informations quant à la toxicologie de molécules est en réalité largement répandue et très pertinente, puisque ces mécanismes peuvent se présenter sous plusieurs formes et être observés autant au niveau moléculaire et cellulaire, et peuvent affecter des organes entiers. Bien que l'inflammation soit à la base un mécanisme de défense normal qui se veut bénéfique pour l'organisme, une dérégulation du processus strictement contrôlé par divers mécanisme peut causer divers dommages.

L'analyse plus en profondeur des effets relatifs à l'inflammation pourrait apporter des pistes de compréhension supplémentaire sur la mécanistique derrière la toxicité de ces molécules et qui a été rapporté dans plusieurs études.

SECTION 1 : REVUE DE LITTERATURE

CHAPITRE 1 : LES NANOPARTICULES

Les nanosciences ont connu au cours des dernières décennies des avancées considérables, notamment grâce à l'utilisation des nanoparticules (NP), qui permettent de nouvelles approches ou applications d'une panoplie de produits. Les NP sont en effet de plus en plus présentes dans notre environnement quotidien et nous y sommes fréquemment exposés, souvent même sans le savoir, puisque les applications les impliquant croissent de manière exponentielle d'année en année.

1.1 Définitions

L'unité de référence du monde nanométrique est le nanomètre. Selon la définition de l'organisation mondiale de normalisation (ISO) et des unités de base du système international, un nanomètre est l'unité de mesure qui représente un ordre de grandeur de 10^{-9} (ISO, 2015). Un nanomètre équivaut donc à un milliardième de mètre.

Dans la littérature, le terme nano-objets est utilisé pour décrire les particules de tailles nanométriques. Ces nano-objets se classifient en trois principales catégories en fonction de leur forme telle que déterminée par l'échelle nanométrique (mais aussi parfois selon leur configuration structurale, leur morphologie, leur forme ou leur fonctionnalité) (ISO, 2015). En effet, un des concepts de base en physique et en chimie des solides est lié au fait que la plupart des propriétés des solides sont dépendants de la microstructure, c'est-à-dire de la composition chimique, de la disposition des atomes et de la taille (une, deux ou trois dimensions) du solide (Gleiter, 2000).

Les nano-objets sont donc différenciés dans un premier temps en fonction de la taille de chacune de leurs dimensions. Lorsqu'un nano-objet a une seule dimension externe à l'échelle nanométrique, on parle de nanoplaque, nano-feuillets ou nano-plats. Pour ceux qui ont deux dimensions nanométriques, de nanofibre, nanotubes, nanofilaments ou nanobâtonnets. Un nano-objet qui a ces trois dimensions externes à l'échelle nanométrique, c'est-à-dire entre 1 et 100nm est une NP (ISO, 2015). Comme le rayon typique d'un atome est de l'ordre de 0,1 nm, une NP peut être constituée de quelques dizaines à plusieurs centaines d'atomes.

Toutefois, il est opportun de mentionner que cette définition est celle la plus reconnue dans la littérature et par les experts, quoiqu'il y ait parfois des exceptions et que l'on fasse référence au terme NP pour des particules plus grandes que 100nm. En effet, comme il s'agit d'une terminologie plutôt récente, le terme NP est parfois utilisé à plusieurs escients et englobe

plusieurs types de particules. Elle peut varier selon de domaine et le champ d'application, et parfois même la définition ou la classification est différente avec un vocabulaire qui est propre à chaque discipline. Malgré qu'il y ait un certain consensus sur la définition d'une NP, il n'y a pas de nomenclature officielle ou universelle afin de créer un vocabulaire unitaire et pour faciliter la communication entre les divers acteurs utilisant les nanotechnologies.

1.2 Origine des nanoparticules

Les nano-objets et les NP proviennent de diverses sources, puisque à la base c'est leur taille qui en fait des nanostructures. Elles peuvent être retrouvées sous diverses formes dans la nature ou être synthétisées via l'activité humaine. Les NP peuvent se présenter sous forme de poudre, de cristaux ou de gel, en de suspension liquide ou dans l'air, etc.

Dans l'environnement, on en retrouve en nature sans ingérence de l'activité humaine. Divers éléments à l'échelle nanométrique en résultent; elles sont surtout issues des activités volcaniques, de la matière colloïdale dans les eaux, des minéraux ou encore issues de l'érosion. On peut aussi penser à diverses molécules biologiques ou à des organismes tels les virus et les bactéries qui sont à l'échelle nanométrique. Toutefois, les NP sont principalement artificielles et sont synthétisées en laboratoires ou en usine afin de profiter de leurs avantages et de les utiliser dans diverses applications. Il n'en demeure pas moins que ces NP se retrouvent également dans l'environnement, soit à cause des résidus de déchets industriels causés lors de leur production, soit directement via leur utilisation dans les diverses applications.

1.3 La matière à la nanoéchelle

Cet engouement pour les NP n'est pas sans raison, puisque d'un point de vue technologique, plusieurs caractéristiques des éléments à cette échelle de grandeur apportent de nouveaux avantages uniques et les rendent fort utiles.

C'est en majeure partie dû au fait qu'à cette échelle de grandeur, la matière acquiert de nouvelles propriétés. D'une part, les forces physiques n'agissent pas de la même manière à cette échelle et les NP sont aussi soumises aux phénomènes de physique quantique (Daniel *et al.*, 2004, Scholl *et al.*, 2012). La force de gravité, par exemple, qui régit les particules de taille conventionnelles, aura un impact négligeable sur certaines NP (Cai *et al.*, 2015). Toutefois, les NP seront aussi affectées par d'autres contraintes comme le sont les molécules plus grandes, tel les forces

électrostatiques, de van der Waals, hydrophobiques ou hydrophiles, les interactions covalentes, les liens hydrogènes, etc. (A. E. Nel *et al.*, 2009, Rodriguez-Quijada *et al.*, 2018).

Un autre facteur fondamental qui explique l'acquisition de nouvelles propriétés est la surface de contact par unité de masse, puisqu'elle augmente lorsque la taille des particules diminue (Baglioni *et al.*, 2015). Les très petites tailles des NP leur donne donc des surfaces spécifiques très grandes. Pour mieux concevoir ce principe, on peut prendre comme exemple un cube de glace, dont chacun des côté mesure 10 cm. Le volume de ce cube de glace est de 1000 cm^3 (10^3), et sa surface spécifique mesure 600 cm^2 ($10\text{cm} \times 10\text{cm} \times 6$ côtés). Si l'on fractionne ce cube de glace en huit partie égales ; alors la surface spécifique de chacun des nouveaux cubes sera de 150 cm^2 ($5\text{cm} \times 5\text{cm} \times 6$ cotés) Pour un volume égal, c'est-à-dire pour la même quantité de glace initiale, la surface spécifique cumulée de tous ces petits cubes sera deux fois plus grande, soit de 1200 cm^2 ($8 \times 150\text{cm}^2 = 1200 \text{ cm}^2$). Ce principe est schématisé dans la **figure 1.1**. Dans le même ordre d'idée, plus la taille de NP est petite, plus le nombre d'atomes de surface va augmenter, et sachant que la réactivité est souvent liée à des propriétés de surface, l'on comprend mieux l'intérêt porté au NP (Zeyons, 2008).

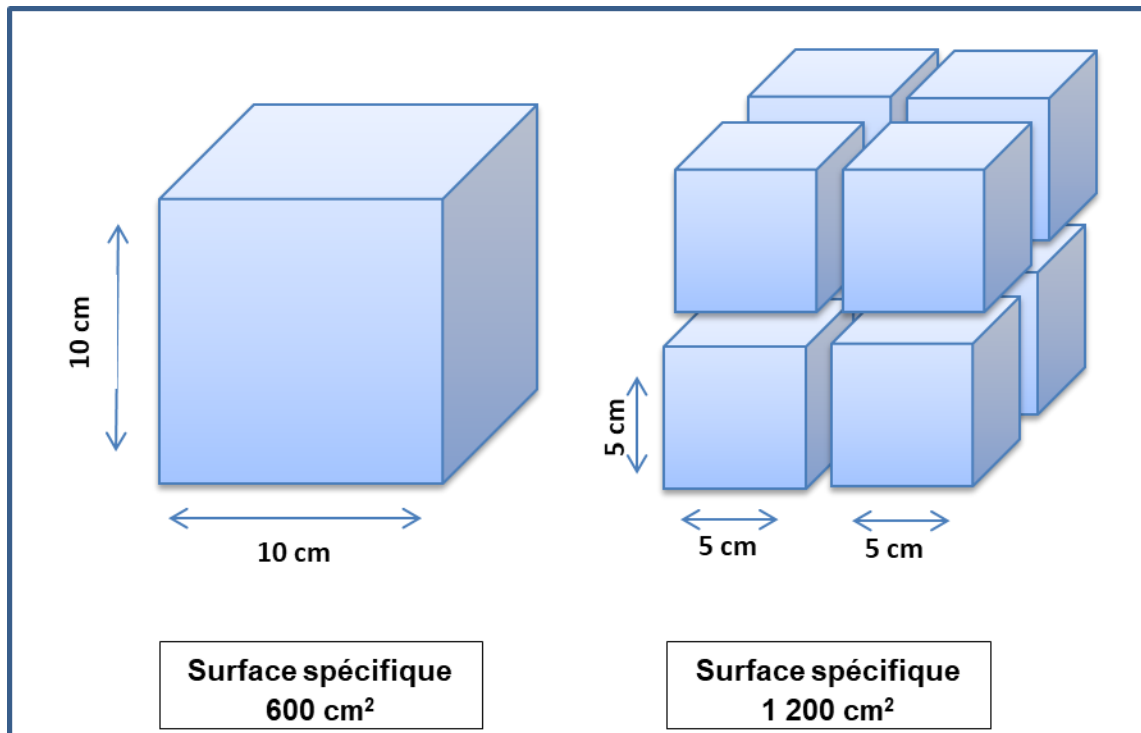


Figure 1.1 : Schématisation de la corrélation entre la taille et la surface spécifique

1.4 Propriétés des Nanoparticules

Un élément verra ces paramètres changés comparativement au même élément de plus grande taille, d'autant plus qu'il est possible de changer une panoplie d'autres facteurs, améliorant ainsi les propriétés de cet élément. Ce n'est donc pas uniquement une question d'échelle de grandeur qui va décrire tous les aspects des NP (Pouran, 2018). Un exemple bien caractérisé pour illustrer la différence de propriété en changeant les paramètres physiques d'un élément est le diamant et le graphite. Bien qu'ils soient composés tous les deux de carbone, ils ont des propriétés bien différentes par le simple réarrangement de leurs atomes (Hirai *et al.*, 1991).

En ce qui a trait au NP, les changements observables vont dépendre des caractéristiques qui sont propre à chaque matériaux ou substances, ce qui va justifier leur utilisation dans les diverses applications. Ces nouvelles propriétés des NP ne sont pas négligeables, car elles permettent une utilisation complètement nouvelle de certains matériaux, qui, à l'échelle conventionnelle, n'avait pas ces usages. Parmi les avantages des NP, on peut noter des changements aux niveaux des propriétés optiques, thermiques, électriques, magnétiques, catalytiques, mécaniques ou encore biologiques, etc. Ces nouvelles propriétés favorisent l'utilisations des NP dans les peintures et les pigments, dans les matériaux de recouvrement, dans les cosmétiques ou encore dans les additif catalytiques (Foss Hansen *et al.*, 2016). Le domaine biomédical accapare une grande part de ce marché parmi tant d'autres, car l'utilisation des NP par exemple dans tout ce qui a trait à la fabrication de machinerie médicale, pour le diagnostic, ou simplement dans des traitements thérapeutiques de toutes sortes pourrait permettre d'améliorer grandement ce domaine et apporter de nouvelles solutions afin d'améliorer les soins de santé (Rudramurthy *et al.*, 2018, R. Singh *et al.*, 2011). Ceci n'est que la pointe de l'iceberg, car les champs d'applications des NP sont nombreux, très diversifié et en constante évolution.

Lorsque l'on pense à l'amélioration au niveau des propriétés optiques, on peut citer les NP de dioxyde de Titane (TiO_2) qui sont utilisées dans les crèmes solaires pour une protection contre les rayons UV. En effet, les NP de TiO_2 de forme anatase et rutile absorbent les rayons UV pour une longueur d'onde située aux alentours de 400nm (Buchalska *et al.*, 2010). Si l'on compare les mécanismes de filtration de la lumière des NP avec les particules micrométriques, ces dernières procurent une protection solaire par réflexion du rayonnement UV, tandis que les NP diffractent et absorbent la lumière, formant une barrière physique stable contre les rayons UV (Dunford *et al.*, 1997). De plus, ces NP ont l'avantage d'être transparentes, car elles ont des interactions réduites avec la lumière visible (400-700 nm), contrairement au TiO_2 micrométrique qui réfléchit la lumière, ce qui laisse un fini blanc inesthétique sur la peau lorsque ajouté dans les crèmes.

D'autres améliorations au niveau des propriétés optiques des NP sont grandement appréciées dans le domaine de l'imagerie médicale. Par exemple, l'imagerie optique a été optimisée grâce à une plus grande sensibilité et une plus grande efficacité des sondes optiques et des sources lumineuses, en particulier en utilisant la région du proche de l'infrarouge (PIR) du spectre lumineux. Bien que des applications optiques utilisant toutes les régions du spectre lumineux existe, celles faisant appel au spectre PIR sont particulièrement utiles pour les études *in vivo* utilisant des modèles animaux, car seuls les photons PIR voyagent à travers les tissus biologiques avec une absorption minimale, ce qui les rend capable d'atteindre des niveaux de tissus plus profonds (Boschi *et al.*, 2017). Alors que les marqueurs moléculaires conventionnels ont souvent comme limitation une faible luminosité en raison de l'auto-extinction, une stabilité photo- et bio-environnementale insuffisante et de petits déplacements des charges, des NP sont de meilleurs candidats. Par exemple, le nitrite d'argent et le d'oxydes de fer très sont efficace pour le diagnostic en tant qu'agents de contraste multimodal (Hsu *et al.*, 2018, Maji *et al.*, 2014, Yu *et al.*, 2014).

Les propriétés électriques peuvent aussi être changées au niveau des NP. Par exemple, les NP de fullerènes peuvent être utilisées dans l'entreposage de données ou encore dans la production de cellules solaires à cause de leur comportement électrique qui est modifié et qui génère des régions dont les propriétés semi-conductrices varient, offrant ainsi la possibilité de les utiliser en nanoélectronique (Dass, 2019, Lan *et al.*, 2017)

L'avantage des nouvelles propriétés catalytique peut être illustré avec l'exemple des NP d'or (AuNP). En effet, alors que l'or de plus grande taille est connu pour être un métal inerte, leur état nanoparticulaire est très réactif et ils peuvent, par exemple, catalyser l'hydrogénation sélective 1,3-butadiène en butène, ou de composés carbonyles insaturé, car lorsque leur taille diminue, elles deviennent des réducteurs puissants (Mitsudome *et al.*, 2013). L'utilisation de catalyseur hétérogène est déterminante spécialement en chimie verte, en raison de ses avantages intrinsèques tels que la séparation du mélange réactionnel et le fait qu'ils sont réutilisables.

Le domaine automobile profite aussi des rendements catalytiques améliorés par l'action des NP de palladium. Les convertisseurs catalytiques ainsi modifiés ont une combustion rapide et efficace des gaz d'échappement des véhicules, ce qui améliore nettement et réduit les niveaux de monoxyde de carbone, d'oxydes d'azote et d'hydrocarbures libérés dans l'atmosphère (Caravaggio *et al.*, 2016).

Enfin, les propriétés des NP d'argent pour des applications en biologie sont fort utiles. Une de leur particularité les plus étudiée est leur pouvoir bactéricide, qui permettent un nouveau genre de

lutte contre les microorganismes (Siegel *et al.*, 2020). Ces NP sont aussi étudiées afin de contribuer à améliorer notamment le domaine alimentaire, comme dans les emballages commerciaux (Amini *et al.*, 2016). Les nanoparticules dendrimères sont des candidats également forts prisés pour les applications en biologie. Ce type de NP pourrait entre autres être utilisé en tant que vecteurs de tous genres afin de transporter des médicaments dans le corps pour toutes sortes de traitements médicaux (Akilesh *et al.*, 2020, B. Srinageshwar *et al.*, 2020, L. Zhu *et al.*, 2020).

Les propriétés uniques des NP sont indispensables dans des domaines aussi variés les uns des autres; bref, on les retrouve partout. Ces exemples ne sont que quelques-uns parmi les milliers autres, et chaque jour on leur trouve de nouvelles applications.

1.5 Fabrication des Nanoparticules

Les modes de fabrications sont très variés et évoquent des techniques qui sont souvent confidentielles au nom du respect du secret industriel ou commercial. De manière générale, elles peuvent être créées par assemblage en partant des atomes, l'approche dite ascendante (*bottom-up*); ou encore, elles sont créées en broyant des matériaux déjà existants, par l'approche descendante (*top-down*).

Parmi les techniques qui sont utilisées, on retrouve principalement des précédés par voies physiques, chimiques ou mécanique. Chaque procédé fait appel à des techniques plus précises, tel l'évaporation de solvants, la nanoprécipitation, la dialyse, la technologie des fluides supercritiques, gravure chimique assistée par un métal, l'émulsification, la diffusion de solvant «salting out», la polymérisation de monomères (émulsion, nano-émulsion, microémulsion, polymérisation interfaciale, polymérisation radicalaire contrôlée), pour ne nommer que ceux-là (Anton *et al.*, 2008, Antonietti *et al.*, 2002, Asua, 2002, Couvreur *et al.*, 2002, Muller *et al.*, 2000). Les outils microfluidiques, qui manipule les fluides à très petite échèle de grandeur (de l'ordre du micromètre) dans des espaces confinés, sont très prometteurs afin d'améliorer la synthèse des NP, car elles permettent de contrôler plusieurs paramètres de la synthèse, ce qui améliore grandement la fabrication des NP (Whitesides, 2006). Lors des processus de nanoprécipitation, le mélange de phase se produit de manière mieux défini, ce qui permet de réduire la taille, améliorer la monodispersité et l'efficacité d'encapsulation des NP, tout en générant un gain de temps, de coût et de matériel (I. U. Khan *et al.*, 2015).

1.6 Nanotoxicologie et exposition aux nanoparticules

Malgré leurs multiples avantages et utilité, il n'en demeure pas moins que les NP ne doivent pas causer d'effets indésirables et toxiques lors de leur utilisation. On doit s'assurer de leur innocuité afin de les utiliser, d'autant plus que la majeure partie des innovations les impliquant mène à une exposition directe avec les systèmes biologiques et environnementaux.

La problématique entourant cette exposition ainsi que les évaluations de ces expositions, de même que les analyses nanotoxicologiques ont suscités beaucoup de questionnements au cours de la dernière décennie.

En fait, une partie de la problématique réside dans le fait que l'engouement pour les NP est tel que de nouvelles applications sont constamment découvertes, bien que les effets toxicologiques ou indésirables concernant ces NP soient très peu connus actuellement. Dans le même ordre d'idée, le nombre d'études toxicologiques consacrées aux impacts réels que pourrait avoir une exposition aux NP sur les systèmes biologiques humains ou animaux, voire même dans l'environnement, est très peu documenté et inférieur en nombre en comparaison avec ceux impliquant des nouvelles utilisations ou de nouvelles applications potentielles de ces NP. L'utilisation des NP se veut de plus en plus grande, alors que les conséquences ne sont pas complètement comprises et même méconnues. L'adaptation des modèles d'études, des méthodes et machinerie doit également être considéré et adaptée pour étudier la nanotoxicologie.

Certaines normes ou lignes directrices sont donc apparues afin de répondre aux besoins nouveau et particulier pour étudier les NP. Des consortiums d'experts ont mis au point différents documents relatant certains besoins ou exigences particulières au NP partout à travers le monde, menant, par exemple, aux lignes directrices relatives aux études des NP de l'ISO, l'*American Society for Testing and Materials* (ASTM), l'*International economic organization* (OECD) (ASTM Standard E2834, 2012; Hackley et al, 2013 ; OECD, 2021 ; ISO, 2010).

Au Canada, certaines lignes directrices ont aussi été créées. Un guide relatif aux NP dans les milieux de travail soumis à la réglementation fédérale est disponible. Ce document a pour but d'aider les spécialistes de la santé et de la sécurité, les employeurs et les employés, à évaluer les expositions aux NP fabriquées, et à mettre en place des mesures de contrôle (Santé-Canada, 2016). Ce rapport intitulé « Nanoparticules fabriquées – aspects liés à la santé et à la sécurité » fait état des principales connaissances sur les NP, des difficultés entourant l'évaluation des risques et la gestion des risques. Le rapport souligne également qu'il n'existe aucun règlement canadien spécifique à l'évaluation et au contrôle des expositions aux NP en 2016, et que, de

manière généralisée, cette lacune en ce qui a trait à la réglementation propre aux NP est constatée un peu partout dans le monde (Santé-Canada, 2016), Ils proposent toutefois des marches à suivre futures et des recommandations basées sur les lignes directrices d'un document préparé par le Conseil de coopération Canada–États-Unis en matière de réglementation, intitulé « Initiative sur la nanotechnologie – Rapport final » (Canada-United States Regulatory Cooperation Council. (2015).

Étant donné que les nanotechnologies sont en constante évolution, il en résulte qu'il est tout de même difficile d'avoir une estimation réelle du nombre de NP utilisées à ce jour ainsi que du nombre exact d'applications les impliquants, car les NP ne sont pas systématiquement répertoriées. L'information quant à la présence des NP dans les divers objets du quotidien n'est pas toujours disponible et les réglementations concernant l'affichage des NP dans les produits varie d'un pays à l'autre, et sont souvent inexistantes ou commencent à peine à être mis en place.

La France est l'un des premiers pays à s'être doté d'un registre des nanomatériaux commercialisés sur son territoire en 2013. Il s'agit de la déclaration annuelle des substances à l'état nanoparticulaire (R-nano.fr, 2021). Elle a permis de mettre en place un registre R-nano, dont les articles L. 523-1 à L. 523-5 du Code de l'environnement français prévoient un dispositif de déclaration qui implique les fabricants, les importateurs et les distributeurs de telles substances mises sur le marché en France. Ils doivent déclarer annuellement leur utilisation, la production, l'importation, la distribution ou la fabrication de toutes substances qui ont un statut de NP. Toutefois, les données recueillies ne sont pas accessibles au public afin de préserver le secret industriel et commercial.

Au Canada, il n'existe pas de registre équivalant à déclaration annuelle des substances à l'état nanoparticulaire. Les NP sont assujetties aux mêmes normes et réglementations que les polymères et substances chimiques (Santé-Canada, 2011). De plus, leur affichage dans les produits sur le marché n'est pas réglementé. Toutefois, une toute nouvelle mise à jour sur l'élaboration de la réglementation des nanomatériaux en vertu de la Loi canadienne sur la protection de l'environnement (LCPE) est disponible sur le site du gouvernement Canadien. Les nouvelles directives pour « la déclaration et les essais de substances nouvelles : substances chimiques et polymères » sont encore à l'étape d'ébauche au moment de publier cette thèse, mais ces nouvelles directives prévoient des conseils pour se conformer aux exigences réglementaires et des instructions détaillées pour compléter une Déclaration de substances nouvelles contenant des NP (Environnement Canada, 2021). Cette nouvelle réglementation devraient, entres autres, aider à déterminer si une substance doit être déclarée et les échéanciers

applicables; contenir des recommandations relatives aux méthodes d'essais acceptable, aux méthodes de rechange ainsi qu'aux demandes de dérogation; expliquer comment le Programme des substances nouvelles évalue les renseignements fournis; décrire les décisions possibles suivant l'évaluation d'une substance nouvelle » (Environnement Canada, 2021). Ceci permettra faire un suivi et de répertorier les nouveaux produits mis sur le marché contenant des NP.

Toutefois, plusieurs produits contenant des NP sont déjà commercialisés. Selon le rapport annuel 2018-2019 de PRIMA QC, il y aurait plus de 340 entreprises au Québec, majoritairement des PME en recherche et développement, œuvrant dans le domaine des nanotechnologies et utilisant des NP (Prima-Québec, 2018-2019). Selon ce même rapport, cette industrie québécoise représenterait un chiffre d'affaires annuel s'élevant à plus de 10 millions de dollars, créant plus de 33 000 emplois. Un rapport de l'IRSST fait quant à lui état de plus de 800 produits contenant des NP qui sont commercialement disponibles (Ostiguy C, 2010). D'autres estiment qu'il y avait, en 2014, plus de 2800 applications basées sur les NP disponibles commercialement au niveau mondial (J. Wang *et al.*, 2014).

De plus, une partie de l'exposition humaine provient de la pollution environnementale. Que ce soit de la pollution directe dans l'atmosphère, dans le sol et les eaux à la suite des déchets rejetés par les usines ou les industries fabricants des NP ; ou indirectement à cause de la dégradation ou de la libération des NP par le biais même de leur utilisation, un grand nombre de NP se retrouve dans l'environnement à cause des activités humaines (Ermolin *et al.*, 2017, Keller *et al.*, 2013, Nowack *et al.*, 2007). Bien qu'elle soit difficile à estimer avec précision, l'exposition humaine aux NP est bel et bien réelle, que ce soit en ce qui a trait aux travailleurs exposés, aux NP dans les produits ou encore via l'exposition par les NP présentes dans l'environnement. Le développement de NP, leur préparation industrielle et leur intégration dans différents produits impliquent déjà une exposition professionnelle potentielle de centaines de travailleurs.

Tout comme les substances toxiques classiques non nanoparticulaires, les NP peuvent entrer dans l'organisme via quatre voies principales : par inhalation (voies respiratoires), par absorption, par ingestion ou par injection et par voie intraveineuse lors de thérapies (**figure 1.2**).

Or, il a été observé que quelles que soient les voies d'exposition (inhalation, ingestion ou contact avec la peau), les NP peuvent être absorbées et rejoindre la circulation sanguine (Monopoli *et al.*, 2012). Certaines études rapportent également la capacité des NP à franchir plusieurs barrières physiologiques plus facilement que les matériaux de taille conventionnelles. Ainsi il a

été démontré que les NP dendrimères peuvent franchir la barrière hémato-encéphalique et la barrière placentaire (Jin *et al.*, 2021, Lei *et al.*, 2017, Menjoge *et al.*, 2011).

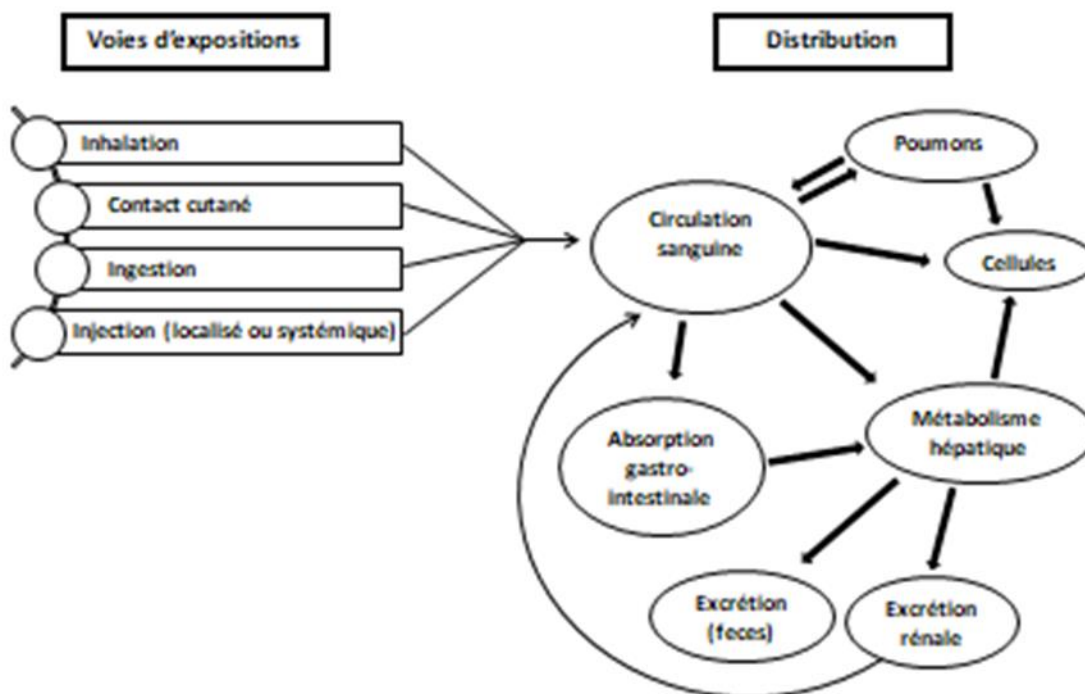


Figure 1.2 : Principales voies d'exposition et de distribution des NP

L'émergence de ces NP a largement remis en question les méthodes et les techniques utilisées pour étudier leur effet toxique (Akçan *et al.*, 2020, Dusinska *et al.*, 2013, Sohal *et al.*, 2018). En effet, il y a beaucoup plus de paramètres à prendre en considération pour évaluer l'impact des NP, sans compter qu'il est parfois difficile de les détecter dans les cellules ou les tissus (Sayes *et al.*, 2009). La complexité de l'étude de l'impact des NP sur les systèmes biologiques requiert une approche différente et multidisciplinaire comparativement aux tests de toxicités conventionnelles utilisées pour les composés chimiques, qui ne tiennent souvent compte que de la dose du composé utilisée en fonction du temps. Ceci est dû aux nombreuses formes que peuvent prendre les NP dans les différentes applications. Les NP pourront en effet présenter des effets toxiques différents en fonctions de tous les paramètres particuliers qui peuvent les composer. Parmi les autres éléments qui doivent être considérés dans l'étude de toxicité des NP, on dénote par exemple des paramètres physicochimiques (stabilité, agrégation, dissolution et état de surface), la taille, la forme, la surface, qui peuvent fortement modifier la toxicité observée sur des cellules (Sayes *et al.*, 2009). Les principaux éléments influençant le comportement des NP sont résumés dans le **tableau 1.1**.

Tableau 1.1 : Principaux paramètres classiques et physico-chimique particuliers à considérer lors des tests de nanotoxicologie.

Paramètre classiques	Paramètres supplémentaires des NP		
Voie d'exposition	Taille	Dimensions	
		Surface spécifique	
Durée d'exposition	Forme	Distribution en taille	
		Forme / aire de surface	
Dose testée	Composition chimique	Composition chimique	
		Pureté / défaut	
		Structure cristalline / niveau de cristallinité	
Cible biologique		Propriétés électrostatique	
		Distribution granulométrique	
Environnement expérimental	Surface	Réactivité de surface (valence et états de conductivité)	
		Fonctionnalité chimique de surface / ligands	
		Recouvrement et composition de surface (organique ou inorganique)	
		Porosité / rugosité	
		Charge / densité de charge / énergie	
	Corona		
	Stabilité physico-chimique		Solubilité / dispersibilité
			Agrégation / agglomération
			Milieu / Acides et bases / sels et ions/ force ionique / pH
			Température
	Interface solide-liquide		
Méthode de synthèse	Traitements pré et post synthèse		

Les mécanismes d'actions qui régissent les NP lorsqu'elles entrent en contact avec des systèmes biologiques sont donc définis par plusieurs particularités propres à chaque NP. Il en résulte qu'il est difficile de prévoir ou d'estimer les effets que pourront causer une NP en particulier, et il n'est pas possible de généraliser les impacts qu'elles pourront avoir simplement en fonction du type de matériel qui la compose.

À titre d'exemple, toutes les NP d'argent n'auront pas les mêmes effets si l'on prend en compte le paramètre de la taille. Une étude a en effet démontré que les NP d'argent peuvent altérer de manière complètement différente la viabilité d'un même type cellulaire seulement en modifiant la taille de cette NP. Ainsi, les NP d'argent de 20nm ont provoquées une mort par apoptose des neutrophiles humains, tandis que les NP d'argent de 70nm ont retardé la mort par apoptose des neutrophiles humains (M. Poirier *et al.*, 2016b). Il ne suffit donc pas d'étudier l'impact des NP d'argents sur une cellule, mais il faut également tenir compte des paramètres particuliers de ces NP d'argents afin d'en tirer des conclusions réalistes. Sans compter que les effets observés peuvent aussi varier d'un type cellulaire à l'autre.

La charge à la surface de la NP est aussi un élément fondamental à prendre en considération, puisqu'il va fortement influencer les réactions biologiques dans le corps humain. Les interactions biologiques médiée par la charge à la surface des NP sont très nombreuses et les multiples interactions avec les protéines ou les cellules peuvent entraîner des répercussions toxiques pour la cellule. Par exemple, si une NP possède une charge positive à sa surface, elle sera plus aisément internalisée par une cellule. Elle pourra aussi interagir avec les protéines plasmatiques et ainsi être opsonisée et internalisée via les processus de phagocytose (Ilinskaya *et al.*, 2016). Les cellules capables de faire la phagocytose, comme les macrophages et les neutrophiles, sont d'ailleurs plus susceptibles d'accumuler des NP. L'un des mécanismes de toxicité potentiel par les NP dans les cellules phagocytaires est la génération d'espèces réactive de l'oxygène, qui peuvent induire des dommages intracellulaires et à l'ADN, et mener à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (Brown *et al.*, 2004, Jeong *et al.*, 2011, R. P. Singh *et al.*, 2012). Toutefois, notons qu'une NP n'est pas uniquement toxique que si elle est internalisée par une cellule ; elle peut également affectée la cellule en interagissant avec les molécules à la surface de cette dernière afin de l'activer et ainsi avoir des répercussions.

D'un autre côté, il est également possible que la corona d'une NP adsorbe des protéines telles que les opsonines, des immunoglobulines, des lamines ou certains facteurs du système du complément, ce qui peut mener à leur élimination plus facile par les macrophages (Almeida *et al.*, 2011). Ceci pourrait entraîner des conséquences dans la biodistribution et l'efficacité de la

NP, qui pourrait être diminuée si elle est utilisée lors d'un traitement quelconque. Au contraire, une NP pourrait être conçue afin de tirer avantage de ce type d'interférence, afin de faciliter leur contact avec un récepteur spécifique qui reconnaît les protéines plasmatiques. Ainsi, la NP pourrait entrer de manière ciblée dans un type cellulaire cible qui exprime ce récepteur pour y exercer son effet (Daniels *et al.*, 2012, Sudimack *et al.*, 2000).

Les études réalisées sur les NP font de plus en plus ressortir la nécessité de prendre en compte le plus d'éléments possible afin de mener une étude adéquate sur les effets des NP. Ceci est d'autant plus crucial lorsque l'on cherche à comparer les résultats de deux études différentes concernant ce qui paraît, à la base, viser la même NP. Ce sont également parfois ces détails qui peuvent expliquer que certaines études présentent des résultats contradictoires concernant la toxicité d'une même NP.

L'étude des effets potentiellement toxiques des NP n'est donc pas simple; il est très complexe de mesurer un ensemble aussi grand de facteurs qui peuvent varier d'une application à une autre. Toutefois, afin que l'on puisse envisager que ces NP soient utilisées dans diverses applications impliquant des systèmes biologiques et qu'elles soient éventuellement utilisées chez l'humain, il faut s'assurer de leur biocompatibilité.

1.7 Dendrimères PAMAM

Parmi les NP les plus prometteuses quant à leur utilisation dans une panoplie de produits ou d'applications, on retrouve en tête de liste les dendrimères. Les dendrimères sont des NP conçues en laboratoires dont la structure rappelle celle des branches d'un arbre. C'est d'ailleurs pour cette raison qu'ils se nomment dendrimères, qui provient des mots grecs « dendron » et « meros », qui se traduisent par arbre et partie respectivement.

Depuis la création du premier dendrimère poly(amidoamines) (PAMAM) dans les années 1980 par Tomalia et son équipe, les applications faisant usage de ces nouvelles nano-molécules se sont multipliées (D. A. Tomalia *et al.*, 1985). Les dendrimères permettent de générer une synthèse de nanostructures avec un contrôle précis, atome par atome, créant des molécules tridimensionnelles avec des formes et des structures chimiques de surface désirés (Stieger *et al.*, 2012).

Les dendrimères sont conçus à partir de trois structures de base, c'est-à-dire qu'ils renferment un cœur central, auquel sont rattachés plusieurs embranchements constitués d'une même séquence répétée, et finalement de molécules terminales à leur périphérie. Les liens covalents

qui relie ces structures en font des NP distincte (D. A. Tomalia, 2016). Chacun de ces constituants de base peut varier, ce qui confère des caractéristiques différentes à chaque type de dendrimères PAMAM. C'est cependant la chimie de ces trois constituants de base qui définit leurs propriétés (Caminade *et al.*, 2015).

Les dendrimères sont aussi classifiés selon des générations, qui représentent le nombre de séquences d'embranchement que le dendrimère contient (Ebelegi *et al.*, 2017). Par exemple, le cœur, une répétition séquence de l'embranchement et la molécule de surface forment un dendrimère de génération 0. Si l'on ajoute à ce dendrimère une répétition de la séquence de l'embranchement à chacun des embranchements existant, on augmente sa génération, de même que son diamètre, et ce, à chaque niveau d'embranchement additionné (C. Zhang *et al.*, 2001). La **figure 1.3** schématise la structure des dendrimères PAMAM qui seront étudiés dans cette thèse.

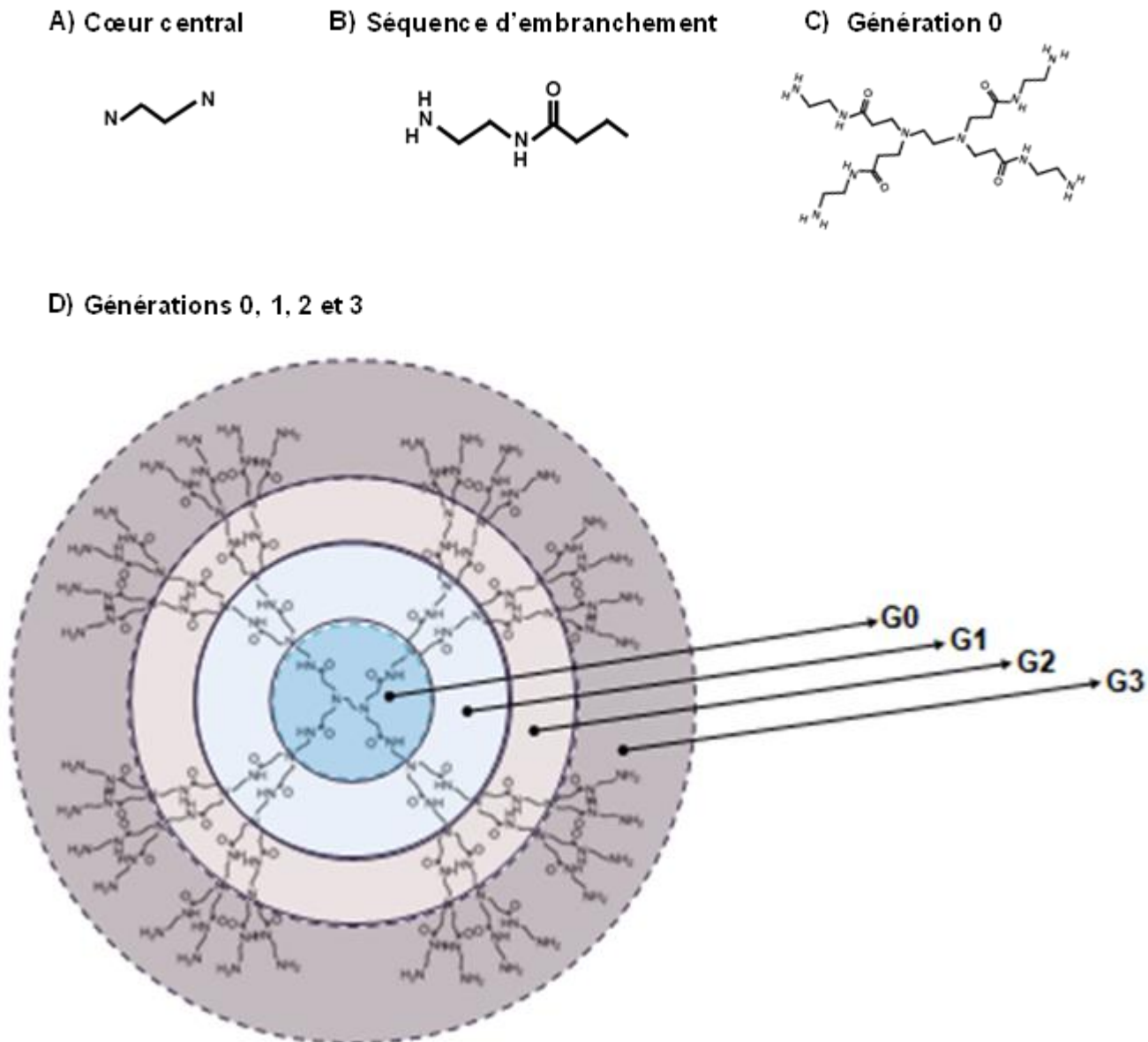


Figure 1.3 : Schématisation d'un dendrimère PAMAM-NH₂.

Les dendrimères PAMAM sont composés d'un cœur d'éthylène diamine (A), d'une séquence d'embranchement contenant des amines secondaires et tertiaires (B) et de molécules terminales de surface sont des groupements NH₂ présentées dans la génération 0 sur le schéma (C). L'addition de séquences d'embranchements fait croître le dendrimère de génération en génération (D).

Basé sur les travaux de (C. Zhang *et al.*, 2001)

Compte tenu du fait que le noyau, les séquences d'embranchement et les molécules de surface des dendrimères peuvent être fonctionnalisés pour s'adapter à diverses applications, plus d'une cinquantaine de familles de dendrimères aux propriétés uniques ont été développées (B. Klajnert *et al.*, 2001). Les dendrimères PAMAM (PAMAM) étudiés dans cette thèse figurent parmi les NP les plus largement utilisées et étudiées (Oberdorster, 2005). Ils possèdent un cœur d'éthylène diamine, contiennent des amines secondaires et tertiaires dans leurs séquence d'embranchement et leurs molécules de surface sont des groupements NH₂ (**figure 1.3**). Les PAMAM sont conçus pour de multiples applications, mais ces NP sont surtout prisées pour les applications dans le domaine biomédical.

Leur structure unique rend possible leur utilisation dans une très grande variété d'application. Ils sont particulièrement utile en tant que vecteurs, car ils peuvent être conjugués à quasiment n'importe quoi, par exemple à des médicaments, à de l'ADN ou de l'ARN, voire même avec d'autres NP; les possibilités sont immenses (Lin-ping Wu *et al.*, 2015). En effet, les branches dans la structure des PAMAM forment des cavités dans lesquelles il est possible d'encapsuler des molécules à transporter. En plus de l'espace créé dans la cavité qui permet de loger et retenir une molécule, les dendrimères PAMAM tirent avantage des interactions électrostatiques, des interactions hydrophobes et des liaisons hydrogènes entre les composés à transporter et la composition de la nanostructure du dendrimère afin d'en faire des vecteurs idéaux (Devarakonda *et al.*, 2004). De plus, la présence de molécules d'azote ou d'oxygène dans les cavités dendritiques renforcent leur interaction avec les molécules à transporter par la formation de liaisons hydrogène (Viswanath *et al.*, 2017). Il est aussi envisageable de conjuguer des molécules à transporter directement sur les molécules de surfaces des PAMAM.

De la sorte, une molécule possédant une faible solubilité pourrait être aisément porté à l'intérieur des cavités des PAMAM, rendant ainsi possible le transport dans le sang, par exemple, d'un médicament qui était à la base hydrophobe (Sanyakamdhorn *et al.*, 2017). Dans le même ordre d'idée, l'encapsulation dans les cavités des PAMAM pourrait optimiser l'utilisation de molécules en proie à la dégradation par des ribonucléases telles que les petits ARN interférents afin de faciliter leur transport au bon endroit où elles pourront exercer leur effet (Kesharwani *et al.*, 2015). Ce type de transport a le potentiel d'augmenter la pharmacocinétique de divers composé, améliorant ou rendant possible leur utilisation dans les applications biomédicales.

Un des nombreux avantages non négligeables que présentent les PAMAM est leur capacité à franchir plusieurs barrières biologiques, comme celle des cellules épithéliales intestinales, la barrière hémato-encéphalique et la barrière placentaire (Hubbard *et al.*, 2015, X. Li *et al.*, 2017,

Menjoge *et al.*, 2011, Bhairavi Srinageshwar *et al.*, 2017, Yan *et al.*, 2017). Cette caractéristique peut s'avérer particulièrement utile pour délivrer des médicaments à des endroits habituellement difficiles d'accès pour la majorité de ces médicaments.

1.8 Nanoparticules d'or (AuNP)

L'or est un métal utilisé depuis longtemps pour des raisons monétaires et esthétiques. Il s'agit d'un métal inoxydable, malléable, conducteur, chimiquement inerte et hypoallergénique, ce qui en fait un matériau prisé pour de nombreuses utilités. Toutefois, comme les autres métaux réduits à la taille de NP, les propriétés de l'or changent lorsqu'il est réduit et cet élément acquiert de nouvelles capacités.

L'étude de l'or à l'échelle nanométrique figure parmi les premières études relatives au NP. Bien que le terme NP n'était pas utilisé à cette époque, les premières expériences concernant les propriétés différentes de l'or à différentes tailles remontent en 1857 par Faraday (Faraday, 1857). Ce scientifique avait établi un lien entre les couleurs obtenues dans les différentes solutions de particules d'or préparées avec des particules d'or de tailles différentes. Comme les microscopes de l'époque n'étaient pas assez puissants pour détecter clairement les NP, Faraday avait simplement noté que l'état de division de ces particules d'or qu'il avait créées devait être extrêmes, car non visible au microscope. Ce n'est qu'un siècle plus tard, suite au développement de microscope électronique, que l'analyse des échantillons d'or préparés par Faraday ont pu être réalisées et ont révélé une distribution des tailles des AuNP variant entre 3nm et 30nm (Henglein, 1985, Thomas, 1988).

Une des caractéristiques uniques des NP d'or (AuNP) est en effet leur comportement optique qui change en fonction de la taille des particules, ce qui signifie que les AuNP de différentes tailles présentent différentes couleurs aux longueurs d'onde visibles. Les très petites AuNP vont apparaître rouges, tandis que la couleur va changer vers un bleu-violet si les AuNP sont plus grandes. Les différentes couleurs seraient attribuables à l'oscillation collective des électrons dans la bande de conduction, connue sous le nom d'oscillation de plasmons de surface, d'une oscillation couplée des ondes électromagnétiques et des électrons libres dans les particules (Kreibig *et al.*, 1995, Liz-Marzán, 2020). Elles acquièrent une capacité d'absorption plasmonique qui varie selon certaines formes et tailles des AuNP. Les AuNP ont aussi des coefficients d'extinction molaires très élevés ($1 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ pour $d = 20 \text{ nm}$ AuNP) par rapport aux colorants organiques courants ($10^4\text{-}10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Jain *et al.*, 2007, X. Liu *et al.*, 2007). Par

conséquent, les AuNP peuvent être considérés en tant que chromophores non moléculaires avec une excellente capacité de collecte de la lumière.

En plus des propriétés optiques, les propriétés électroniques des AuNP sont aussi amplifiées, notamment dues à la proximité de leurs niveaux d'énergie occupés et vacants (confinement quantique)(Schaming, 2018). Cette particularité contraste avec les particules d'or de taille conventionnelle, car à l'échelle nanométrique l'or n'est pas un métal inerte, mais au contraire, lorsque leur taille diminue, elles deviennent des réducteurs puissants, ce qui fait des AuNP des candidates idéales pour la catalyse.

La variation de surface des AuNP sont aussi facile à manipuler, car ces NP ont une chimie de surface bien adaptée à l'attachement de molécule à base de soufre, comme les thiols, mais aussi divers autres ligands tels que les sucres, les peptides ou les protéines peuvent se lier à ces AuNP (Yiping Chen *et al.*, 2017, Sapsford *et al.*, 2013) . Il est également possible de modifier les charges qu'elles ont à leur surface selon l'application désirée.

En somme, ces propriétés particulières font des AuNP d'excellentes molécules pour une très grande variété d'applications. De tels avantages optiques peuvent, par exemple, être fort utiles pour des applications biomédicales. La large fenêtre de longueur d'onde d'absorption des AuNP chevauche les fenêtres proche de l'infrarouge (entre 650nm et 1 800 nm), ce qui permet la photoactivation des AuNP à l'intérieur des tissus (Huang *et al.*, 2008). À titre d'exemple, ceci pourrait permettre d'éliminer des cellules cancéreuses de manière moins dommageable pour l'organisme entier, car la photoactivation des AuNP, qui est provoquée par un rayonnement très précis et localisé à la tumeur, induit une augmentation la température des AuNP et par le même fait celle des cellules cancéreuses qui sont très sensibles aux élévations de température et sont détruites, en ciblant la tumeur pour endommager au minimum les cellules saines avoisinantes (Kennedy *et al.*, 2011, Riley *et al.*, 2017). Une autre façon d'utiliser les AuNP pour traiter les cancers est de les utiliser en tant que vecteurs pour transporter des médicaments anticancéreux (Chandran *et al.*, 2015, Cheng *et al.*, 2008).

Les AuNP peuvent aussi être utilisées comme biosenseurs ou détecteurs biologiques de toute sorte. Comme les AuNP peuvent être conjuguées à pratiquement n'importe quelles molécules, elles peuvent s'adapter à la détection de n'importe quel type d'analytes (J. Li *et al.*, 2020, X. Li *et al.*, 2015, Niu *et al.*, 2013). Avec une augmentation de leur rendement photoluminescent, les AuNP sont beaucoup plus efficaces que les autres molécules plus grosses actuellement utilisées pour faire des marquages cellulaires.

D'autres domaines peuvent tirer avantages des AuNP comme en chimie, pour catalyser des réactions ; en environnement dans les pièces automobiles afin de réduire la pollution; ou encore en électronique, afin de faciliter la miniaturisation. Ces quelques exemples ne sont que quelques-uns parmi tant d'autres et font état des grandes possibilités qu'offrent les AuNP, et la liste augmente d'année en année.

1.9 Toxicité des dendrimères PAMAM et des AuNP

Malgré leurs multiples utilités, peu d'études sont consacrées sur les effets que pourrait avoir de telles molécules sur les systèmes biologiques ou dans l'environnement. L'engouement pour la création de nouvelles applications mettant à profit les nombreux avantages de ces types de NP est largement supérieur aux études réalisées sur leur toxicité potentielle. Un manque de donnée est particulièrement avéré quant aux effets incertains sur la santé humaine, plus particulièrement sur les cellules immunitaires. Les effets des dendrimères PAMAM et des AuNP sur les neutrophiles sont très peu documentés, voire inexistant. Pourtant, aux vues des applications biomédicales envisagées pour ces deux NP, elles vont forcément entrer en contact avec les neutrophiles qui se déplacent partout dans le corps.

Les études actuelles réalisées sur l'impact des NP en général révèlent qu'un des effets secondaires les plus observé suite au contact des NP avec les cellules animales est l'inflammation (Dobrovolskaia *et al.*, 2007, Luo *et al.*, 2015, Andre Nel *et al.*, 2006). Les PAMAM et les AuNP n'y font pas exception, bien que ces études ne soient pas réalisées dans le neutrophile, des travaux montrent leur potentiel inflammatoire et toxique sur divers types cellulaires (Albertazzi *et al.*, 2013, Bastús *et al.*, 2009, Czarnomysy *et al.*, 2019, Falagan-Lotsch *et al.*, 2016, Halets *et al.*, 2013, Maher *et al.*, 2014, Mukherjee *et al.*, 2013, Pan *et al.*, 2009, Patel *et al.*, 2019, Yen *et al.*, 2009). Or, l'impact que pourrait avoir les PAMAM et les AuNP sur les neutrophiles n'est pas documenté.

De plus, les cellules capables de faire la phagocytose, comme les macrophages et les neutrophiles, sont d'ailleurs plus susceptibles d'accumuler des NP que les autres types cellulaires (Hammad *et al.*, 2014). Sachant que ces cellules ont également le potentiel de se déplacer partout dans le corps, cela augmente l'importance d'étudier les effets des NP sur ces types cellulaires, puisque si les NP se retrouvent dans le corps humain elles seront forcément en contact.

Certaines études font aussi état de données toxicologiques *in vivo* des PAMAM et des AuNP qui ont été testées dans divers modèles animaux. Bien que des centaines d'études ont été faites avec diverses formulations ou combinaisons des NP PAMAM ou des AuNP, nous nous sommes

concentrés sur les études répertoriant uniquement les mêmes NP étudiées dans cette thèse, c'est à-dire les PAMAM-Nh2 et les AuNP non conjugués. Les principales études *in vivo* sur les PAMAM-NH2 ainsi que AuNP sont répertoriées dans le **tableau 1.2**, le **tableau 1.3**, le **tableau 1.4** et le **tableau 1.5**

Tableau 1.2 : Études *in vivo* illustrant certains effets toxiques des dendrimères PAMAM-NH2

Paramètre évalué	PAMAM testé	Résultat / Dose	Exposition	Modèle étudié	Référence
DL50	G1 G5	>5000mg/kg	Orale	Rats	(Dendritech, 2015)
DL50	G1 G5	>2000mg/kg	Dermale	Lapin	(Dendritech, 2015)
DL50	G3	2 ppm	Milieu de culture des poissons	Embryons de poisson zèbre	(Pryor <i>et al.</i> , 2014)
DL50	G4	6,4 ppm	Milieu de culture des poissons	Embryons de poisson zèbre	(Pryor <i>et al.</i> , 2014)
DL50	G5	4,5 ppm	Milieu de culture des poissons	Embryons de poisson zèbre	(Pryor <i>et al.</i> , 2014)
DL50	G6	18 ppm	Milieu de culture des poissons	Embryons de poisson zèbre	(Pryor <i>et al.</i> , 2014)
DL50	G5	11,22 µg/g	Intra-trachéale	Souris C57BL/6	(Sun <i>et al.</i> , 2015)
DL50	G2; G3; G4; G5	73,5 mg/kg	Injections intra-péritonéales	Souris BALB/c	(Shahbazia <i>et al.</i> , 2015)
DM tolérée	G3; G4; G5; G6	50 ppm =100% mortalité après 24h post-fertilisation	Milieu de culture des poissons	Embryons de poisson zèbre	(Pryor <i>et al.</i> , 2014)
DM tolérée	G7	10 mg/kg (20 % mort) 30 mg/kg (100 % mort)	Injection intraveineuse	Souris CD-1	(Greish <i>et al.</i> , 2012)
DM tolérée	G4	30 mg/kg (80 % mort)	Injection intraveineuse	Souris CD-1	(Greish <i>et al.</i> , 2012)
DM tolérée	G7	50 mg/kg Cause hémophilie	Orale	Souris CD-1	(Thiagarajan <i>et al.</i> , 2013)
DM tolérée	G4	300 mg/kg	Orale	Souris CD-1	(Thiagarajan <i>et al.</i> , 2013)
Mortalité	G4	19 mg/kg/jour	Injections intra-péritonéales	Souris	(Chauhan <i>et al.</i> , 2010)
Toxicité	G7	Agrégats de protéines sanguines et formation de caillot sanguin	Injection intraveineuse	Embryons de poisson zèbre	(Clinton F. Jones <i>et al.</i> , 2012)
Toxicité	G4; G5; G6; G7	15 µg/g = graves lésions et une insuffisance pulmonaire aiguë	Intra-trachéale	Souris C57BL/6	(Sun <i>et al.</i> , 2015)

Légende : DL50 : Dose létale 50 ; DM : dose maximale. Basé sur une recherche effectuée sur le site de Pubmed avec les mots clés : *PAMAM toxicity in vivo*. Seuls les articles avec les PAMAM-NH2 (non conjugués) sont répertoriés.

Tableau 1.3 : Études *in vivo* illustrant certains effets toxiques des AuNP

Paramètre évalué	NP testé	Résultat/Dose	Exposition	Modèle étudié	Référence
DL50	CH-AuNP 10-50nm	2000 mg/kg	Oral	Rats Wistar Femelles	(Pokharkar <i>et al.</i> , 2009)
DL50	AuNP 1,9 nm	3,2g/kg	Injection intraveineuse	Souris BALB/c	(Hainfeld <i>et al.</i> , 2008)
L50	AuNP 8, 12, 17, 37 nm	8 mg/kg/semaine 50% des souris décédées en ± 21 jours	Injection intra-péritoine	Souris BALB/c Males	(Yu-Shiun Chen <i>et al.</i> , 2009)
Toxicité	AuNP 8, 12, 17, 37 nm	8 mg/kg/semaine Anomalies au foie, poumons et rate	Injection intra-péritoine	Souris BALB/c Males	(Yu-Shiun Chen <i>et al.</i> , 2009)
Toxicité	AuNP-PEG 22.5 nm	4000 µg/kg Augmentation des globules blancs	Injection intra-péritoine	Souris C57 males	(Jie Chen <i>et al.</i> , 2013)
Toxicité	AuNP-PEG 4.4nm 22.5nm 36.1 nm	4000 µg/kg Toxicité au foie et aux reins	Injection intra-péritoine	Souris C57 males	(Jie Chen <i>et al.</i> , 2013)
Toxicité	AuNP 25nm	15ppm ; Altération histopathologique au foie, reins, rate, thymus ; Diminution des taux de lymphocytes ; Augmentation des ARNm IL-6 ; Stress oxydatif	Orale	Poulets	(Hassanen <i>et al.</i> , 2020)
DL50	AuMS 1,4nm	234.1 µM	Milieu de culture des poissons	Embryons de poisson zèbre	(Pan <i>et al.</i> , 2013)
DL	AuMS 1,4nm	400 mM.	Milieu de culture des poissons	Embryons de poisson zèbre	(Pan <i>et al.</i> , 2013)
Toxicité	AuMS 1,4nm	50 mM, hypopigmentation et œdème péri cardial	Milieu de culture des poissons	Embryons de poisson zèbre	(Pan <i>et al.</i> , 2013)
Toxicité	Silice-AuNP-PEG 153nm	± 5 x 10 ¹⁰ particules/mL hémorragie aux poumons et reins, Infiltration de lymphocytes et inflammation	Injection intraveineuse	Souris ICR Femelles	(Huiyu Liu <i>et al.</i> , 2013)
Toxicité	AuNP - PEG 13nm	0.17; 0.85;4.26 mg/kg cause apoptose et inflammation des tissus du foie	Injection intraveineuse	Souris BALB/c Males	(W. S. Cho <i>et al.</i> , 2009b)

Toxicité	Citrate-AuNP 13,5 nm	1100ug/ml Diminution du poids des organes (foie, poumons, rate, reins et cœur)	Orale et injection intra-péritoine	Souris ICR Males	(Xiao-Dong Zhang <i>et al.</i> , 2010)
CL50	AuNP 29.2nm 43.8 nm	24.57 ppm	Milieu de culture des larves	Larves (stade IV) <i>Anopheles stephensi</i>	(Subramania m <i>et al.</i> , 2016)
CL90	AuNP 29.2nm 43.8 nm	59.972 ppm	Milieu de culture des larves	Larves (stade IV) <i>Anopheles stephensi</i>	(Subramania m <i>et al.</i> , 2016)

Légende : DL : dose létale; CH-AuNP : AuNP avec chitosan; AuMS : AuNP + triphenylphosphine monosulfonate; PEG : pégylation; CL : Concentration létale; DL50 : mort de 50% des souris. Basé sur une recherche effectuée sur le site de Pubmed avec les mots clés : *Gold nanoparticle toxicity in vivo*. Seuls les articles avec les AuNP (non conjuguées) sont répertoriées

Tableau 1.4 : Études *in vivo* sur la biodistribution des dendrimères PAMAM-NH2

NP testée	Dose	Détection	Animal	Exposition/ Temps	Résultat	Référence
G3 G4	50000 cpm ; 1– 12 mCi/mg	Iode ¹²⁵	Rats	Injection i.v. (1h) Injection i.p (1h)	i.v et i.v : 0,1-1% sang ; Accumulation élevée dans le foie (60–90% ID/g)	(Malik N <i>et al.</i> , 2000)
G5	8.8 µg	Tritium (³ H)	Souris C57Bl/6J	Injection i.v. 5min 1 h, 1 jour 4 jours 7 jours) 12 semaines	sang : 20 % ID/g; sang : 14,3 % ID/g sang : 1,7 % ID/g sang : 0,3 % ID/g sang : 0,2 % ID/g sang : 0,09 % ID/g	(Nigavekar S <i>et al.</i> , 2004)
G3 G5 G7	0.05 to 0.25 pCi ¹⁴ C (2 à 6x 10 ⁻⁴ mmol/kg	Carbone (¹⁴ C)	Souris Swiss- Webster	Injection 2 h	sang : 0 % ID/g; Faibles accumulations dans les poumons et le cœur, une accumulation modérée dans le foie, la rate et les reins et une accumulation élevée dans le pancréas. G3 : accumulation plus élevée dans les reins (15% ID/g à 48h); G5 : accumulation plus élevée dans le pancréas (32% ID/g à 24h); G7 : accumulation plus élevée dans le pancréas 20% ID/g à 24h); excrétion dans les urines élevé (46 et 74 % DI/g à 2h et 4h)	(Roberts JC <i>et al.</i> , 1996)

Légende : i.v. : intra-veineux ; i.p : intra-péritoine ; h : heure ; min : minutes ; % ID/g : Pourcentage de la dose injectée par gramme

Tableau 1.5 : Études *in vivo* sur la biodistribution des AuNP

NP testée	Dose	Détection	Animal	Exposition/ Temps	Résultat	Référence
AuNP 13nm	20 µg g ⁻¹	INAA, TEM, EDX	Souris	Injection i.p. (3h-4jours)	Accumulation dans le sang, le cerveau, les poumons, le cœur, les reins, la rate, le foie, l'estomac et le petit intestin	(Hillyer et al, 1998).
AuNP 4 nm, 10 nm, 28 nm, 58nm	200 µg mg ⁻¹	INAA, TEM	Souris	Eau <i>ad libitum</i> ; (7jours)	Accumulation dans le sang, le cerveau, les poumons, le cœur, les reins, le foie,	(Hillyer et al, 2001).
AuNP 10 nm, 50 nm, 100nm, 250nm	0.3–0.5 mg g ⁻¹	ICP-MS	Rats Wistar	Injection i.v. (24h) 10nm 50nm 100nm 250nm	≥100ng/g d'organe : poumons, reins, thymus, cœur, cerveau ≥1000ng/g d'organe: sang, foie; rate; ≤100ng/g d'organe : testicules ≥1000ng/g d'organe : sang, foie, rate, poumons ≤100ng/g d'organe : reins, coeur ≥1000ng/g d'organe : sang, foie, rate ≤100ng/g d'organe : poumons, reins ≥100ng/g d'organe : sang ≥1000ng/g d'organe : foie; rate ≤100ng/g d'organe : poumons, reins, testicules, thymus	(De Jong et al, 2008)
AuNP 2 nm, 40 nm	0.6–3.2 µg g ⁻¹	TEM	Souris	Injection i.v. (1 dose, 1,4,2 4h)	Accumulation dans le cerveau, les ganglions lymphatiques, les reins, la rate, le foie, les ovaires et le petit intestin	(Sadauskas et al, 2007)
AuNP 15 nm, 102nm, 198nm	4,72x10 ¹⁸ particules/ml	ICP-MS, EDX	Rats	Diffusion (24h)	Accumulation dans la peau et le petit intestin	(Sonavane et al, 2008)
AuNP 20nm	7,5 .µg/mL	ICP-MS	Rats Wistar	i.v. (1 dose) 24h 1 mois 3 mois 6 mois	Accumulation rapide dans le foie et la rate tout au long de l'étude (2 mois) ; accumulation significative dans les reins et les testicules à partir d'un mois post injection ; Augmentation dans le sang 2 mois après l'injection ; augmentation dans les poumons 1 jour après l'injection et diminution en 1 semaine ; aucune accumulation dans le cerveau	(Balasubramanian et al, 2010)
AuNP 2 nm, 40nm, 100nm	0.6–3 µg	ICP-MS	Souris C57BL	i.t. (24h)	Accumulation dans le foie et les poumons	(Sadauskas et al, 2009a)
AuNP 40nm	500µl à 9 × 10 ¹⁰ particules par ml	ICP-MS	Souris C57BL	i.v. (1 dose) 24h 1 mois 3 mois 6 mois	Accumulation dans le foie jusqu'à 6 mois après une seule dose. Quantité dans le foie (µg) : 18.26 ± 1.5 17.86 ± 0.7 17.4 ± 1.25 16.56 ± 0.94	(Sadauskas et al, 2009b)

Légende : i.v. : intra-veineux ; i.p. : intra-péritone ; i.t. : intratrachéale ; h : heure ; INAA : *Instrumental Neutron Activation Analysis* ; TEM : microscopie électronique en transmission ; EDX : *Energy Dispersive X-ray* ; ICP-MS : Plasma à couplage inductif- spectromètre de masse ;

D'abord, ces études *in vivo* font état de certains paramètres toxiques causés par les PAMAM, et ont estimés entre autres la dose létale 50, les doses maximales tolérées et certaines défaillances des tissus chez divers organismes.

D'après la fiche MSDS de la compagnie Dendritech, l'un des principaux fabricants de PAMAM aux États Unis, les PAMAM auraient une dose létale 50 assez élevée chez les rats (>5000mg/kg), ce qui en fait des molécules peu toxiques. Cependant, il y a d'autres études qui ont révélé une toxicité à des doses beaucoup plus faible, dès 2ppm chez les embryons de poissons zèbres, ou encore 11,22 µg/g chez les souris C57BL/6 ou 73,5 mg/kg chez les Souris BALB/c (Pryor *et al.*, 2014, Shahbazia *et al.*, 2015, Sun *et al.*, 2015). D'autres études parlent de doses maximums tolérées, qui varient entre 30 mg/kg à 50 mg/kg chez les souris CD-1, dépendamment de la voie d'exposition des PAMAM (Greish *et al.*, 2012, Thiagarajan *et al.*, 2013).

Pour les AuNP, les doses létales 50 sont peu documentées. Toutefois, deux études réalisées chez le rat et la souris révèlent des doses létales 50 de 2000 mg/kg et 3,2g/kg respectivement. Cependant, il est difficile de comparer la toxicité de ces deux études, car la taille et le recouvrement des AuNP est différent. Plusieurs effets toxiques sur divers organes sont aussi rapportés dans la littérature par suite d'une exposition aux AuNP (**tableau 1.3**).

Quant à la biodistribution des PAMAM et des AuNP (**tableau 1.4 et tableau 1.5**), les données variées répertoriées dans les divers articles scientifiques sont difficiles à interpréter, car les résultats diffèrent d'une étude à l'autre. Ceci pourrait s'expliquer par les méthodes de détections qui varient, l'espèce étudié qui est différents, la route d'administration utilisées, mais également les propriétés intrinsèques de chacune des NP tels que décrites dans le **tableau 1.1**.

Toutefois, on peut dénoter que les données actuellement présentes font ressortir, en concordance avec plusieurs études *in vitro*, la présence d'inflammation conséquemment à une exposition aux PAMAM et aux AuNP. Malgré cela, le besoin d'étudier d'avantages ces NP dont les mécanismes de toxicité ne sont pas entièrement élucidés est nécessaire, d'autant plus que les résultats varient d'une espèce à l'autre et en fonction du mode d'exposition, du modèle choisi ou même de la génération de PAMAM utilisée ou de la taille des AuNP.

De plus, il faut aussi noter que d'autres études *in vivo* ont été réalisées sans déceler de mortalité parmi les animaux testés. La variabilité des symptômes est mal documentée, et les résultats sont parfois difficiles à interpréter faute de données insuffisante. Par exemple, lors des tests sur les doses maximales tolérées effectués par Greish et ces collègues, ils ont observés une toxicité causé par les PAMAM de génération 4 (30 mg/kg) et de génération 7 (10 mg/kg) qui ont causé la

mort de certaines souris, alors que d'autres souris ne présentaient aucun signe de toxicité après 10 jours suivant l'exposition aux PAMAM (Greish *et al.*, 2012). Les mécanismes de toxicité des NP ne sont pas bien connus et des études supplémentaires à plus grande échelle sont nécessaires pour en comprendre le fonctionnement. Les données scientifiques actuelles ne sont pas suffisantes pour envisager les conséquences d'une utilisation des PAMAM dans les diverses applications pour lesquelles elles sont conçues.

CHAPITRE 2: L'INFLAMMATION

2.1 Généralités

L'inflammation est, à la base, une réponse physiologique normale de l'organisme, consécutive à une agression causant une altération tissulaire (Weill *et al.*, 2003). Somme toute, c'est un mécanisme de défense généré par le système immunitaire et qui a pour objectif principal, lorsque bien régulée, de contenir une menace qui pourrait altérer la santé. Cette réponse physiologique peut être déclenchée par plusieurs facteurs, qu'ils soient biologiques, chimiques, physiques ou même par une défaillance du système immunitaire.

L'ensemble de phénomènes invoqué par ce mécanisme de défense se manifeste cliniquement par divers signes, dont la douleur, la chaleur, la rougeur, l'œdème et la perte de fonction (Rather, 1971). Ces cinq signes cardinaux de l'inflammation sont en fait causés par l'augmentation de l'afflux sanguin local, ce qui permet d'acheminer les leucocytes activés au site d'inflammation. Ceci occasionne un œdème et de la douleur, à cause de la pression exercée par l'enflure, mais également par les divers agents qui sont libérés, telle la bradykinine ou l'histamine, qui contribueront également à la réponse en augmentant la dilatation des vaisseaux sanguins et la perméabilité capillaire (Larsen *et al.*, 1983). Il peut s'ensuivre une perte de fonction, due à l'œdème et de la douleur (Medzhitov, 2008). Néanmoins, le processus s'achève par l'élimination des pathogènes ou du corps étranger ayant provoqué la réponse initiale, de même que par l'élimination des cellules immunitaires ayant migré au site inflammatoire, ce qui permet de rétablir l'homéostasie et de l'état initial du tissu affecté.

Les premières étapes de la réponse inflammatoire sont régies par les mécanismes innés du système immunitaire, et l'inflammation représente un élément indispensable d'une défense rapide et à large spectre contre des menaces éventuelles en tout genre qui pourrait causer des dommages à l'organisme. Elle fait intervenir un ensemble de phénomènes réactionnels et il s'agit d'un processus dynamique qui comporte plusieurs étapes successives et bien coordonnées, afin de contenir la menace initiale et rétablir l'homéostasie.

De plus, peu importe la nature du stimulus qui déclenche le processus inflammatoire, les manifestations de la réponse vont se dérouler en trois phases bien définies, soit l'initiation, l'amplification et la résolution.

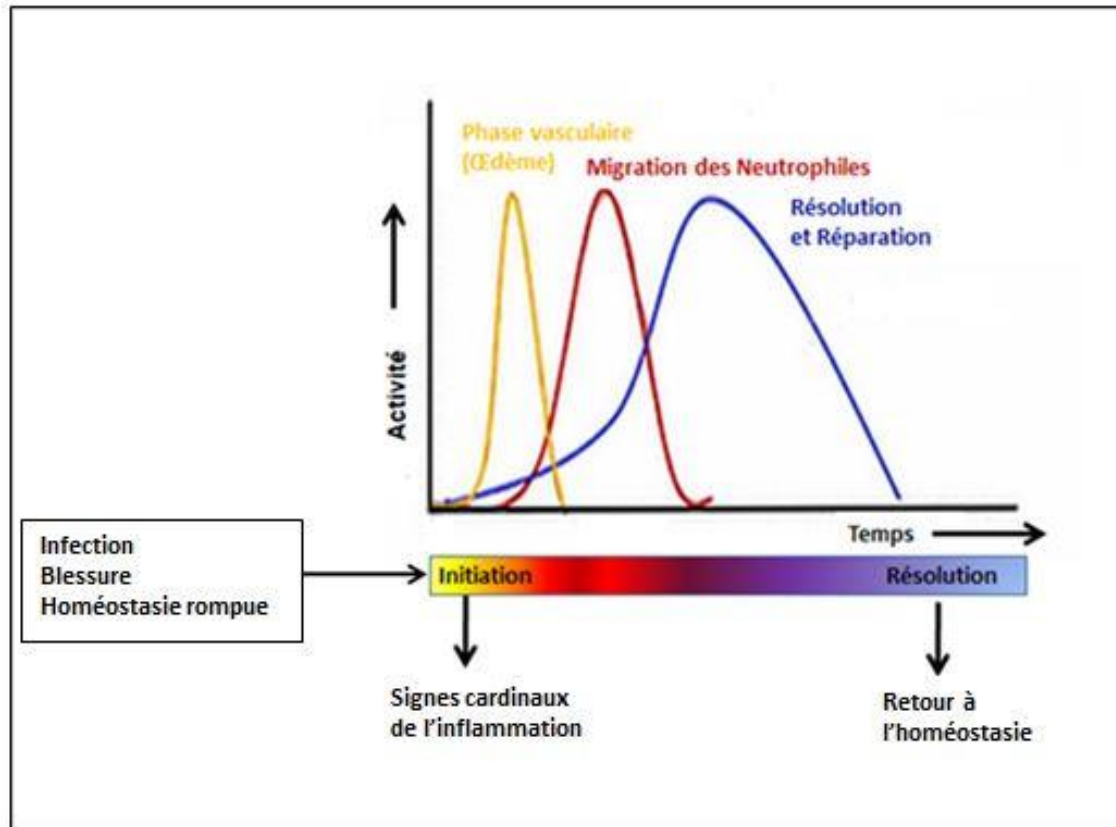


Figure 2.1 : Schématisation des trois phases de l'inflammation : initiation, amplification et résolution (adapté de (Recchiuti *et al.*, 2019))

2.2 Cellules impliquées dans l'inflammation

La réponse inflammatoire est complexe et requiert une panoplie de mécanismes et d'acteurs afin de coordonner une réplique efficace et à large spectre. Plusieurs barrières sont érigées par notre corps afin de mener une défense contre les menaces. Pour se protéger, le corps humain a développé un ensemble à plusieurs niveaux de barrières immunitaires physiques, innées et adaptatives qui agissent en synergie pour limiter les infections et réduire le risque de maladie.

D'abord, les barrières externes physiques et chimiques constituent la première défense contre les envahisseurs afin de limiter leur entrées dans le corps. La peau forme une barrière mécanique solide et imperméable qui protège contre l'infiltration indésirée d'intrus via l'épithélium. Ensuite, la production de diverses sécrétions tel le mucus, les sucs gastriques ou les larmes, ainsi que les

morphologies, particularités et arrangement des cellules, comme les microvillosités, les poils ou les cils contribuent aussi à retenir l'entrées des microbes.

La seconde ligne de défense est interne, et elle fait appel aux diverses cellules immunitaires. Les principales cellules impliquées sont les leucocytes, dont les neutrophiles, les éosinophiles, et les macrophages vont y jouer un rôle primordial. Toutefois, chacune des cellules sanguines ont des spécificités qui leurs sont propres et c'est la coordination et la collaboration de toutes les cellules impliquées dans la réponse inflammatoire qui permettent une réponse efficace. Il faut également mentionner que certaines cellules autres que les leucocytes vont intervenir dans la réponse et dont le rôle n'est pas négligeable. C'est le cas des cellules endothéliales, épithéliales et des fibroblastes, par exemples. Le corps humain possède aussi deux principaux types d'immunité : le système inné et le système acquis. Les deux travaillent en synergie afin de livrer une réponse la plus complète possible à large spectre. Les cellules effectrices de la réponse innée peuvent reconnaître les microbes rapidement afin de débiter la défense le plus vite possible. Il s'agit d'une réponse à large spectre pour détruire une plus grande gamme de menace. La réponse adaptative est plus lente, mais elle sera spécifique et permettra une immunité à plus long terme. Le **tableau 2.1** et la **figure 2.2** présentent un résumé des principales interactions et des rôles entre les acteurs clés de la réponse inflammatoire.

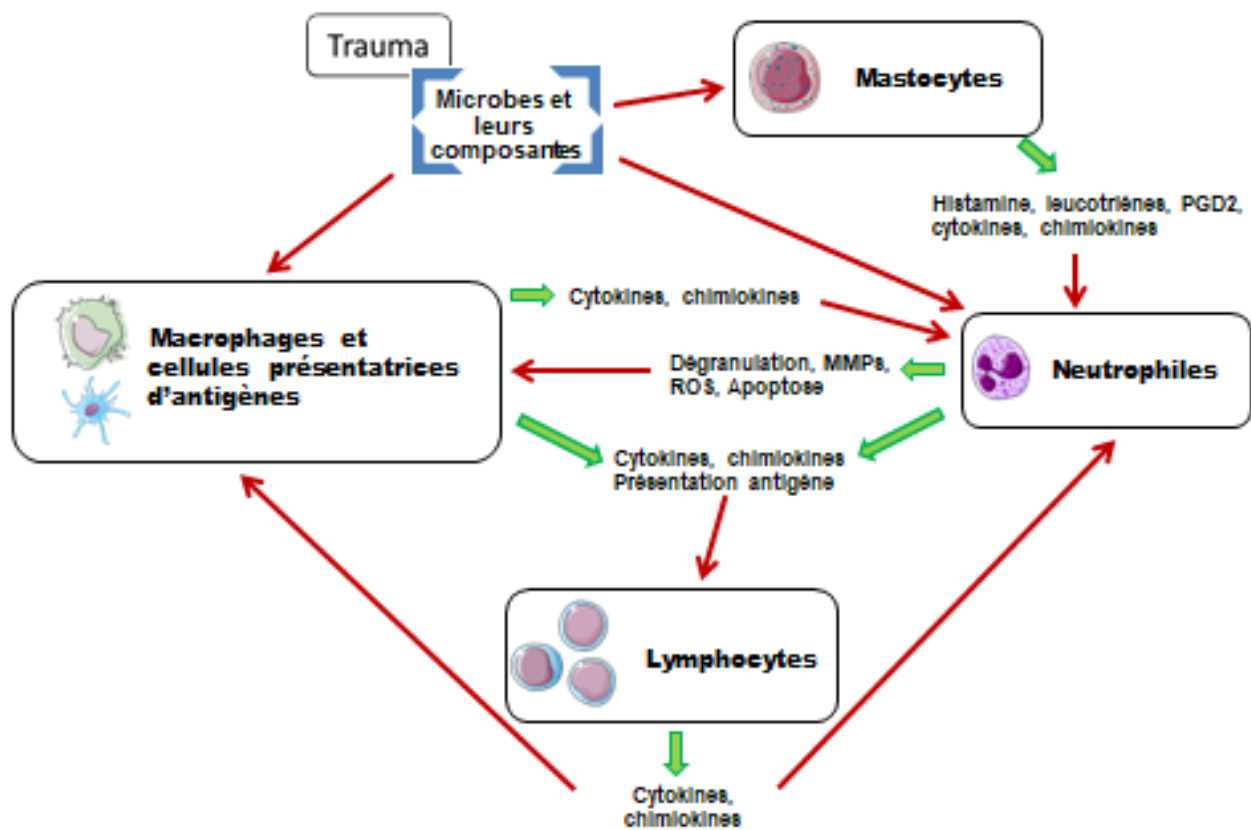


Figure 2.2 : Schématisation simplifiée des principales interactions entre les acteurs clés de la réponse inflammatoire aigue (Adaptée de Nathan 2002)

Tableau 2.1 : Principales cellules intervenant dans la réaction inflammatoire et leurs fonctions principales

Cellules sanguines	Rôle principal dans l'inflammation
Neutrophiles	Défense contre plusieurs types de microorganismes via plusieurs fonctions spécialisées (phagocytose, production de ROS, de NET, de cytokines et chimiokines ou de protéines toxiques). Premiers à migrer au site inflammatoire Production de cytokines et chimiokines Cellules présentatrices d'antigène
Monocytes/Macrophage	Phagocytose des microorganismes Production de cytokines et chimiokines Cellules présentatrices d'antigène Élimination des neutrophiles apoptotiques Cellule sanguine et résidente du tissu
Éosinophiles	Défenses contre plusieurs types de microorganismes (principalement infections parasitaires) Production de cytokines et chimiokines
Basophiles	Production d'histamine
Cellules dendritiques	Cellules présentatrices d'antigène Production de cytokines et chimiokines Cellule sanguine et résidente du tissu
Plaquettes	Contribue à la coagulation; Production du facteur PAF
Lymphocytes/ Plasmocytes	Production de cytokines et chimiokines Destruction de microorganismes Production d'anticorps
Cellules NK	Reconnaissance des cellules dont les molécules du soi sont altérées Destruction de cellules altérées Production de cytokines et chimiokines
Cellules résidentes du tissu	Rôle principal dans l'inflammation aiguë
Mastocytes	Production d'histamine, cytokines et chimiokines
Cellules endothéliales	Production de cytokines et chimiokines

2.3 Phases de l'inflammation : Initiation

La première phase, qui se déclenche dès les premières secondes de la réponse, est une phase qualifiée de vasculaire, car plusieurs changements se produisent au niveau de la circulation sanguine locale (Weill and Batteux, 2003).

Une panoplie de facteurs peut déclencher la réponse inflammatoire, dont les traumatismes mécaniques (brûlure, engelure, coupure, lésions tissulaires, etc.), les agents pathogènes, les agents chimiques (produits chimiques, xénobiotiques, nanoparticules), ou biologiques (bactéries, virus, parasites), la nécrose cellulaire ou elle peut être due à une défaillance du système immunitaire (Boraschi *et al.*, 2017, Chovatiya *et al.*, 2014, Ghezzi *et al.*, 2018). Toutefois, peu importe la nature du stimulus, qu'il soit exogène ou endogène, les manifestations de la réponse inflammatoire seront initiées, avec différents degrés d'intensité en fonction de la menace et des signaux perçus dans l'environnement inflammatoire.

Bien évidemment, les cellules sanguines doivent, dans un premier temps, détecter un signal afin d'entamer leur migration vers un site spécifique. Ces signaux sont principalement transmis par l'entremise des médiateurs inflammatoires (Germolec *et al.*, 2018). Ces derniers peuvent émaner de cellules infectées ou résidentes du tissu, majoritairement des macrophages, des mastocytes et des cellules dendritiques immatures, mais aussi des cellules endothéliales, des fibroblastes et des kératinocytes (Chovatiya *et al.*, 2014); Weill and Batteux, 2003). Les signaux peuvent aussi provenir directement de bactéries ou autres pathogènes et des produits de la cascade du complément (Chovatiya and Medzhitov, 2014; Weill and Batteux, 2003).

Les terminaisons nerveuses vont aussi capter les signaux et provoquer une très brève vasoconstriction artériolaire, sous l'action du système parasympathique, ce qui va perturber la lignée thrombocytaire et activer les plaquettes de la circulation sanguine (Weill and Batteux, 2003). L'importance de l'activation de ces plaquettes n'est pas négligeable, puisqu'elle mène, en plus de son rôle hémostatique, à une formation d'un caillot qui empêche la propagation de l'infection et confine la réponse au site inflammatoire (Weill and Batteux, 2003).

La composition chimique des médiateurs inflammatoires est variée, et ils sont retrouvés, par exemple, sous forme d'amines vasoactives, comme l'histamine, ou encore ce sont des médiateurs lipidiques, comme les leucotriènes et les prostaglandines, des dérivés de l'acide arachidonique (Germolec *et al.*, 2018). Leurs effets viseront alors surtout à augmenter la perméabilité vasculaire, la vasodilatation et ils possèderaient des propriétés chimioattractantes. Les différents médiateurs vont donc être des acteurs clés qui vont influencer la réponse

inflammatoire, et ce, dès le début, mais également tout au long des étapes séquentielles de la réponse inflammatoire (Chovatiya and Medzhitov, 2014).

Une étape primordiale se déroulant dès les premiers instants qui suivent une quelconque agression, est la reconnaissance des signaux de « danger » (i.e. PAMPs (pathogen-associated-molecular patterns) et des DAMPs (damage-associated molecular patterns)) provenant du corps étranger et/ou de la lésion tissulaire (Medzhitov, 2010). Cette reconnaissance va générer l'activation et la libération de d'autres médiateurs inflammatoires, comme les facteurs du complément, des cytokines inflammatoires et chimiokines qui vont amorcer la réponse inflammatoire (Pierce and Pittet, 2014). C'est notamment via la reconnaissance de ces motifs moléculaires de danger par les récepteurs de type Toll (TLR), les récepteurs RIG-1-Like (RLR) et ceux de type Nod (NLR) que les différentes cellules produisent les médiateurs inflammatoires (Pierce and Pittet, 2014). Donc, afin d'orchestrer une réponse prompt et efficace, les différents acteurs intervenants dans la réponse doivent communiquer entre eux et recevoir des signaux de leur environnement afin d'y parvenir.

Les chimiokines et les cytokines sont également des exemples de médiateurs et ils vont jouer un rôle majeur dans la communication entre les différents effecteurs. Elles ont toutefois une action plus spécifique quant à leur mode d'action et pour le recrutement des cellules cibles vers le site inflammatoire (Germolec *et al.*, 2018).

Les chimiokines et les cytokines sont de petites protéines solubles qui influent sur différents processus physiologiques, non seulement dans l'inflammation en général, mais aussi pour des processus allant de l'hématopoïèse à la croissance cellulaire (Schett *et al.*, 2013). Leur rôle au sein de cette réponse inflammatoire peut être classifié de manière générale en 2 catégories : les cytokines pro-inflammatoires et les anti-inflammatoires. Au début de la réponse, elles vont agir en tant que chimioattractant pour attirer les différents leucocytes au foyer inflammatoire et ce sont donc les pro-inflammatoires qui vont agir. Ensuite, lorsque les leucocytes auront effectué leurs rôles respectifs pour détruire la menace, les cytokines anti-inflammatoires seront sécrétées afin de permettre le retour à l'homéostasie (voir section suivante)

Les cellules endothéliales vont elles aussi être activées et contribuer au déploiement de deux cascades protéolytiques, celle de coagulation et celle des kinines (DeFranco *et al.*, 2009). La production de bradykinine qui découle de la cascade des kinines augmente encore davantage la perméabilité vasculaire, améliorant du même coup l'afflux de protéines plasmatiques, dont des composantes du complément, vers le site (DeFranco *et al.*, 2009). Les cellules endothéliales vont également jouer un rôle essentiel quant à la migration des leucocytes en interagissant avec ces

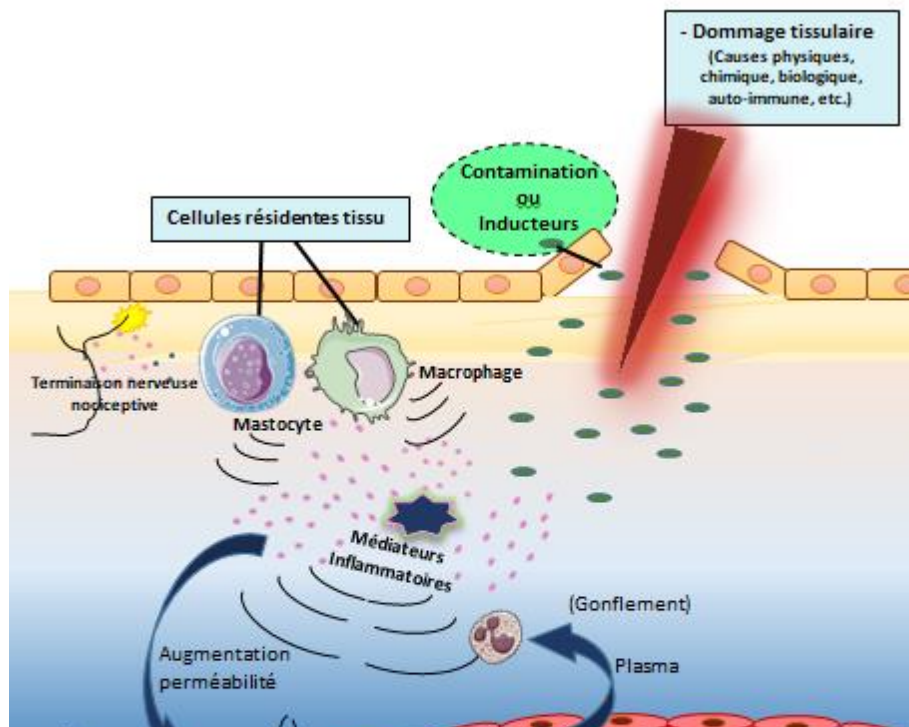
derniers via l'activation de récepteurs de surfaces et de molécules d'adhésion qui vont favoriser et permettre l'extravasation spécifique des globules blancs (Germolec *et al.*, 2018).

L'activation du complément par l'agent ayant déclenché la réponse va à son tour provoquer un effet pro-inflammatoire activateur sur les phagocytes, les mastocytes et les cellules endothéliales; mais également, avec d'autres agents comme l'histamine et la bradykinine, qui vont entraîner un réarrangement au niveau de la structure des cellules endothéliales, permettant l'ouverture des jonctions serrées pour causer encore plus de perméabilité cellulaire (DeFranco *et al.*, 2009; Weill and Batteux, 2003). Les deux voies de coagulation et des kinines sont en fait activement interconnectées et agissent en synergie. Par exemple, la coagulation mène à la formation de la fibrine, une protéine qui active les protéines en aval dans la cascade menant à la formation de bradykinine. Les agents comme la bradykinine, mais aussi l'histamine (entre autres sécrétée par les mastocytes activés résidents du tissu) et certains constituants provenant des diverses voies du complément comme le C3a, C4a et le C5a vont également contribuer à augmenter la réponse inflammatoire en favorisant le recrutement des leucocytes et la dégranulation des mastocytes (Medzhitov, 2008).

Il est à noter que plusieurs autres protéines, lipides ou facteurs sont impliqués lors de cette phase. Ce sont essentiellement les médiateurs déjà mentionnés, tels les dérivés de l'acide arachidonique (leucotriènes et prostaglandines), le PAF-acéther (platelet activating factor), qui, malgré la redondance de tous les mécanismes activateurs, ont en bout du compte le même objectif commun : acheminer un signal chimioattractant, et ce, le plus rapidement possible, afin d'attirer, d'activer et de faciliter le passage des cellules immunitaires spécialisées au site inflammatoire.

Un dernier point crucial suivant l'activation des cellules est leur réarrangement membranaire et l'expression de nouveaux récepteurs, qui vont permettre une interaction plus étroite avec les leucocytes (Ciaccia, 2011).

Finalement, toutes ces étapes convergent dans un même but commun, soit d'attirer et de faciliter la venue des leucocytes, plus spécifiquement des neutrophiles qui vont être parmi les premiers leucocytes à migrer au site inflammatoire.



Augmentation du flux sanguin (Vasodilatation)		Augmentation perméabilité vasculaire (Œdème)		Chimiotaxie Migration des neutrophiles
Début	Prolongé	Début	Prolongé	C5a
Histamine	Prostaglandines	Histamine	C5a	Leucotriènes
Sérotonine	Bradykinine	Sérotonine	C3a	PAF
	C5a		Prostaglandines	IL-8
	C3a		Leucotriènes	CXCL1
			Bradykinine	CXCL2
			Fibrine	CCL3
			PAF	CCL4

Figure 2.3 : Schématisation simplifiée des principales composantes de la réponse inflammatoire aigue

(Adaptée de Medzhitov 2008)

2.4 Phases de l'inflammation : Amplification

La deuxième phase de l'inflammation est une phase qui consiste essentiellement à recruter les cellules immunitaires au site inflammatoire (DeFranco *et al.*, 2009). Bien que les médiateurs inflammatoires soient indispensables pour préparer cette étape et guider l'action des différents acteurs impliqués, les nouveaux récepteurs à la surface des cellules sont tout autant essentiels, car ils vont permettre l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales pour qu'ils puissent quitter la circulation sanguine et transmigration vers le site inflammatoire.

Parmi ces récepteurs, on dénote d'abord les sélectines, qui se lient aux glycoprotéines soufrées constitutivement exprimées à la surface des leucocytes. L'expression des sélectines P et E vont être régulés à la hausse à la surface des cellules endothéliales (Kolaczkowska *et al.*, 2013), à la suite de leur activation, de même que les P-sélectines glycoprotéine ligant-1 (PSGL-1) et la L-sélectine à la surface des neutrophiles (Ley *et al.*, 2007, Zarbock *et al.*, 2011). De par leur interaction, la course des leucocytes transportés par le flux sanguin est ralentie et ils vont ainsi rouler à la surface de l'endothélium. Ce roulement va permettre aux neutrophiles d'établir un contact avec les cytokines produites par les cellules endothéliales, ce qui va les activer. Leurs activations vont engendrer la hausse de l'expression d'un autre type de récepteur, soit les intégrines, tels les $\beta 1$ et $\beta 2$, qui interagiront avec les molécules ICAM-1 (Chesnutt *et al.*, 2006, Kansas, 1996). Ces dernières vont être responsables de l'adhésion ferme nécessaire pour la migration des cellules immunitaires à travers la paroi endothéliale vers le site d'inflammation. De plus, un réarrangement, d'une part, des molécules jonctionnelles facilite le passage des neutrophiles, et dans la même optique les neutrophiles voient leur cytosquelette remodelé afin de pouvoir se faufiler dans un espace restreint, soit entre les jonctions de deux cellules endothéliales (migration paracellulaire), ou soit directement au travers de ces dernières (migration transcellulaire)(Shaw *et al.*, 2001). Cette étape de diapédèse va également être facilitée par les protéases libérées par les neutrophiles, sujet qui sera discuté dans une prochaine section.

2.5 Phases de l'inflammation : Résolution

La résolution de l'inflammation est un processus actif complexe qui fait intervenir divers mécanismes afin de stopper la réaction inflammatoire et de permettre un retour à l'homéostasie. Toutefois, la compréhension du processus est limitée et tous les éléments ne sont pas entièrement connus (Levy *et al.*, 2001).

On peut de manière générale diviser la résolution de l'inflammation en deux étapes principales : la phase anti-inflammatoire et la phase pro-résolution (Kolaczkowska *et al.*, 2013, C.N. Serhan *et al.*, 2010). Ce processus de résolution est actif et les médiateurs inflammatoires ne sont pas simplement dilués passivement afin de mettre fin à la réponse (C. N. Serhan, 2014).

Dans un premier temps, l'élimination des pathogènes ou de l'agent ayant déclenché la réponse inflammatoire entraîne un arrêt de la production de cytokines pro-inflammatoires et de signaux qui étaient sécrétés par les cellules résidentes des tissus endommagés et par les cellules immunitaires. Cette absence de signaux a comme conséquence principale d'arrêter la migration massive des cellules immunitaires vers le site (C. Nathan, 2002). En fait, les signaux pro-inflammatoires vont être remplacés par des signaux anti-inflammatoires comme le TGF- β , IL-1R α et IL-10, et certains gènes pro-inflammatoires régulés par le facteur NF- κ B seront au contraire régulés à la baisse (Kolaczkowska *et al.*, 2013). Aussi, certaines classes d'eicosanoïdes oxydés, comme les lipoxines, peuvent se lier aux récepteurs cellulaires et ainsi bloquer l'afflux de neutrophiles (Levy *et al.*, 2001).

De plus, il faut dans un deuxième temps que les cellules qui ont déjà migrées, principalement les neutrophiles, soit neutralisées et éliminées afin d'éviter qu'ils ne continuent de causer de l'inflammation. Ceci est en grande partie achevé grâce à la programmation de la mort par apoptose des neutrophiles, permettant leur élimination via l'action des macrophages. Mais c'est en fait un ensemble de dispositifs en synergie qui va mener à leur élimination et à l'arrêt de la réponse inflammatoire. Toutefois, avant d'être éliminés, les neutrophiles peuvent participer à l'élimination de débris cellulaires afin d'aider le tissu à retourner à l'état d'homéostasie (J. Wang, 2018).

Les glucocorticoïdes, sont de puissantes molécules aux propriétés anti-inflammatoires dont le rôle et les modes d'action sont bien documentés dans la littérature (Meijer *et al.*, 2018). Le principal mode d'action anti-inflammatoire s'effectue via leur liaison avec leurs récepteurs. Ceci entraîne une translocation de ces récepteurs cytoplasmiques vers le noyau où ils vont agir en tant

que facteurs de transcription, ce qui va leur permettre d'inhiber l'expression de divers gènes, notamment de certaines cytokines inflammatoires (Meijer *et al.*, 2018).

Pour la phase pro-résolution, un type particulier de médiateurs spécialisés pro-résolution vont jouer un rôle capital. Ce sont des médiateurs lipidiques, qui vont être synthétisés lors de cette phase, dont les principaux sont les lipoxines, les résolvines, les protectines et les marésines. Ces médiateurs lipidiques sont des dérivés de l'acide arachidonique (AA) (lipoxines), des dérivés de l'acide eicosapentaénoïque (EPA) (certaines résolvines) ou des dérivés de l'acide docosahexaénoïque (DHA)) (certaines résolvines, protectines ou marésines) (C. N. Serhan, 2008). L'AA, l'EPA et la DHA vont être convertis à partir de transformation des acides gras polyinsaturés par l'activité enzymatique impliquant les cyclooxygénase (COX) et lipoxigénases (LOX).

Ces médiateurs lipidiques vont mettre un frein à la réponse en augmentant progressivement le seuil permettant de poursuivre la réaction inflammatoire (Levy *et al.*, 2001). En plus de leur rôle empêchant la migration des leucocytes déjà mentionné précédemment, les travaux du Dr Serhan ont permis d'établir leurs diverses fonctions en les étudiant dans de nombreux modèles inflammatoires animaux de colite, de péritonite, de néphrite, de dermatite, d'ischémie, d'asthme, de rétinopathie, d'œdème et de choc endotoxinique (C. N. Serhan, 2008). Les médiateurs lipidiques vont contribuer, entre autres, à permettre un retour de la perméabilité des capillaires à la normale; à inhiber le TNF et l'IL-12; à stimuler le recrutement des macrophages; à stimuler la phagocytose des neutrophiles par les macrophages; faciliter l'élimination des chimiokines; bloquer des signaux impliqués dans la douleur; inhiber la formation d'anion superoxyde (C. N. Serhan, 2008, C. N. Serhan, 2014).

Certains éléments, notamment les enzymes phospholipase A2 (PLA), les cyclooxygénases (COX) et les lipoxigénases (LOX), qui étaient impliqués dans la phase d'initiation, vont aussi paradoxalement participer à la transformation des acides gras polyinsaturés en médiateurs pro-résolution et être nécessaire pour la phase de résolution. La conséquence de l'action de ces enzymes va donc mener à des médiateurs pro-inflammation, comme mentionnés précédemment lors de la phase d'initiation, ou pro-résolution, dépendamment du contexte dans lequel elles se trouvent. A titre d'exemple, au fur et à mesure que l'exsudat évolue, les dérivés des acides gras polyinsaturés vont plutôt s'orienter vers un profil qui, au dépend des prostaglandines et des leucotriènes, va favoriser la formation des lipoxines, résolvines, protectines et marésines pour réponse dans le contexte de pro-résolution (C. N. Serhan, 2008).

En définitive, pour que la phase résolution prenne fin et qu'il puisse y avoir un retour à l'homéostasie, plusieurs conditions doivent être présentes. La cause ayant initialement déclenchée la réponse doit être éliminée et les médiateurs chimiques impliqués doivent d'abord être neutralisés. La circulation sanguine et la perméabilité capillaire doit être aussi rétablie à la normale, et les leucocytes doivent cesser de migrer au site inflammatoire. Enfin, les neutrophiles apoptotiques vont être éliminés par les macrophages. Le tissu endommagé pourra ensuite, quand ces conditions seront remplies, être apte à se réparer et à se régénérer pour permettre un retour à l'homéostasie.

2.6 Phase aigüe vs chronique

Lorsque la réponse inflammatoire se déroule selon les trois étapes typiques d'initiation, d'amplification et de résolution précédemment décrites, on parle d'inflammation aiguë. Il s'agit d'un système de défense non spécifique, qui a pour but de protéger l'organisme contre plusieurs menaces potentielles, car c'est à partir de cette réponse que la lutte contre l'agression va débiter. Elle est donc utile à l'organisme, puisqu'elle lui permet de se défendre de façon ponctuelle contre plusieurs types d'agressions. Sans oublier qu'elle permet d'initier le processus de réparation du tissu endommagé afin qu'il puisse retrouver sa fonction initiale pour que l'intégrité de l'organisme soit maintenue (C.N. Serhan *et al.*, 2010)

Les différentes étapes précédemment décrites lors de la réponse aiguë sont aussi hautement régulées, et elles se déroulent dans un laps de temps relativement court, c'est-à-dire que cette réponse est résolue en quelques heures, voire quelques jours. La réponse inflammatoire aiguë doit de ce fait être arrêtée, et ce, de manière adéquate, sans quoi elle peut mener à une inflammation de type chronique et causer des dommages tissulaires et des pathologies.

Toutefois, l'inflammation chronique n'est pas seulement caractérisée par une durée plus longue de la réponse, mais elle fait aussi intervenir des populations cellulaires différentes (Chovatiya *et al.*, 2014). Lors de la phase aiguë, les neutrophiles migrent rapidement et sont les principaux acteurs de la réponse. La phase chronique fait plutôt appel aux cellules immunitaires mononuclées comme les macrophages et les lymphocytes (Kindt *et al.*, 2007). Cependant, la présence des neutrophiles n'est pas exclue lors de l'inflammation chronique et ces derniers peuvent aussi y être impliqués (Castanheira *et al.*, 2019). Quoi qu'il en soit, la persistance de la réponse inflammatoire peut mener à des conséquences pathologiques néfastes et causer des destructions tissulaires. L'inflammation chronique est aussi associée à de nombreuses maladies. En effet, l'inflammation n'est problématique que s'il y a dérégulation du processus, car de manière

générale, elle permet d'éliminer une menace et permet un rétablissement des structures et des fonctions ainsi que le retour à l'homéostasie dans le tissu ou la région affectée. Les nombreuses maladies impliquant un mal fonctionnement des étapes précédemment décrite illustrent l'importance d'une régulation adéquate du processus inflammatoire. Plusieurs exemples de ces maladies ayant une composante inflammatoire sont présentés dans le **tableau 2.2**.

Tableau 2.2 : Exemples de pathologies ou maladies à composante inflammatoire

Pathologies impliquant une composante liée à l'inflammation	
Maladie d'Alzheimer	Sclérose en plaques
Asthme	Psoriasis
Dermatite	Arthrite rhumatoïde
Athérosclérose	Spondylarthrite ankylosante
Maladie de Crohn	Bronchopneumopathie chronique obstructive
Goutte	Sarcoïdose ou maladie de Besnier-Boeck-Schaumann
Pemphigus	Syndromes ou maladies auto-inflammatoires
Ostéoarthrite	Anaphylaxie
Goutte	Lupus
Eczéma atopique	Thyroïdite de Hashimoto
Diabète	Colite ulcéreuse
Vascularite	
Maladies d'origine infectieuse dont l'inflammation contribue autant à la pathogénicité que le fait la toxicité microbienne	
Dysenterie	Fibrose kystique
Maladie de Chagas	Filariose lymphatique
Hépatite C	Infection à <i>Helicobacter pylori</i>
Pneumonie virale ou bactérienne	Lèpre
Méningite	Septicémie
Tuberculose	COVID-19
Maladies d'origine diverses dans lesquelles une fibrose est le principal élément de pathologie	
Rejet chronique d'allogreffe	Fibrose pulmonaire idiopathique
Cirrhose hépatique	Schistosomiase

Adapté de (C. Nathan, 2002)

2.7 Modèle d'étude de l'inflammation

En plus des divers tests *in vitro* qui peuvent être réalisés en laboratoire pour étudier tous les paramètres de l'inflammation sur une grande variété type cellulaire, plusieurs modèles animaux ont été créés pour étudier la réponse inflammatoire dans un contexte pluricellulaire. Ces modèles permettent ainsi d'étudier à la fois l'action et les interactions des différents acteurs influençant la réponse inflammatoire en tentant de recréer les conditions expérimentales plus complexes.

Plusieurs modèles inflammatoires ont été conçus, soit pour tester la toxicité et le potentiel inflammatoires de diverses molécules, soit à l'inverse afin de réduire une inflammation préétablie pour mimer le contexte d'une pathologie quelconque. Les maladies impliquant une anomalie ou une déficience au niveau inflammatoire étant nombreuses ; les modèles animaux le sont donc aussi, puisqu'ils sont souvent conçus pour tenter de recréer le contexte de chacune de ces maladies ou déficiences pour mieux les comprendre et tenter d'en trouver des solutions thérapeutiques.

Un modèle bien caractérisé afin d'étudier le potentiel anti inflammatoire de divers composés et qui est largement utilisé depuis plusieurs décennies est le modèle de l'œdème aigu de la patte de rat induit par la carraghénine (*Carrageenan-Induced Paw Edema model*) (Winter *et al.*, 1962). Le modèle consiste à créer un environnement inflammatoire dans la patte d'un animal, le plus souvent une souris ou un rat. Par une injection sous cutanée avec de la carraghénine, les signes cardinaux de l'inflammation, l'œdème, l'hyperalgésie et l'érythème se développent sous les effets des agent pro-inflammatoires comme la bradykinine, l'histamine, les agents du complément et les ROS. L'environnement inflammatoire va par la suite entrainer la migration des cellules neutrophiles qui vont mener leur action. La réponse inflammatoire maximale 5h suivant l'injection de la carraghénine et elle est usuellement quantifiée par la taille de l'œdème (Morris, 2003).

Pour créer le modèle, les œdèmes causés aux pattes des animaux peuvent toutefois être induits par différents agents, notamment le dextran, le blanc d'œuf, la formaline, les levures ou le lipopolysaccharide bactérien (LPS) (Parratt *et al.*, 1958, Vajja *et al.*, 2004, Winter *et al.*, 1962). La carraghénine a l'avantage de ne pas causer de réponse systémique, et présente des résultats hautement reproductibles. Ce modèle est également reconnu pour avoir des résultats hautement prédictif de l'activité des médicaments anti-inflammatoires dans les maladies humaines; c'est-à-dire que les doses d'antiinflammatoires utilisés dans ce modèle sont bien corrélées avec les doses de médicament efficace chez les patients (Morris, 2003).

Ce modèle est surtout utilisé pour l'effet anti-inflammatoire de différents composés qui vont être administré par diverses voies d'exposition à l'animal, et ce, dans l'optique de trouver de nouveaux médicaments pour traiter les maladies à composantes inflammatoire. Cependant, il faut tenir compte que l'effet d'un composé qui atténue l'œdème est dépendant de l'agent causal utilisé pour créer cet œdème. En effet, il est logique que chaque agoniste inflammatoire puisse entraîner des effets variés dépendamment de s'il est causé par une bactérie (ou un produit bactérien), une levure, un agent allergène ou une autre toxine inflammatoire. À titre d'exemple, un œdème conçu avec du dextran va être inhibé avec un traitement comprenant la chlorpromazine, des antihistaminiques ou certains agent adrénérgiques, mais pas la cortisone, un anti-inflammatoire puissant, qui au contraire n'aura aucun effet (Winter *et al.*, 1962). À l'inverse, un traitement à la cortisone diminuera un œdème généré par la carraghénine (Winter *et al.*, 1962).

Un autre modèle particulièrement utile afin d'étudier les différentes étapes de la réponse inflammatoire est le modèle de la poche d'air murine. Ce modèle a été conçu à la base afin d'étudier le développement et la croissance de tumeurs en utilisant le rat comme modèle animal (Selye, 1953). En créant des poches d'air proximal et caudal dans le dos de rats, le chercheur a ainsi pu étudier l'ingérence de l'inflammation dans la réponse tumorale. En effet, en injectant des suspensions de cellules tumorales Walker en combinaison avec des irritants ou des immunosuppresseurs, les résultats de cette étude ont mis en lumière l'implication et le rôle de la réponse inflammatoire topique dans l'amélioration du développement de tissus néoplasiques transplantés (Selye, 1957). Ces découvertes ont permis d'envisager que des réactions inflammatoires spécifiques jouent également des rôles clés dans les processus oncogéniques. De nombreuses études utilisant ce modèle sont par la suite apparues et ont permis de découvrir plusieurs facteurs liés à l'oncogénèse et ont menés à l'avancement des connaissances sur les tumeurs et le cancer (Bedau *et al.*, 2017, Folkman *et al.*, 1971, Goddard *et al.*, 1998).

Néanmoins, ce modèle s'est rapidement révélé fort utile afin d'étudier d'autres aspect de la réponse inflammatoire et s'est adapté pour des études biologiques et toxicologiques de toutes sortes, et même à l'étude de la toxicité des NP (Duarte *et al.*, 2012, Gaspar *et al.*, 2014, Girard, 2014, Gonçalves *et al.*, 2011, Saribas *et al.*, 2012).

En effet, le simple fait de créer des poches d'air stériles sous-cutanées dans le dos d'un rongeur (plus communément une souris ou un rat) permet de créer un environnement stérile au sein même de l'animal, d'où il est possible d'évaluer plusieurs facteurs. En somme, une poche est créée en injectant de l'air stérile aux jours zéro, trois et six afin de former la cavité sous-dermale dans le dos de l'animal. Au jour six, l'espace ainsi formé révèle une structure avec de nombreuses

caractéristiques semblable à la membrane synoviale présente au niveau des jointures, avec une couche cellulaire stable et vascularisée (Edwards *et al.*, 1981). De plus, il a été montré que cette poche d'air au jour six retient mieux les liquides qui y sont injectés, ce qui favorise l'étude des réactions inflammatoires, puisque les leucocytes y seront attirés et il sera également possible de récupérer les exsudats afin d'analyser leur présence ainsi que les réactions qui s'y seront produites (Sedgwick *et al.*, 1983).

Le modèle peut être adapté en fonction de l'étude qui doit être réalisée, c'est-à-dire que les temps d'injection et de récolte des exsudats peuvent être variables. Pour des expériences visant l'inflammation aigue, elles seront réalisées autour de six jours, temps optimal pour laisser le temps à la poche d'air de bien se former, mais il est également possible de prolonger la durée de l'étude pour l'adapter à l'analyse de l'inflammation chronique qui sera de plus longue durée.

CHAPITRE 3: LE NEUTROPHILE

3.1 Origine et morphologie du neutrophile

Le polymorphonucléaire neutrophile est le leucocyte le plus abondant dans le sang périphérique chez l'humain, représentant de 50% à 70% des globules blancs totaux. Comme il a été mentionné dans le chapitre précédent, ce sont les premières cellules à migrer vers le site inflammatoire dès les premières heures suivant le déclenchement de la réponse inflammatoire (C.N. Serhan *et al.*, 2010). Il joue donc un rôle primordial de première ligne de défense de l'organisme.

Le neutrophile est une cellule qui a aussi la particularité d'avoir un noyau segmenté en plusieurs lobes et de nombreux granules dans son cytoplasme (Futosi *et al.*, 2013). Il existe cependant de nombreux sous-type de neutrophiles qui se distinguent notamment par leurs différents marqueurs de surface, quoi que ce sujet ne soit pas discuté dans cette thèse.

Comme toutes les cellules sanguines, les neutrophiles sont produits dans la moelle osseuse lors de l'hématopoïèse (Kolaczkowska *et al.*, 2013). Plus de 10^{11} neutrophiles émergent de la moelle osseuse par jour chez les individus en santé, et il peut y en avoir jusqu'à 10 fois plus en cas d'inflammation (Demetri *et al.*, 1991).

Les neutrophiles se développent à partir de cellules souches qui vont se différencier et donner naissance aux progéniteurs communs myéloïdes ou lymphoïdes. Ces derniers vont maturer sous l'influence de cytokines pour former les lignées myéloïdes et lymphoïdes (Jack B. Cowland *et al.*, 2016a). Les lymphocytes T et B et les cellules NK proviennent de la lignée lymphoïde ; et pourront se différencier à leur tour pour générer différents sous-types de ces trois cellules. Les érythrocytes, les plaquettes et les granulocytes dérivent de la lignée myéloïde. Les différents granulocytes proviennent des cellules myéloblastes, qui vont se différencier sous l'influence coordonnée de trois principaux facteurs de transcription, soit GFI-1, PU.1, et les membres de la famille facteur de transcription C/EBPs (*CCAAT enhancer binding protein family*). C'est la balance entre ces différents facteurs qui vont influencer le développement vers les granulocytes ou les monocytes (Sheshachalam *et al.*, 2014). Les cellules dendritiques quant à elles, sont un cas particulier et peuvent dériver des deux types de lignées myéloïdes ou lymphoïdes, pour former différentes sous-populations de cellules dendritiques qui seront classées en se fondant sur leurs fonctions ainsi que sur l'expression de leurs marqueurs de surface (Miriam *et al.*, 2002). Une schématisation simplifiée de l'hématopoïèse est présentée dans la **figure 3.1**.

Les neutrophiles passent par différentes étapes avant d'atteindre leur stade de différenciation terminale, forme sous laquelle ils seront libérés dans la circulation sanguine afin d'y exercer leurs fonctions. Ils vont donc, à partir du progéniteur myéloblaste, évoluer selon les étapes suivantes durant leur différenciation : du myéloblaste en promyélocytes, ensuite en myélocyte, en métamyélocyte, en neutrophiles « band » et enfin en neutrophiles matures (**Figure 3.1**) (Borregaard, 2010, Raffaele Badolato, 2004). Les précurseurs précoces, soit les myéloblastes, les promyélocytes et les jeunes myélocytes conservent leurs capacités de prolifération. Les cellules s'engagent définitivement dans la lignée des neutrophiles pendant la transition entre myélocytes et métamyélocytes, après quoi la division cellulaire cesse et une fois le stade de neutrophile atteint, ce sont des cellules à différenciation terminale qui ne se divisent donc plus (Borregaard, 2010, J. B. Cowland *et al.*, 2016b).

La régulation de libération des neutrophiles de la moelle osseuse est principalement médiée par l'action des chimiokines CXCL12 et CXCL2 et de leurs ligands respectifs, les récepteurs CXCR4 et CXCR2 à la surface des neutrophiles (Day *et al.*, 2012). Il s'agit d'un processus fermement régulé afin d'éviter qu'un trop grand nombre de neutrophile ne se retrouve dans la circulation sanguine. En effet, bien que beaucoup de neutrophiles matures sont produits chaque jour dans la moelle osseuse, seulement 1 à 2% des neutrophiles se retrouvent dans la circulation sanguine dans les conditions d'homéostasie normale du corps (C. Rosales, 2018).

Les ostéoblastes et autres cellules stromales de la moelle osseuse produisent du CXCL12 et limitent la libération des neutrophiles exprimant le CXCR4, ce qui va promouvoir la rétention dans la moelle osseuse (C. Rosales, 2018). À l'opposé, CXCL2-CXCR2 va favoriser leur libération dans la circulation sanguine. Cette action va être médiée via l'interférence du G-CSF qui vient perturber l'interaction entre CXCR4-CXCL12 et réduire l'expression du CXCL12 par les cellules stromales de la moelle osseuse, ainsi que l'expression du CXCR4 sur les neutrophiles (H. K. Kim *et al.*, 2006, Semerad *et al.*, 2005, Summers *et al.*, 2010). De plus, le récepteur CXCR2 à la surface des neutrophiles va les guider quand il aura besoin d'être mobilisé dans la circulation sanguine, puisque les cellules endothéliales peuvent exprimer plusieurs de ses ligands dont le CXCL1, CXCL2, CXCL5 et CXCL8 (Köhler *et al.*, 2011). Finalement, la production de neutrophiles à l'extérieure de la moelle osseuse va également être soumise à une régulation, qui va essentiellement être exercée via le réseau de cytokines.

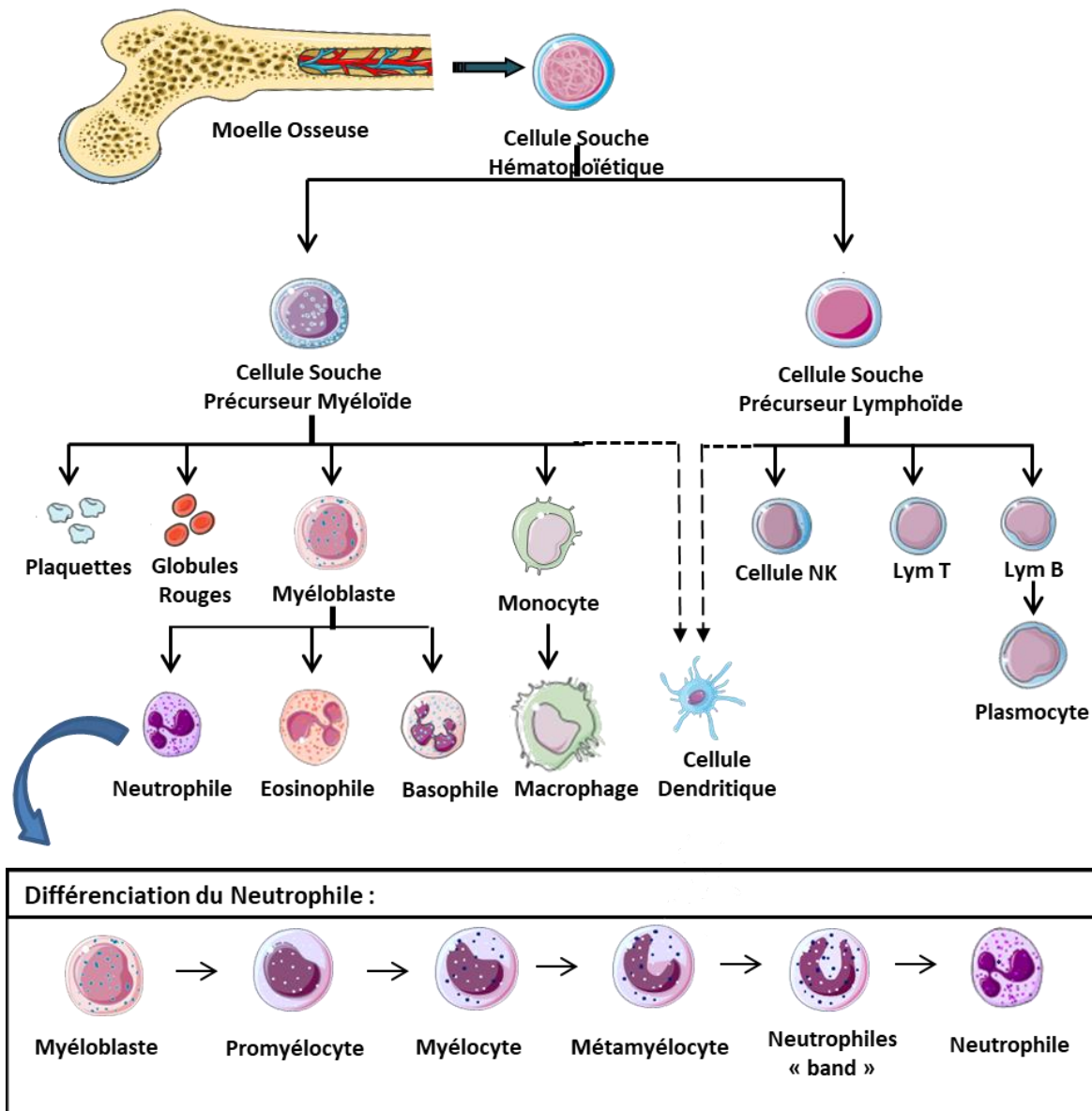


Figure 3.1 : Schématisation simplifiée de l'hématopoïèse et étapes de différenciation du neutrophile :

Les cellules souches hématopoïétiques totipotentes sont générées dans la moelle osseuse. Elles peuvent se différencier en deux types de cellules progénitrices, les cellules souches lymphoïdes, et les cellules souches myéloïdes, qui à leur tour vont se différencier en cellules sanguines spécialisées, tels les neutrophiles, les éosinophiles, les basophiles ou les monocytes et macrophage ou cellule dendritique. La cellule progénitrice lymphoïde pourra devenir soit un lymphocyte B, T ou une cellule NK.

3.2 Fonctions du neutrophile

Étant donné que le rôle principal des neutrophiles au sein de l'organisme est de combattre les pathogènes et les menaces éventuelles pour préserver son intégrité, il a recours à plusieurs mécanismes afin de rivaliser contre le plus d'ennemi possible. Puissante cellule du système immunitaire innée, le neutrophile est doté d'un arsenal de mécanisme pouvant être déployé rapidement pour une réponse rapide contre les envahisseurs. Toutefois, étant donnée la nature non spécifique de ces éléments destructeurs à large spectre, il n'est pas étonnant qu'une régulation stricte est nécessaire afin de maintenir l'homéostasie et de prévenir des dommages indésirables. Leur contribution dans l'immunité adaptative n'est pas négligeable non plus, car ils pourront également influencer plusieurs autres types cellulaires par le biais de leurs actions.

Les principales fonctions des neutrophiles seront décrites dans la présente section, en portant une attention plus particulière aux fonctions qui ont été étudiées dans cette thèse et qui seront plus détaillées.

3.2.1 Chimiotactisme et mouvement des neutrophiles

Afin de protéger l'organisme, les neutrophiles doivent dans un premier temps être capables de détecter les menaces et de se rendre au bon endroit au bon moment. Les neutrophiles sont très mobiles afin de mener une réponse rapide et efficace. En effet, des milliers de neutrophiles peuvent être détectés sur un site inflammatoire en seulement quelques minutes par suite d'une blessure ou d'une intrusion microbienne (Yipp *et al.*, 2013)

Afin d'effectuer correctement sa transition pour se diriger au bon endroit et au bon moment, le neutrophile va transiter d'un état inactif vers un état actif qui est connu sous le nom d'activation des neutrophiles (Amulic *et al.*, 2012).

Les diverses cytokines, plus précisément les chimiokines, ainsi que plusieurs molécules chimioattractantes vont aussi grandement contribuer au déplacement des neutrophiles en les guidant jusqu'au site inflammatoire en formant un gradient chimiotactique. Elles sont présentes en plus grande quantité au site inflammatoire, et elles sont aussi immobilisées sur la surface des cellules endothéliales activées en se liant aux molécules qui sont chargées négativement comme les sulfates qui retiendront les chimiokines elles-mêmes chargées positivement afin de créer un gradient intravasculaire (Massena *et al.*, 2010). Les principales molécules connues à ce jour chez l'humain ayant un pouvoir chimioattractant envers le neutrophile sont l'IL-8 (CXCL8) et Gro- α (*growth-related oncogene-alpha*), les lipides LTB₄ et PAF, les composantes du système du

complément C3a et C5a, ou les produits bactériens tel le formyle peptide FMLf ou le LPS (Premack *et al.*, 1996, Rudack *et al.*, 2003, Russo *et al.*, 2014, X. Wang *et al.*, 2016, Yokomizo *et al.*, 1997)

En bref, la cascade classique de recrutement des neutrophiles dans les veinules postcapillaires implique en premier lieu l'attachement des neutrophiles à la paroi endothéliale, suivie de leur roulement, d'un second roulement plus lent, leur arrêt, l'adhésion, leur rampement et leur transmigration (Zarbock *et al.*, 2009). Le premier contact entre les neutrophiles et l'endothélium est initié par l'activation des cellules endothéliales, qui vont subir un changement au niveau de leur molécule de surface, où les taux d'E-sélectines (CD62E) et de P-sélectines (CD62P) seront exprimés à la hausse. Les neutrophiles s'attachent d'abord à l'endothélium via l'interaction entre leurs E-sélectines et les P-sélectines avec des ligands tels que la P-sélectines glycoprotéine ligand 1 (CD162 / PSGL-1) présent sur les neutrophiles (McEver *et al.*, 1997). Ce premier lien va mener au ralentissement des neutrophiles qui seront en contact plus étroit avec l'endothélium afin de faciliter l'interaction de plusieurs autres molécules à la surface des neutrophiles avec leurs ligands. Par exemple, les L-sélectines présents à la surface du neutrophile vont également contribuer au roulement de la cellule sur l'endothélium et lui permettre plus tard d'y adhérer, de même que les molécules LFA1 (*Lymphocyte function-associated antigen 1*) qui vont interagir avec les molécules ICAM1 et ICAM2 (*intracellular adhesion molecule*) présentes sur les cellules endothéliales (Bargatze *et al.*, 1994, Zarbock *et al.*, 2011). Ce roulement des neutrophiles sur les cellules endothéliales va aussi leur permettre d'entrer en contact avec diverses cytokines et chimiokines, ce qui va induire leur activation. La liaison des neutrophiles aux chimiokines va également induire un changement de conformation des intégrines à leur surface, via l'action des récepteurs couplés aux protéines G (signalisation *inside out*). Ce signal va augmenter l'affinité des intégrines à la surface des neutrophiles avec leurs ligands, principalement des protéines ICAM, ce qui est essentiel pour l'étape d'arrêt et d'adhésion ferme (Phillipson *et al.*, 2006). En fait, à la suite de l'activation des intégrines, la protéine du cytosquelette talin 1 se lie à la sous-unité β de la queue cytoplasmique, ce qui induit l'extension de l'intégrine LFA1 et qui incite le roulement plus lent des neutrophiles. L'arrêt ferme des neutrophiles est quant à lui médié par l'activation simultanée des protéines talin 1 et kindlin 3 (une autre protéine qui se lie à la sous-unité β de la queue cytoplasmique des intégrines), ce qui mène la protéine LFA 1 à adopter une conformation de haute affinité avec ces ligands, ce qui induit l'arrêt du neutrophile sur l'endothélium. (Lefort *et al.*, 2012).

Bien que cette cascade de recrutement des neutrophiles soit principalement médiée via les intégrines et les sélectines, d'autres protéines peuvent être impliquées dans ces étapes dépendamment du contexte, comme c'est souvent le cas avec les cellules neutrophiles. À titre d'exemple, dans le foie, l'adhésion des neutrophiles au niveau des veines portes ou centrales implique le roulement suivi de l'adhésion ferme ; tandis que les neutrophiles recrutés au niveau des capillaires sinusoïdal ne subiront pas l'étape de roulement et pourront directement adhérer à l'endothélium hépatique (Wisse *et al.*, 1985, Wong *et al.*, 1997). Au niveau de ces capillaires sinusoïdal du foie, lorsqu'il y a présence d'inflammation stérile, c'est l'interaction entre la protéine MAC1 et ICAM 1 qui sera requise pour l'adhérence. S'il s'agit d'une infection, l'interaction sera plutôt non dépendante des intégrines et se fera entre les cellules endothéliales exprimant l'hyaluronane et les molécules CD44 des neutrophiles (McDonald *et al.*, 2008). Ceci peut s'expliquer entre autres par le fait que les taux d'IL-10 sont à la hausse dans l'environnement infecté du foie, ce qui diminue l'expression de la protéine MAC1 dans le neutrophile, et qui permet l'adhésion via le CD44 (Menezes *et al.*, 2009).

Finalement, la dernière étape de recrutement des neutrophiles est leur transmigration. Afin de quitter la circulation sanguine, les neutrophiles doivent traverser l'endothélium et la membrane basale, un processus qui peut perdurer entre 7 à 20 minutes (Ley *et al.*, 2007). Encore une fois, plusieurs intégrines et molécules d'adhésion seront mêlées à cette transition, dont ICAM1, ICAM 2 et VCAM1, ainsi que certaines protéines de jonction dont PECAM1 (*platelet/endothelial cell adhesion molecule 1*), le CD99, les molécules JAMs (*junctional adhesion molecules*) et ECAM (*epithelial cell adhesion molecule*) (Ley *et al.*, 2007, Phillipson *et al.*, 2006). Le passage peut s'effectuer entre deux cellules endothéliales (paracellulaire), ou carrément au travers d'une cellule endothéliale (transcellulaire) (Filippi, 2019). La libération de certains granules des neutrophiles contenant des protéinases telles que la MMP9 (metalloprotéinase-9) facilite le passage des neutrophiles, puisqu'elles ont la propriété de dégrader la matrice extracellulaire (Keck *et al.*, 2002, Yabluchanskiy *et al.*, 2013). Une fois arrivé au site inflammatoire, les neutrophiles vont déployer leur arsenal antimicrobien afin de tenter de détruire la menace.

3.2.2 Phagocytose

La phagocytose est l'une des principales fonctions du neutrophile (Nguyen *et al.*, 2008). Comme ils sont pourvus de motilité, les neutrophiles peuvent accomplir plus aisément cette fonction, et la phagocytose leur permet de neutraliser plusieurs menaces, comme certains microorganismes ou encore des débris cellulaires. Bien que plusieurs types cellulaires, dont les macrophages, les cellules dendritiques ou les éosinophiles, peuvent faire la phagocytose, le processus est légèrement différent dans le neutrophile, notamment en ce qui a trait à la formation et à la maturation du phagosome (Nordenfelt *et al.*, 2011).

Dans un premier temps, la phagocytose est un processus dynamique qui est régi par l'interaction spécifique de molécules, de particules ou de microorganisme cible avec les récepteurs membranaires des cellules phagocytaires. Ce processus actif implique également un réarrangement des protéines du cytosquelette de la cellule, pour créer une vésicule appelée phagosome, afin de permettre d'internaliser l'élément à éliminer. (Kwiatkowska *et al.*, 1999).

La première étape vise donc à reconnaître la molécule à phagocyter. Dans le neutrophile, plusieurs types de récepteurs membranaires permettent aux neutrophiles de déterminer les éléments à phagocyter. Certains résultent d'une reconnaissance innée des pathogènes, ou de molécules provenant d'un environnement inflammatoire; tandis que d'autres sont dépendant de la réponse adaptative, par exemple en reconnaissent la portion Fc des anticorps opsonisés, préalablement produit par les lymphocytes. Pour faire face à une diversité étendue de menaces à détecter, les récepteurs doivent être tout autant variés pour y faire face. On dénote dans le neutrophile cinq catégories principales de récepteurs, dont les récepteurs d'adhésion comme les sélectines ou les intégrines; les récepteurs Fc; les récepteurs de cytokines; les récepteurs de l'immunité innée tels les récepteurs de type toll-like ou de type lectine C; ainsi que les récepteurs couplés aux protéines G (Futosi *et al.*, 2013).

La phagocytose médiée par les récepteurs Fc est très efficace dans le neutrophile ; ils peuvent en effet internaliser une molécule opsonisée en moins de 20 secondes, alors que cela peut prendre quelques minutes pour d'autres phagocytes professionnels comme les macrophages (Henry *et al.*, 2004, A. W. Segal *et al.*, 1980). Les particules opsonisées peuvent être reconnues par les récepteurs Fc γ des neutrophiles qui distinguent la portion Fc des immunoglobulines G (IgG) (Berger, Sorensen *et al.* 1989). La fixation des fractions C3b ou C5a du complément au niveau de certains récepteurs membranaires neutrophiliques sont aussi des puissants stimulants induisant la phagocytose (Wheater *et al.*, 2001). Bien que l'opsonisation augmente fortement l'activité phagocytaire, les neutrophiles peuvent également internaliser des molécules sans

qu'elles ne soient opsonisées. Par exemple, les neutrophiles possèdent aussi des récepteurs PRR (*pattern recognition receptors*) comme les TLR (*toll-like receptors*), qui reconnaissent les PAMPs (*Pathogen-associated molecular patterns*), tels le LPS (lipopolysaccharide bactérien) ou la flagelline, ce qui déclenche également la phagocytose (C.N. Serhan *et al.*, 2010). Le **tableau 3.1** présente une liste non exhaustive des principaux récepteurs membranaires du neutrophile, dont plusieurs vont jouer un rôle majeur dans les capacités phagocytaires du neutrophile.

Tableau 3.1: Principaux récepteurs membranaires du neutrophile humain

Récepteur d'adhésion	Récepteurs Fc	Récepteurs de l'immunité innée	Récepteurs de cytokines	Récepteurs couplés aux protéines G	
Sélectines et ligands sélectines : ➤ L-sélectine ➤ PSGL-1	Récepteurs Fcγ : ➤ Fc γ RI (CD64) ➤ Fc γ RIIA(CD32) ➤ Fc γ RIIIb (CD16) ➤ Fc γ RIV	Récepteurs de type Toll-like : ➤ TLR1 ➤ TLR6 ➤ TLR2 ➤ TLR7 ➤ TLR4 ➤ TLR8 ➤ TLR5 ➤ TLR9	Récepteurs de cytokine Type I : ➤ IL-4R ➤ IL-15R ➤ IL-6R ➤ G-CSFR ➤ IL-8R ➤ GM-CSFR ➤ IL-12R	Récepteur de peptide formyle : ➤ FPR1 (FPR) ➤ FPR2 (FPRL1) ➤ FPR3 (FPRL2)	
Intégrines : ➤ LFA-1 (α L β 2) ➤ MAC-1 (α M β 2) (CD11b/CD18) ➤ VLA-4 (α 4 β 1)	Récepteurs Fcα : ➤ Fc α RI	Lectines type C : ➤ Dectin-1 ➤ Mc ➤ MDL-1 ➤ Mincle ➤ CLEC-2	Récepteurs de cytokine type II : ➤ IFNAR (IFN α / β -rec.) ➤ IFNGR ➤ IL-10R	Récepteurs de chemoattractants : ➤ BLT1 ➤ BLT2 ➤ PAFR ➤ C5aR (CR1 complement receptor 1)	
	Récepteurs Fcϵ : ➤ Fc ϵ RI ➤ Fc ϵ RII	Récepteurs de type RIG : ➤ RIG1 ➤ MDAS	Récepteurs de type NOD : ➤ NOD2 ➤ NLRP3	Famille récepteurs IL-1R : ➤ IL-1RI ➤ IL1RII (decoy) ➤ IL-18R	Récepteurs de chimiokines : ➤ CXCR1 ➤ CXCR2 ➤ CCR1 ➤ CCR2
		Récepteurs kinases transmembranaires : ➤ T β R-I ➤ T β R-II	Récepteurs de la famille TNFR : ➤ TNFR1 (p55) ➤ TNFR2 (p75) ➤ Fas ➤ LT β R ➤ RANK ➤ TRAIL-R2 ➤ TRAIL-R3		

Adapté de Futosi *et al.* 2013

À la suite de la reconnaissance de l'élément à éliminer, la suite logique pour effectuer la phagocytose consiste à internaliser cet élément. Il est à noter que dépendamment du récepteur impliqué, de la taille et de la nature de l'élément, la manière dont le neutrophile va englober la particule peut différer. En effet, la particule sera plus subtilement internalisée en s'enfonçant simplement dans la cellule lorsque le processus est initié via l'action des particules associées au récepteurs du complément, tandis qu'une prolongation plus vigoureuse des pseudopodes du neutrophile pour entourer l'élément et finalement le capturer sera exercée lorsque les récepteurs de type Fc sont activés (Steven Greenberg *et al.*, 2002). Ceci s'explique entre autres par les différentes voies intracellulaires activées par les deux types de récepteurs.

Plus précisément, lors de la phagocytose de composantes C3Bi opsonisées par le récepteur du complément 3 (CR3), les molécules opsonisées du complément vont causer de petites protrusions qui vont permettre d'absorber les particules (Witko-Sarsat *et al.*, 2000). Les protéines Rho vont être mobilisées dans ce processus, qui se déroulera sans augmentation des taux de Ca⁺⁺ dans le cytosol ou de production d'inositol phosphate, et se fera sans faire appel aux protéines Rac ni le Cdc42 contrairement à la phagocytose médiée par les récepteurs Fc (Caron *et al.*, 1998, Fällman *et al.*, 1989).

L'activation des récepteurs de type Fc entraîne quant à elle un processus différent. Le domaine ITAM, situé dans la portion cytoplasmique des récepteurs Fc, va être phosphorylé par des enzymes de la famille Src-tyrosine kinases. Ceci déclenche une série d'évènements intracellulaires, menant au recrutement de la protéine kinase Syk, via leurs domaines SH2 (W. L. Lee *et al.*, 2003, Nordenfelt *et al.*, 2011). L'activation de Syk entraîne à son tour la phosphorylation de plusieurs substrats, ce qui enclenche une séquence de signalisation interne initiant diverses voies dont la PI3-kinase/AKT et l'activation des protéines Rho, et induisant ultimement la polymérisation des filaments d'actine qui mènent au réarrangement du cytosquelette et qui permet d'englober la particule pour former le phagosome (S. Greenberg *et al.*, 1996, Massol *et al.*, 1998, Swanson *et al.*, 1995). L'importance de cette activité localisée de la protéine Syk n'est pas dérisoire dans les processus de phagocytose. Plusieurs études ont en effet illustré le rôle essentiel de la phosphorylation du motif ITAM des récepteurs Fc et des travaux suggèrent que la protéine Syk pourrait être un médiateur direct et indispensable dans la voie de signalisation de ces récepteurs (Fitzer-Attas *et al.*, 2000, Indik *et al.*, 1995, Park *et al.*, 1993). Le rôle essentiel de cette protéine a aussi été démontré étant donné l'incapacité des neutrophiles provenant de souris Syk-déficientes à ingérer des particules opsonisées avec des IgG (Kiefer *et al.*, 1998).

Enfin, après l'internalisation dans le phagosome, la dernière étape consiste à détruire et éliminer l'élément internalisé. À la suite de la formation du phagosome autour de l'élément à éliminer, ce phagosome n'a pas de prime abord de composition antimicrobienne ou destructrice : le phagosome doit donc mûrir afin d'acquies la machinerie cellulaire qui va lui conférer ces propriétés antimicrobiennes. Ce développement implique un cheminement dynamique au cours duquel le phagosome va subir des changements au niveau de sa membrane et va acquies des enzymes antimicrobiennes, et des complexes comme la NADPH oxydase et la V-ATPase (W. L. Lee *et al.*, 2003). La destruction des corps étrangers peut être dépendante ou indépendante de l'oxygène, par l'action des ROS ou des différents granules. Les neutrophiles ont en effet la particularité de posséder un grand nombre de granules préformées (voir section suivante dégranulation) qui peuvent rapidement fusionner avec le phagosome (Nordenfelt *et al.*, 2011). La maturation des phagosomes dans le neutrophile se produit donc beaucoup plus rapidement comparativement à d'autres phagocytes professionnels comme les macrophages, où les étapes de formation du phagosome sont plus lentes et impliquent une modification progressive des phagosomes naissants, via une interaction séquentielle avec les endosomes précoces, les endosomes tardifs et les lysosomes (DeLeo *et al.*, 2020).

Deux principaux modes de destruction sont possibles. D'abord, le contenu des granules du neutrophile peut être directement déversé dans le phagosome. Ce phagosome fusionnera avec les lysosomes contenant les granules pour mettre en contact le pathogène avec ces granules cytoplasmiques afin de le détruire (Wheater *et al.*, 2001). Ensuite, si le pathogène ne peut pas être complètement internalisé (par exemple s'il s'agit d'un vers qui est trop gros), les granules des neutrophiles vont fusionner avec la membrane externe du neutrophile pour reléguer le contenu directement à l'extérieur sur le pathogène (Janeway, 2005). En plus de détruire directement les microorganismes, la phagocytose permet également d'activer la libération de cytokines pro-inflammatoires et elle peut contribuer à la présentation antigénique.

3.2.3 Granulopoïèse et Dégranulation

Le cytoplasme des neutrophiles a la particularité de contenir différents types de granules qui sont produits au cours de son développement (Borregaard *et al.*, 1997). Ces granules sont confinés à l'intérieur de réservoirs nommés simplement granules ou bien vésicules sécrétoires, afin de préserver la cellule neutrophile elle-même et ne pas l'exposer à leur contenu toxique qui pourrait lui causer des dommages. Ces granules peuvent être utilisés à plusieurs escient ; ils peuvent avoir un rôle microbicide contre divers pathogènes en étant libérés par exocytose dans l'espace

extracellulaire, ou encore agir directement à l'intérieur de la cellule par la fusion des granules avec les phagosomes pour détruire les particules ou pathogènes internalisés (voir section phagocytose). Ils peuvent aussi fusionner avec la membrane plasmique du neutrophile pour être éjecté afin de faciliter le passage des neutrophiles lorsqu'ils se déplacent vers le site inflammatoire. (Borregaard *et al.*, 1997).

Le processus de formation des granules s'appelle la granulopoïèse et au fur et à mesure que les neutrophiles se différencient, différents types de granules se forment dans leur cytoplasme. La formation des granules débute dès les premiers stades de différenciation, soit entre le myéloblaste et le stade promyélocyte (Faurischou *et al.*, 2003, Summers *et al.*, 2010). La granulopoïèse marque donc dans le neutrophile une étape cruciale dans la détermination de la lignée cellulaire hématopoïétique puisque ce stade de maturation engage le myéloblaste de manière irréversible à devenir un leucocyte polymorphonucléaire pleinement mature (J. B. Cowland *et al.*, 2016b).

Les premiers types de granules qui apparaissent lors de la différenciation des promyélocytes sont les granules azurophiles ou également nommés granules primaires (Fouret *et al.*, 1989). Il s'agit de fines granulations pourpres nommées granulation azurophiles qui sont homologues à de grands lysosomes (Wheater *et al.*, 2001). Toutefois, ces granules ne contiennent pas la protéine LAMP (*lysosome-associated membrane protein*) elles ne sont donc pas classifiées en tant que lysosomes, mais semblent plutôt avoir les caractéristiques fonctionnelles d'un granule sécrétoire régulé (Cieutat *et al.*, 1998). En plus des hydrolases acides lysosomales, ces granules renferment plusieurs agents antimicrobiens comme la myéloperoxydase et l'élastase (Wheater *et al.*, 2001).

Un autre type de granules, les granulations secondaires ou également appelées spécifiques, font leur apparition un peu plus tard au cours de la différenciation au stade de métamyélocyte et promyélocyte (Witko-Sarsat *et al.*, 2000). Les substances qu'elles contiennent et sécrètent sont par exemple des médiateurs de l'inflammation et des activateurs du complément, et ils sont impliqués dans la réaction d'inflammation aiguë et sont sécrétées dans l'espace extracellulaire au cours de cette réponse inflammatoire (Wheater *et al.*, 2001). Les protéines de la famille des métalloprotéinases, comme la MMP-8 (collagénase-2) et la MMP-9 (gélatinase B), sont des exemples des protéines qui composent ces granules (Borregaard *et al.*, 1997).

Viennent ensuite les granulations tertiaires ou gélatinases durant la transition des métamyélocytes en neutrophiles « band » (Lawrence *et al.*, 2018). Elles contiennent elles aussi un grand nombre de gélatinases. Elles jouent un rôle considérable dans la dégradation de la

matrice extracellulaire, notamment pour la migration des leucocytes au site d'inflammation (Borregaard *et al.*, 1997, C.N. Serhan *et al.*, 2010).

Enfin, la granulopoïèse se conclut par le développement des granules ficolin-1 et des vésicules sécrétoires, lorsque le neutrophile acquiert ces caractéristiques de noyau segmenté (Borregaard *et al.*, 1997, Jack B. Cowland *et al.*, 2016a, Faurschou *et al.*, 2003). Ces derniers granules sont particulièrement riches en récepteurs et contiennent de l'albumine (Calafat *et al.*, 1993, Sengeløv *et al.*, 1994). Ce sont également le premier type de granulation du neutrophile à être mobilisé lors de la réponse et aident à la transformation du neutrophile d'un état inactif vers un état activé qui l'aide à migrer vers le tissu (von Andrian *et al.*, 1991, Zheng *et al.*, 1996). Les principaux constituants de tous ces granules du neutrophile sont listés dans le **tableau 3.2**.

Bien évidemment, le neutrophile doit avoir préalablement été stimulé afin de libérer le contenu de ses granules pour ne pas causer de dommages à l'organisme (Wheater *et al.*, 2001). En effet, le contenu des granules n'est pas spécifique et pourrait causer des dommages à l'organisme s'ils étaient libérés de manière inappropriée dans l'espace extracellulaire. Ces granules sont des armes puissantes afin de permettre d'apporter une réponse rapide et à large spectre par les neutrophiles et représentent une des premières lignes de défense contre les pathogène et permettent de faire face à un grand nombre de menaces.

Tableau 3.2: Constituants des granules du neutrophile

Granules azurophiliques (primaires)	Granules spécifiques (secondaires)	Granules gélatinases (tertiaires)	Vésicules sécrétoires
CD63	CD11b/CD18	CD11b/CD18	Phosphatase alcaline
CD68	CD15	CD66b	CD10
Preseniline	CD66b	VAMP-2	CD11b/CD18
Stomatine	CD67	Acétyltransférase	CD13
Cathepsines	Récepteur FMLf	Récepteur-fMLF	CD14
Défensines	Récepteur Fibronectine	Gélatinase (MMP-9)	CD16
Élastase	Antigène NB 1	SCAMP	CD45
MPO	Récepteur Laminine	Lysozyme	CR1 ou CD35
Acide Mucopolysaccharide	Récepteur Thrombospondine	Enzyme Diacylglycerol-deacylating	DAF
Lysozyme	Leukolysine (MMP-25)	Collagénase (MMP-8)	SCAMP1
β -Glucuronidase	Stomatine	Cytochrome b558	Récepteur-C1q
β -Glycérophosphatase	Récepteur-TNF	SNAP-23-25	Récepteur-fMLF
<i>Bacterial/permeability-increasing protein (BPI)</i>	Récepteur-vitronectine	β 2-microglobuline	Leukolysine (MMP-25)
α -Mannosidase	Collagénase (MMP-8)	Leukolysine (MMP-25)	Albumine
V-type H ⁻ -ATPase	Gélatinase (MMP-9)	Récepteur type Urokinase plasminogène activateur	Récepteur type Urokinase plasminogène activateur
Sialidase	Histaminase	Type V H ⁺ -ATPase	Cytochrome b558
α -1 Antitrypsine	Lactoferrine		Type V H ⁺ -ATPase
N-Acétyle-b-glucosaminidase	Lysozyme		Protéines plasmatique (incluant tétranectine)
Azurocidin/CAP37/héparine	Cytochrome b558		
Histaminase323 binding protein2	NGAL		
	SCAMP		
	SNAP-23-25		
	Antigène NB-1		
	Héparanase		
	Sialidase		
	hCAP-18		
	Sous unité protéine G		
	Récepteur type Urokinase plasminogène activateur		
	Rap1, Rap2		
	Vamp-2		

3.2.4 Production de réactifs oxygénés (ROS)

Parmi les stratégies de défenses antimicrobiennes des neutrophiles, en plus des granules, des peptides et des protéases précédemment mentionnées, figurent la production de réactifs oxygénés (ROS). Il s'agit d'un mécanisme d'élimination des pathogènes qui est dépendante de l'oxygène. Cette production de ROS est principalement due à l'action d'un complexe protéique, la NADPH oxydase (nicotinamide adénine dinucléotide phosphatase). Lors de la stimulation des neutrophiles, l'assemblage et l'activation de ce complexe à la membrane va mener à la production de divers réactifs oxygénés. L'activation du complexe peut également être étroitement lié aux mécanismes de dégranulation, car la NADPH oxydase est présente dans certains des granules et peut donc amorcer son action à peine quelques secondes suivant la dégranulation, soit après la fermeture des vacuoles (Briggs *et al.*, 1986, A. W. Segal *et al.*, 1980).

La production de ROS est un processus qui est initié par la génération d'une espèce radicalaire simple, l'anion superoxyde (O_2^-), par l'activation du complexe protéique NADPH oxydase (Chanock *et al.*, 1994) (Dupre-Crochet *et al.*, 2013).

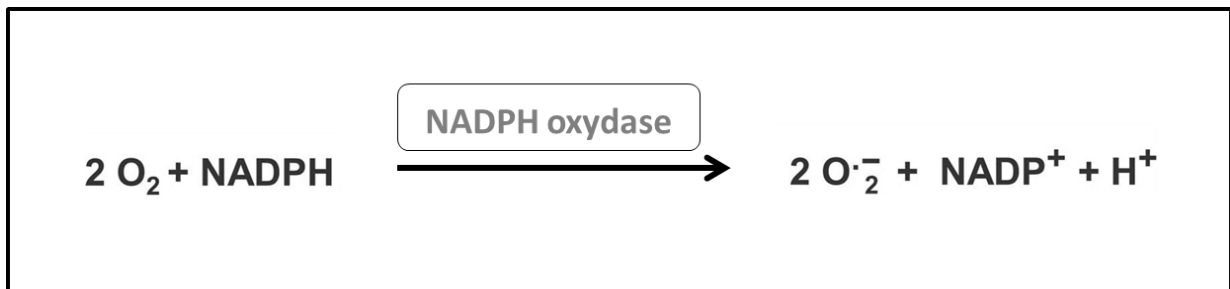


Figure 3.2 : Production d'anion superoxyde par la NADPH oxydase.

L'oxygène moléculaire est réduit sous l'action du complexe protéique NADPH oxydase afin de produire des anions superoxydes, $NADP^+$ et des protons.

Cette réaction qui aboutit à la génération d' O_2^- implique une réduction monovalente de l'oxygène via l'action de la NADPH oxydase qui agit en tant que donneur d'électron (Belambri *et al.*, 2018). Ces anions ainsi créés sont des radicaux libres très instables, qui peuvent être convertis en métabolites secondaires toxiques, en réagissant avec les molécules avoisinantes sous l'influence de d'autres enzymes. Au sein des phagosomes, les molécules d' O_2^- peuvent réagir avec des protons et l'enzyme superoxyde dismutase qui permet de former le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), qui peut à son tour réagir avec un proton H^+ et un ion chlorure Cl^- sous l'action de la myéloperoxydase pour former de l'acide hypochloreux (HOCL) et une molécule d'eau (Hampton

et al., 1998, Nauseef, 2007, Roos *et al.*, 2003). Le H_2O_2 et l' $d'O_2^-$ peuvent aussi être converti en radicaux hydroxyles (OH^\cdot) qui sont hautement réactifs et de puissants antimicrobiens, via la réaction de Haber-Weiss; ou via l'interaction avec un métal comme le fer lors de la réaction de Fenton (Anthony W. Segal, 2005).

La pertinence d'avoir encore une fois un éventail varié de molécules antimicrobiennes est essentiel pour faire face aux pathogènes tous autant diversifiés. Certaines bactéries peuvent en effet tenter de déjouer les défenses de notre système immunitaire, qui en produisant des catalases neutralisent le H_2O_2 du milieu et évitent ainsi les dommages qui pourraient être induits par le peroxyde ; ou encore en utilisant la NADPH à leur avantage afin de combiner son action à leurs propres enzymes afin de combattre les ROS (Lemire *et al.*, 2017). Heureusement, le neutrophile utilise plusieurs stratégies pour contrer lui aussi un très grand nombre de menaces, dont la production de ROS, qui s'avère être un atout essentiel à la destruction des microbes.

3.2.5 Production de cytokines et leurs rôles dans la biologie des neutrophiles

Les cytokines sont un groupe de protéines soluble qui jouent un rôle majeur dans la communication et la signalisation cellulaire (McInnes, 2013). Les cellules immunitaires n'y font pas exception, et les cytokines vont considérablement participer à la régulation du développement de ces cellules ainsi qu'au bon fonctionnement de leurs fonctions (C.N. Serhan *et al.*, 2010). Les cytokines peuvent aussi être produites par une large gamme de cellules, dont les cellules immunitaires, mais aussi d'autres types cellulaires, tels les cellules endothéliales, les fibroblastes ou diverses cellules stromales. En étant libérées, les cytokines ont un effet sur le comportement des cellules qui les entourent (effet autocrine ou paracrine), ou à plus longue distance si elles sont transportées par la circulation sanguine. Elles agissent en tant que modulateurs clés de la réponse inflammatoire, participant autant à la réponse inflammatoire aigue que chronique (Feghali *et al.*, 1997, O'Shea *et al.*, 2019).

Le terme cytokine regroupe une variété de facteurs qui peuvent être structurellement ou fonctionnellement très différents. Elles peuvent en effet agir de manière spécifique selon le type cellulaire sur lequel elles agissent, c'est-à-dire que leur action ne sera pas nécessairement la même sur chaque type cellulaire, et peut aussi différer dépendamment de la localisation de la réponse (Turner *et al.*, 2014). Leur classification n'est donc pas simple, mais elle sont fréquemment présentés dans la littérature sous six familles différentes de cytokines: les interleukines, les chimiokines, les interférons, les facteurs de nécrose tumorales, les facteurs de

croissances et le TGF- β (*Transforming growth factor beta*) (Thomson *et al.*, 2003). Les cytokines d'une même famille peuvent partager une certaine homologie structurale même si leurs fonctions sont différentes (McInnes, 2013). Le **tableau 3.3** présente les principales familles de cytokines impliquées dans la réponse inflammatoire.

L'action des cytokines est principalement médiée via la liaison avec des récepteurs membranaires qui vont induire une signalisation intracellulaire. Dans le neutrophile, le rôle des cytokines et chimiokines est fondamental autant pour le recrutement des neutrophiles au site inflammatoire que pour lui permettre d'effectuer efficacement ces fonctions. Plusieurs études ont démontré que les neutrophiles peuvent détecter plusieurs types de cytokines et qu'ils sont pourvus plusieurs récepteurs de chimiokines, qui permettent de diriger leur migration et d'activer leurs fonctions dans les tissus suivant leur extravasation (Bonavita *et al.*, 2016, Capucetti *et al.*, 2020, Petri *et al.*, 2018). En fait, les neutrophiles possèdent une panoplie de récepteurs aux cytokines, dont ceux de type I et de type II, des récepteurs de l'IL-1; des récepteurs de la famille du TNF et de chimiokines (**tableau 3.3**).

Bien que le neutrophile soit lui-même fortement influencé par diverses cytokines, il peut aussi en produire plusieurs types après son activation. C'est d'ailleurs en grande partie grâce à la production et sécrétion des diverses cytokines que les neutrophiles vont orienter la réponse inflammatoire et influencer sur les diverses cellules immunitaires. En effet, étant donné que le neutrophile est la première cellule à migrer au site inflammatoire, l'importance liée à la production de cytokine par les neutrophiles est un élément clé dans une bonne régulation de la réponse inflammatoire permettant d'influer sur la réponse immune innée, mais également sur la réponse adaptative (Yang Li *et al.*, 2019, Selders *et al.*, 2017). C'est notamment en conséquence de la sécrétion de ces cytokines et chimiokines que les autres cellules immunitaires vont pouvoir s'activer et migrer en renfort sur le site. Par exemple, les neutrophiles vont sécréter des chimiokines, comme le CCL3 (MIP-1 α) et le CCL4 (MIP-1 β), deux chimiokines connues en tant que chimioattractant des monocytes et certains lymphocytes (Kasama *et al.*, 1993, Taub *et al.*, 1993). L'IL-8 figure parmi les cytokines les plus abondamment sécrétées par les neutrophiles (Gainet *et al.*, 1998). Cette chimiokine est aussi un facteur chimioattractant, notamment pour les basophile et les lymphocyte T (Brennan *et al.*, 2007). Cette chimiokine est également un des chimioattractant les plus efficaces pour les neutrophiles. Ainsi, les neutrophiles sécrètent des molécules pouvant potentiellement affecter d'autres types cellulaires, mais peuvent aussi avoir une action autocrine sur les cellules neutrophiles elles-mêmes. Une liste des principales cytokines produites par le neutrophile sont présentées dans le **tableau 3.3**.

Tableau 3.3 : Principales familles de cytokines et leurs effets physiologiques

Famille de Cytokines	Cytokines	Effets principaux	Produit par neutrophile
Interleukines	IL-1 à IL-38	- Stimule l'hématopoïèse; - Pluripotent; Inflammatoire; - Régule les lymphocytes T et B;	IL-1- α ; IL-1 β ; IL-1ra; IL-4; IL-6; IL-7; IL-10; IL-12; IL-17; IL-18; IL-21; IL-23; IL-27
Interférons	Type I: INF α , β , ω Type II: INF γ	- Immunité antivirale et antitumorale; - Effet antiprolifératif; - Réponse lors de pathogènes Intracellulaires;	INF- α ; INF- β ; INF- γ
Facteurs de nécrose tumorale	TNF- α Lymphotoxine alpha	- Pro-inflammatoire; - Active l'immunité non spécifique; - Active les cellules endothéliales; - Peut causer l'apoptose;	TNF- α ; FASL; CD30; CD40; RANKL
Facteurs de croissances	G-CSF, GM-CSF, M-CSF ; Érythropoïétine Thrombopoïétine	- Stimule la prolifération et la maturation des précurseurs myéloïdes;	G-CSF; GM-CSF
TGF-β	TGF- β	- Stimule la production de Matrice extracellulaire; - Stimule la croissance des Fibroblastes; - Fonction anti-inflammatoires	TGF- β
Chimiokines	CC; CXC; CX ₃ C; XC	- Régule la migration des Granulocytes, des monocytes et des lymphocytes; - Stimule l'inflammation et l'angiogenèse;	CCL2; CCL3 (MIP-1 α); CCL4 (MIP-1 β); CCL17; CCL18; CCL19; CCL20; CCL22; CXCL1; CXCL2; CXCL3; CXCL4; CXCL5; CXCL6; CXCL8; CXCL9; CXCL10; CXCL11; CXCL12; CXCL13; Gro- α ;

Adapté à partir de (Denkers *et al.*, 2003, Garlanda *et al.*, 2013, Hughes *et al.*, 2018, Kupsa *et al.*, 2012, Tecchio *et al.*, 2014).

3.3 Mort du neutrophile

Afin de préserver l'homéostasie, une régulation stricte quant au nombre de neutrophile circulant est nécessaire. La nature du contenu cytotoxique des neutrophiles impose que des mécanismes de déploiement et de clairance appropriés soient mis en place afin de protéger l'hôte contre des dommages tissulaires involontaires. En conditions normales, ce sont plus de 10^{11} neutrophiles circulants qui vont mourir chaque jour chez l'humain (Athens *et al.*, 1961).

Une dérégulation des fonctions des neutrophiles ou de leur durée de vie peut entraîner des conséquences néfastes et engendrer diverses pathologies. À titre d'exemple, une baisse du nombre de neutrophiles (neutropénie) peut mener à une réponse immunitaire insuffisante, augmentant ainsi une susceptibilité aux infections. D'autre part, un trop grand nombre de neutrophiles pourraient mener à des réponses inflammatoires exacerbées, comme on peut l'observer dans les maladies inflammatoires auto-immunes. Étant donné la nature non spécifique de la réponse des neutrophiles, l'organisme doit s'assurer que la réponse menée par les neutrophiles pour défendre l'organisme soit stoppée lorsque les menaces ont été neutralisées. Il est donc fondamental qu'un équilibre soit préservé, et cette homéostasie est maintenue grâce à un équilibre entre la granulopoïèse, le stockage et la libération des neutrophiles de la moelle osseuse, et la migration contrôlée en cas de besoin dans les tissus. Ensuite, les neutrophiles excédentaires déployés sont éliminés une fois leur durée de vie terminée ou bien leurs fonctions accomplies, et ceci est en grande partie régi par le fait que les neutrophiles se dirigent spontanément en apoptose, pour être éliminés proprement sans dommage pour l'organisme (J. S. Savill *et al.*, 1989).

3.3.1 Apoptose

Comme mentionné précédemment, la régulation de la réponse des neutrophiles implique une durée de vie limitée de ces cellules, afin d'éviter une réponse excessive et pour que la réponse inflammatoire puisse cesser une fois la cellule ayant accompli sa fonction. Le neutrophile a donc recourt à l'apoptose, un mécanisme de mort cellulaire programmée. Un neutrophile activé, qui a rempli sa fonction ou qui a dépassé sa durée de vie prévue (qui est de quelques jours au maximum) va donc décéder par ce mécanisme de mort contrôlée, qui fait partie intégrante d'une bonne régulation et du maintien de l'homéostasie tissulaire (Wheater *et al.*, 2001). Ce mécanisme est indispensable, car il empêche que la cellule libère tout son contenu cytoplasmique toxique dans le milieu extracellulaire, ce qui pourrait avoir comme conséquence d'induire une inflammation locale ou aggravée, et qui pourrait être associée aux nombreuses pathologies

inflammatoires chroniques (Duffin *et al.*, 2010, C.N. Serhan *et al.*, 2010). De plus, cette étape est d'autant plus d'intérêt, car en cas d'accumulation de cellules apoptotiques, les auto-anticorps issus de la dérégulation altéreraient l'efficacité de résolution des processus inflammatoires, ce qui renforcerait l'inflammation chronique (Hanayama *et al.*, 2004, Munoz *et al.*, 2005). Ensuite, les neutrophiles apoptotiques sont à leur tour phagocytés par les macrophages afin de compléter leur élimination et promouvoir les processus de résolution de l'inflammation (Cox *et al.*, 1995, J. Savill, 1997).

Des changements morphologiques caractéristiques vont survenir chez les neutrophiles qui subissent une mort programmée par apoptose. Parmi ceux-ci, on peut noter une diminution significative du volume cellulaire, le réarrangement du cytosquelette et des protéines qui y sont associées, une turgescence de la membrane plasmique (sans toutefois que celle-ci ne perde son intégrité), une condensation de la chromatine et une dégradation de l'ADN en de petits fragments. L'apoptose est aussi associée à des changements au niveau de la surface cellulaire, comme l'externalisation de la phosphatidylsérine, un phospholipide habituellement localisé sur la face intracellulaire de la membrane plasmique (Homburg *et al.*, 1995). L'exposition de la phosphatidylsérine fournit un signal permettant la reconnaissance et la phagocytose des neutrophiles mourants par les macrophages (Fadok *et al.*, 1992, J. Savill *et al.*, 1993). Le processus d'apoptose s'achève lorsque les corps et cellules apoptotiques sont éliminés par les cellules phagocytaires professionnelles comme les macrophages. C'est d'ailleurs ce qui permet en partie de mettre fin à la réponse inflammatoire, en éliminant de la sorte les nombreux neutrophiles ayant migrés au site inflammatoire (deCathelineau *et al.*, 2003). Enfin, l'apoptose des neutrophiles est aussi corrélée à une régulation négative de nombreuses fonctions cellulaires telles que la chimiotaxie, l'adhésion cellulaire, la phagocytose, la sécrétion d'enzymes, la génération de ROS et la réactivité face à des stimuli externes tels que le FMLf *in vitro* (Dransfield *et al.*, 1995, Whyte *et al.*, 1993).

Au niveau biochimique, plusieurs voies intracellulaires sont activées. L'activation des protéines pro-apoptotiques de la famille des caspases vont jouer un rôle central dans le processus d'apoptose. Les neutrophiles expriment une grande variété de caspases initiateuses ou effectrices, dont les caspases 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10 et 14; soit des 9 des douze caspases identifiées à ce jour chez l'humain (Julien *et al.*, 2016, Moulding *et al.*, 2001, Murphy *et al.*, 2003, Yamashita *et al.*, 1999).

C'est via la cascade des protéines caspases que le déclenchement du processus d'apoptose s'entame. Toutefois, cette cascade protéique mortelle pour la cellule est elle-même régulée par

plusieurs dispositifs : tant que la cellule reçoit des signaux de survie, cette voie n'est pas activée (Martin *et al.*, 2006). Les caspases sont donc présentes, mais elles sont maintenues sous une forme inactive (zymogène ou procaspase). Deux voies principales sont responsables de l'activation de ces caspases : la voie extrinsèque et la voie intrinsèque.

La première est médiée par l'activation des récepteurs transmembranaire de mort cellulaire, comme Fas (Fas-R) et celui du TNF (TNF-R) (Akgul *et al.*, 2001, Santos-Beneit *et al.*, 2000). Par suite de la liaison des ligands à ces récepteurs, et avec l'aide de protéines adaptatrices, un autre complexe protéique va être formé (*death-induced signaling complex*) dans la partie cytoplasmique du Fas-R ou du TNF-R. Cette liaison va provoquer l'activation de la caspase initiatrice 8, qui à son tour va enclencher une cascade d'activation de différentes caspases effectrices, telle que les caspases 3 et 9, qui vont ultimement mener à l'activation des autres protéases et substrats provoquant l'apoptose (Akgul *et al.*, 2001, Santos-Beneit *et al.*, 2000).

La seconde voie est inférée par un stress cellulaire ou encore par des lésions à l'ADN par exemple après exposition à divers agents chimiques ou à des radiations. Cette voie intrinsèque est rattachée à une perte du potentiel membranaire des mitochondries, ce qui va mener à la libération du cytochrome c, un facteur pré-apoptotique, dans le milieu cytoplasmique (Murphy *et al.*, 2003). La libération du cytochrome c entraîne la formation de l'apoptosome, regroupant les protéines *Apoptotic protease activating factor 1* (APAF-1), le désoxyadénosine triphosphate (dATP) et la procaspase initiatrice 9. Les caspases effectrices 3, 6 et 7 vont donc par la suite être activées par l'apoptosome (Murphy *et al.*, 2003). Il est indispensable de mentionner le rôle de la famille de protéines Bcl-2, qui inclut des protéines pro (Bax, Bad, Bid) et anti-apoptotiques (Bcl-2, Mcl-1, Bcl-x₁), et dont la balance entre les signaux pro ou anti-apoptotiques va mener la cellule à libérer ou non le cytochrome c (Denkers *et al.*, 2003, Duffin *et al.*, 2010).

Une troisième voie peut être impliquée dans les processus d'apoptose des neutrophiles : celle du réticulum endoplasmique (RE). Elle est enclenchée par suite d'une défaillance dans le bon fonctionnement du repliement des protéines, menant à un stress du réticulum endoplasmique et à la réponse UPR (*unfolded protein response*). Cette réponse UPR vise à réduire la charge protéique mal repliée pour tenter de maintenir la viabilité et les fonction de la cellule (Hetz, 2012). Toutefois, une réponse UPR qui perdure déclenche l'apoptose. L'UPR est initié par l'activation d'au moins trois senseurs de stress UPR, soit la protéine IRE1 (*inositol-requiring protein 1*), la protéine kinase PERK et l'activation du facteur de transcription ATF6 (Hetz, 2012) . La protéine caspase 4 peut aussi être impliquée dans l'apoptose par la voie du RE dans le neutrophile (Binet *et al.*, 2010).

En fonction de stimuli cellulaires spécifiques, l'apoptose des neutrophiles peut être soit accélérée ou soit retardée. La réponse des neutrophiles peut donc être modulable selon les conditions dans lesquelles se retrouve la cellule. Ainsi, une molécule ou un microorganisme pourrait initier le processus d'apoptose spontanée très rapidement, alors que d'autres pourrait au contraire provoquer un retard de l'apoptose. Par exemple, certains pathogènes comme *Staphylococcus aureus* ou encore des molécules comme des nanoparticules d'argent peuvent de causer l'apoptose des neutrophiles (M. Poirier *et al.*, 2014, Yamamoto *et al.*, 2002). Les molécules telles que le GM-CSF, l'IL-8, certains dérivés bactériens ou bien des nanoparticules d'oxyde de zinc vont à l'inverse retarder les processus apoptotiques (Colotta *et al.*, 1992, D. M. Goncalves *et al.*, 2014, Kobayashi, 2008).

3.3.2 Autres morts cellulaires

Bien que l'apoptose soit la mort cellulaire physiologique et pathologique la plus courante chez les neutrophiles, tous les neutrophiles ne meurent pas uniquement par apoptose. D'autres types de mort cellulaires sont possibles en fonction du contexte. On dénote la nécrose, la nécroptose, la pyroptose et la formation de NETs (*Neutrophil extracellular traps*).

Contrairement à l'apoptose, la nécrose des neutrophiles est une mort cellulaire qui cause des dommages à l'organisme et peut nuire à la résolution de l'inflammation, puisque la cellule éclate, libérant ainsi le contenu nocif à l'intérieur du neutrophile dans le milieu extracellulaire (Geering *et al.*, 2013). Ce type de mort cellulaire se produit lorsque la cellule se trouve dans des conditions environnementales défavorables, comme un manque d'oxygène ou de nutriment, si elle est exposée à des composés toxiques ou encore lors d'un stress mécanique ou une température trop élevée (Golstein *et al.*, 2007). La nécroptose, qui peut être décrite comme une forme de nécrose programmée ou contrôlée, présente des caractéristiques morphologiques et des conséquences similaires à la nécrose, puisque le contenu intracellulaire est également libéré en conséquence du désagrègement de la membrane plasmique de la cellule. La nécroptose est généralement considérée en tant que voie contribuant à l'induction d'inflammation (Pasparakis *et al.*, 2015). D'autre part, la nécroptose peut également réduire la production de cytokines pro-inflammatoires en écourtant la durée de vie des cellules, ce qui diminue du même coup la réponse inflammatoire globale (Kearney *et al.*, 2015).

La libération de NETs est également un type de mort programmée survenant chez les neutrophiles (Brinkmann *et al.*, 2004). Le contenu interne du neutrophile est relégué à l'extérieur de la cellule, mais contrairement à l'apoptose ou à la nécrose, ce sont les deux membranes,

plasmique et nucléaires, qui vont être rompues afin de libérer autant le contenu nucléaire que cytoplasmiques pour former ces NETs. Ceci a pour conséquence de créer un filet à l'extérieur de la cellule où les protéines granulaires antimicrobiennes peuvent interagir avec l'ADN, et ce contenu permet d'immobiliser et d'empêcher la dispersion de microorganismes à proximité de la cellule (Zawrotniak *et al.*, 2013). Du même coup, ces microorganismes peuvent être neutralisés en étant exposés au contenu nocif des NETs. Au total, ce sont plus de vingt-quatre protéines différentes qui ont été identifiées dans les NETs, incluant des protéines des granules comme l'élastase et la myéloperoxydase, des histones provenant du noyau et des protéines du cytoplasme et du cytosquelette comme l'actine, la myosine et la calprotectine (Urban *et al.*, 2009). D'abord caractérisé lors d'une étude impliquant une exposition au phorbol-myristate-acétate (PMA), il est maintenant reconnu que les NETs peuvent être induits par divers stimuli (Fuchs *et al.*, 2007). Ainsi, ils peuvent être largués à la suite d'une exposition à des pathogènes ou à leurs produits dérivés, à des cytokines et chimiokines, mais aussi en condition non infectieuse, par exemple lors de contact avec des plaquettes activées (Fuchs *et al.*, 2007, Jorch *et al.*, 2017).

Enfin, la pyroptose est une mort cellulaire dépendante de la caspase-1. Elle implique la formation d'un complexe protéique appelé inflammasome. Stimulé par les signaux de danger, les récepteurs PRR (*pattern recognition receptor*) vont initier la formation d'un inflammasome. Plusieurs PRR sont capables de s'assembler en un complexe inflammasome dont les récepteurs de la famille Nod-Like (NLR) ainsi que l'*interferon-inducible protein* AIM2 (Schroder *et al.*, 2010). L'inflammasome va recruter la pro-caspase-1 et le rapprochement conformationnel de deux pro-caspase-1 dans le complexe de l'inflammasome va induire leur clivage auto protéolytique et l'auto activation de la caspase-1 (Boucher *et al.*, 2018). L'action de la caspase-1 activée va mener la formation de pore dans la membrane plasmique de la cellule, ce qui va perturber le flux d'ions dans la cellule et produire une augmentation radicale de la pression osmotique, ce qui va ultimement conduire à la mort via la lyse de la cellule et la libération du contenu intracellulaire des neutrophiles (Fink *et al.*, 2006). Il s'agit donc d'un type de mort cellulaire contribuant à l'inflammation. De plus, les signaux de dangers initiaux vont aussi mener à la production des précurseurs inactifs de l'interleukine-1 β et de l'interleukine 18, soit la pro-IL-1 β et la pro-IL-18 respectivement. La caspase-1 activée va également permettre de processor les précurseurs inactifs de l'IL-1 β et de l'IL-18 en leur forme active et faciliter leur libération dans le milieu extracellulaire (Fantuzzi *et al.*, 1999).

MISE EN CONTEXTE, HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE RECHERCHE

Les dendrimères PAMAM et les AuNP sont des NP de plus en plus prisées lors de la création de nouvelles applications biomédicales, surtout grâce aux nombreux avantages qu'ils présentent, dont leur capacité à franchir plusieurs barrières biologiques, comme celle des cellules épithéliales intestinales, la barrière hémato-encéphalique et la barrière placentaire (Beg et al., 2011; Kitchens et al., 2007; Menjoge et al., 2011 ; Beg et al., 2011; Kitchens et al., 2007; Menjoge et al., 2011. Cette caractéristique peut s'avérer particulièrement utile pour délivrer des médicaments à des endroits habituellement difficiles d'accès pour la majorité de ces médicaments.

Bien qu'il existe de nombreux types de dendrimères, les dendrimères poly(amidoamines) (PAMAM) sont parmi les plus largement utilisés, et, malgré cela, peu d'information concernant leur toxicité et leurs mécanismes d'actions n'est disponible. Les AuNP ont un spectre d'utilisation encore plus varié, mais encore une fois, leurs utilisations dans de nouvelles applications sont largement supérieures aux études consacrées à leur toxicologie. Étant donné que l'or à l'échelle plus grande que nanoparticulaire présente une bonne biocompatibilité, plusieurs croient que les AuNP le sont aussi. Toutefois, il ne faut pas oublier que les NP acquièrent de nouvelles propriétés uniques qui pourraient changer leur toxicité.

Malgré l'augmentation des études relatives aux effets cytotoxiques des PAMAM et des AuNP sur divers types cellulaires, de même que leur mode d'action, une carence demeure en ce qui a trait aux impacts directs sur le processus inflammatoire. Ceci est d'autant plus vrai lorsque l'on cherche à comprendre les effets sur le neutrophile, cellule clef de l'inflammation. Il est donc pertinent d'étudier l'effet immédiat de molécules potentiellement inflammatoire sur une des principales cellules responsables de maintenir une bonne barrière protectrice contre les menaces infectieuses, mais qui doit également maintenir un juste équilibre de ces fonctions et de ces niveaux de base nécessaires pour ne pas devenir néfaste pour notre système et engendrer des maladies auto-immunes. En effet, la plupart des voies d'exposition aux nanoparticules (orale, respiratoire ou cutané, par exemple) permettent aux nanoparticules d'entrer dans la circulation sanguine, où ils sont donc en contact direct avec les neutrophiles.

Ce projet vise à évaluer l'impact de quatre générations de dendrimères PAMAM (G0, G1, G2 et G3) et de NP d'Or chargées positivement et négativement sur les neutrophiles, ainsi que sur les processus inflammatoires. En raison de l'utilisation grandissante de ces nanoparticules dans une variété d'application, l'importance de connaître les effets de la molécule «seule» est primordiale, car peu importe l'utilisation que l'on souhaite faire avec ces NP, une fois que le médicament sera

délivré ou bien que les microorganismes seront éliminés, ces NP se retrouvent directement dans les systèmes biologiques ou encore dans les cours d'eau et dans l'environnement, où ils interagissent et auront des conséquences directes sur les systèmes biologiques.

Il est effectivement primordial de mieux comprendre les mécanismes régissant cette toxicité, puisque l'augmentation de l'exposition humaine aux dendrimères et aux AuNP, lors des applications envisagées, est inévitable. D'autant plus que le système immunitaire, qui régit entre autres les processus inflammatoires, sera l'un des premiers à interagir avec les NP si elles sont présentes dans l'organisme. Il est donc préférable d'évaluer les risques et d'exposer d'abord les cellules immunitaires lors d'expérimentation *in vitro*, ou encore d'étudier les impacts via des modèles inflammatoires plus complexes *in vivo*. Ceci permettra, d'une part, d'évaluer s'il est sécuritaire d'utiliser les dendrimères PAMAM et les AuNP ; et d'autre part, de mieux définir cette toxicité, dans l'optique de pouvoir améliorer la molécule elle-même ou bien encore pour connaître les paramètres permettant une utilisation sécuritaire ou du moins connaître les limites d'utilisation de ces molécules.

Hypothèses :

- Les nanoparticules d'or (AuNP) et les dendrimères PAMAM avec terminaison NH₂ (G0-G3) vont altérer la durée de vie et certaines fonctions des neutrophiles humains *in vitro*.
- Les nanoparticules d'or (AuNP) et les dendrimères PAMAM avec terminaison NH₂ (G0-G3) vont causer de l'inflammation *in vivo*.

De plus, nous émettons l'hypothèse que ces effets vont varier en fonction de :

- La taille de la nanoparticule (PAMAM)
- La charge à la surface de la particule (AuNP)

Objectifs 1 :

Caractériser le potentiel inflammatoire des PAMAM avec terminaison NH₂ (G0 à G3) et des AuNP (+) et AuNP (-) *in vivo* – modèles de la poche d'air murine

- Évaluer l'infiltration leucocytaire dans les poches d'air murines
- Évaluer la production de molécules inflammatoire (MMP; cytokines/ chimiokines)

Le recrutement leucocytaire est un événement fondamental dans les processus inflammatoires. On peut donc s'attendre à ce que si les différents traitements de dendrimères PAMAM ou d'AuNP causent de l'inflammation, il y aura assurément une infiltration leucocytaire, principalement composée de neutrophiles. L'utilisation du modèle de la poche d'air murine nous permettra de mieux caractériser cette réponse inflammatoire (amplitude, durée de la réaction, induction d'agents inflammatoires, etc.).

Objectif 2 :

Caractériser le potentiel inflammatoire *in vitro* des PAMAM avec terminaison NH₂ (G0 à G3) et des AuNP (+) et AuNP (-) dans le neutrophile humain

- Évaluer la viabilité cellulaire
- Évaluer la production de molécules inflammatoire (MMP; cytokines/ chimiokines)
- Évaluer la capacité de phagocytose des neutrophiles

Étant donné l'importance des neutrophiles dans la réponse inflammatoire, l'un des premiers paramètres à évaluer sera la viabilité des neutrophiles à la suite du contact avec les PAMAM et les AuNP. Ces tests permettront également d'orienter la suite des expériences sur les fonctions des neutrophiles et les doses qui pourront être utilisées.

SECTION 2 : ARTICLES SCIENTIFIQUES

CHAPITRE 4: PREMIER ARTICLE

In vivo proinflammatory activity of generations 0-3 (G0-G3) polyamidoamine (PAMAM) nanoparticles

Activité proinflammatoire *in vivo* des nanoparticules polyamidoamines (PAMAM) de générations 0-3 (G0-G3)

Auteurs :

Isabelle Durocher¹; Denis Girard¹

¹Laboratoire de recherche en inflammation et physiologie des granulocytes, Université du Québec, Institut National de la Recherche Scientifique (INRS)-Institut Armand-Frappier, 531 Boulevard des Prairies, Laval, QC H7V1B7, Canada

Titre de la revue ou de l'ouvrage :

Cet article est publié dans la revue Inflammation Research : *Inflamm Res* 65(9):745-755. DOI : 10.1007/s00011-016-0959-5.

Article soumis le : 2 Mars 2016 ; accepté le 7 juin 2016 ;

Contribution des auteurs :

J'ai réalisé l'ensemble des expériences de cet article. J'ai effectuée l'analyse et la mise en forme des résultats. J'ai également participé à la planification des expériences et à la rédaction de l'article. Denis Girard a participé à la planification des expériences et à la rédaction de l'article.

Lien entre l'article et le suivant :

Cet article vise à évaluer l'hypothèse de la différence selon la taille de la nanoparticule (PAMAM) et est relié aux objectifs 1 et 2.

4.1 Abstract

Objective and design: The aim of this study was to determine whether different generations (G) polyamidoamine (PAMAM) dendrimers possess proinflammatory activities in vivo.

Material or subjects: Several hundred female CD-1 mice were used to test four different PAMAM dendrimers using the murine air pouch model. Treatment Mice received appropriate negative and positive controls or G0-G3 PAMAM nanoparticles at 100 and 500 µg/ml into air pouches.

Methods: Exudates were harvested after 3, 6, 24 and 48 h. Cell pellets and supernatants were used to determine the number of total leukocytes and neutrophils and to detect the production of several analytes by an antibody array approach, respectively. One-way analysis of variance was used for statistical analysis.

Results: PAMAM dendrimers rapidly increased a leukocyte influx after 3 h, the vast majority of cells being neutrophils. This was also observed after 6 and 24 h, and resolution of inflammation was noted after 48 h. In general, the increased production of a greater number of analytes detected in the exudates after 6 h correlated with the number of dendrimer generations (G3[G2[G1[G0]).

Conclusions: PAMAM dendrimers devoid of any delivering molecules possess proinflammatory activities in vivo by themselves, probably via the production of different chemokines released by air pouch lining cells.

Keywords Polyamidoamine (PAMAM) dendrimer; Murine air pouch; Inflammation; Leukocytes Neutrophils; Chemokines.

4.2 Introduction

Nanotechnology has undergone important advances in the past decades, especially through the use of nanoparticles (NP), allowing new approaches and applications of a variety of products. The fields of applications involving the use of NP are everyday more diversified into a variety of disciplines, ranging from materials science to biomedicine. Over than 100 different dendrimer structures have been developed over the years. Among them, poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers were the first dendrimers synthesized and are among the most widely used [1]. They are a unique class of synthetic NP best known for their use as biomedical polymers. Indeed, they represent important platforms for drug attachment and encapsulation and they can carry drug molecules to specific tissues for efficient targeting. In addition, as other dendrimers, PAMAM NP

can be used to solubilize drugs, in medical imaging or for gene therapy vectors [2, 3]. In vivo, PAMAM NP were found to possess interesting anti-inflammatory effects on inflammation. For example, efficacy of dendrimer methylprednisolone conjugate formulation was reported for the treatment of lung inflammation in a pulmonary inflammatory murine model [4]. In one other study, folate- PAMAM functionalized dendrimers were found to be antiinflammatory in Chlamydia-infected tissues in a mouse model of reactive arthritis [5]. However, PAMAM NP are cytotoxic. Indeed, existing studies from different laboratories have highlighted cytotoxic effects on different cell types including human glioblastoma cell lines [6], normal human fibroblasts and human squamous cell carcinoma (SCC-15) cells [7], murine L929 fibroblastic cell Line [8], human mesenchymal stem cells [9], to name a few. Because of such cytotoxic effects of PAMAM NP, and since most of the studies reporting protective effects of PAMAM NP are in fact performed with PAMAM NP carrying different kinds of drugs [1] it is important to conduct studies with unconjugated PAMAM to better elucidate their mode of action and also because it is highly plausible that, in vivo, PAMAM NP would dissociate from the conjugates they are supposed to carry leading to the possibility to interact with surrounding cells and tissues. Recently, we have evaluated the in vivo proinflammatory activity of different kinds of naked NP using the murine air pouch model of acute inflammation, a model recently proposed to be included in the quality control of nanoparticles [10, 11]. With this model, we found that titanium dioxide nanoparticles induce a neutrophilic inflammation and a local production of several proinflammatory mediators in vivo [12]. To further demonstrate the complex mode of action of NP, we reported that polyhydroxylated C60 fullerenes (fullerenols), having no direct effects when administered into air pouches, amplified the proinflammatory effect of lipopolysaccharides to induce rapid leukocyte infiltration in vivo [13]. In this study, the murine air pouch model was used to determine if naked unconjugated PAMAM (G0–G3) NP possess some proinflammatory effects by themselves. We found that PAMAM dendrimers rapidly increased a leukocyte influx after 3 h and that most of the recruited cells were neutrophils. This was also observed after 6 h and 24 h, and resolution of inflammation was noted after 48 h.

4.3 Materials and methods

4.3.1 Dendrimers and other reagents

Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimer nanoparticle kit generations 0–3 and all other reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, Missouri), otherwise, specified. The

characterization of the dendrimers was performed by dynamic light scattering as indicated in Table 1.

4.3.2 Dendrimer sterility

For testing sterility, the PAMAM G0-G3 suspensions (500 µg/ml) were incubated in Lysogeny broth agar plates and were monitored for up to one week for the presence or absence of colonies. This approach is a very good indicator about potential contamination of a tested solution, especially to *E. coli*, known for their proinflammatory endotoxins. As a positive control, one finger was rapidly deposited on the gelose. Pictures of the plates were taken with the iPhone 4 s smartphone. In addition, the level of endotoxin in each PAMAM suspension was quantified by a modified Limulus ameobocyte Lysate assay, the ToxinSensor™ Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit (Piscataway, NJ).

4.3.3 Murine air pouch model

CD-1 female mice (6–8 weeks of age) were obtained from Charles River Laboratories (St-Constant, Canada). A period of acclimation of 1 week was allowed to animals prior to initiation of experiments. On days 0 and 3, mice were anesthetized with isoflurane and 3 ml of sterile air was injected subcutaneously, in the back, with a 26-gauge needle to form an air pouch as published previously [12]. On day 6, 1 ml of HBSS (Ctrl), 1 µg/ml LPS, 1 % solution of carrageenan, or 100 and 500 µg/ml of G0, G1, G2, or G3 PAMAM NP was injected into the air pouch. Mice were killed by CO₂ asphyxiation 3, 6, 24 or 48 h after the treatment and the pouches were washed once with 1 ml and then twice with 2 ml of HBSS containing 10 mM EDTA. Exudates were centrifuged at 1000g for 10 min at 4 °C and supernatants were collected and stored at -80 °C for further analysis. Cells were resuspended at 0.5 x 10⁶ cells/ml, spread onto microscope slides, stained with Hema-Stain (Fisher Scientific, Ottawa, Canada) for identification of leukocyte cell subpopulations, and were counted with a hemocytometer. In some experiments, 1 µg/ml LPS (0111: B4 *E. coli*), 100 or 500 µg/ml G0, G1, G2 or G3 NP was injected alone. The concentrations of the PAMAM dendrimers used were selected based on previous in vivo experiments performed with other types of NP [12, 13]. All experiments were performed as per protocols approved by Animal Use and Care Committees at INRS-Institut Armand-Frappier.

4.3.4 Zymography assay

An equal fraction of each exudate from the same experimental condition was pooled together ($n \geq 7$) and 45 μl of the different pools were mixed with 15 μl of a nonreducing buffer (40 % glycerol, Tris-HCl 1 M, pH 6.8, SDS 8 %) and 50 μl of this mixture was separated on 10 % acrylamide gels containing 0.2 % gelatin. Gels were washed twice for 30 min with 2.5 % Triton X-100 and incubated overnight in digestion buffer (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM, CaCl_2 5 mM). The gels were then stained with Coomassie blue 0.1 % and destained as previously published [14].

4.3.5 Detection of cytokines/chemokines

Mouse antibody array kit was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN), and all the steps for the simultaneous detection of 40 analytes were performed as per the manufacturer's recommendation and as previously published [12, 15]. These analytes are listed in the corresponding figure. We selected the analytes based on the fact that the kit we used (Mouse cytokine array, panel A array kit) is the one containing the most analytes related to inflammation. Exudates ($n \geq 7$ mice) were harvested from the different experimental conditions described above and were pooled to probe the membranes, within 2 weeks following the *in vivo* experiments. This was performed because of the high cost that this will represent for doing antibody array for each animal in each group. The chemiluminescent signals from the bound cytokines present in the exudates were detected by chemiluminescence using ChemiDoc™ MP Imaging System. The signal intensity was normalized to the membrane's positive control. Protein array membranes were scanned and densitometry analysis was performed using the Multi-Analyst program (Bio-Rad, Hercules, CA).

4.3.6 Statistical analysis

One-way analyses of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's test (all pairs of columns) was used to evaluate for the significance between control and each sample. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Statistical significance was set at $p < 0.05$.

4.4 Results

4.4.1 Dendrimer sterility

Table 4.1 Characterization of the PAMAM dendrimers

PAMAM	Size (nm)	% Intensity	PDI	Zeta potential (mV)
G0-STOCK	1.1 ± 0.2^b	79.8 ± 30.0^b	0.5 ± 0.2	ND ^c
	30.6 ± 51.2	16.0 ± 25.0		
	1853 ± 3095	4.2 ± 5.1		
G1-STOCK	1.5 ± 0.02	91.9 ± 10.0	0.8 ± 0.2	ND
	115.9 ± 161.7	8.1 ± 10.0		
G2-STOCK	1.3 ± 1.1	88.7 ± 19.6	0.6 ± 0.4	ND
	95.0 ± 164.5	11.3 ± 19.6		
G3-STOCK	2.4 ± 0.1	97.3 ± 2.5	0.2 ± 0.07	ND
	1806 ± 2982	1.8 ± 1.0		
	58.3 ± 100.9	0.9 ± 1.6		
G0-100	164.9 ± 156.7	70.7 ± 7.4	0.9 ± 0.09	-4.9 ± 1.5
	4.8 ± 6.9	24.8 ± 2.7		
	0.8 ± 1.4	4.5 ± 7.8		
G1-100	373.6 ± 115.4	78.6 ± 7.0	0.9 ± 0.09	-0.9 ± 0.9
	0.8 ± 0.07	21.4 ± 7.0		
G2-100	246.0 ± 61.67	100	0.5 ± 0.1	-0.09 ± 0.9
G3-100	273.4 ± 72.13	54.6 ± 14.4	0.8 ± 0.3	0.2 ± 1.9
	4.2 ± 1.0	33.0 ± 1.8		
	0.5 ± 0.5	9.7 ± 8.7		
G0-500	192.3 ± 126.1	72.2 ± 17.1	0.9 ± 0.1	-5.3 ± 5.2
	1.2 ± 0.3	25.5 ± 18.4		
	1.6 ± 2.8	2.2 ± 3.9		
G1-500	94.6 ± 88.8	100	1.0	-9.1 ± 6.5
G2-500	251.0 ± 30.19	93.8 ± 1.4	1.0 ± 0.07	0.02 ± 0.05
	0.9 ± 0.5	6.2 ± 1.4		
G3-500	434.1 ± 38.7	90.9 ± 3.4	0.5 ± 0.04	-0.07 ± 0.04
	54.8 ± 17.3	9.1 ± 3.4		

The size distribution and zeta potential of the PAMAM dendrimers of generation (G) 0–3 were determined by dynamic light scattering using a Zetasizer Nano-ZS (model ZEN3600) from Malvern Instruments Inc. (Westborough, MA). Measurements (means ± SD, n = 3) were performed with NP directly from the stock solution obtained from the manufacturer (STOCK) or suspended at 100 or 500 µg/ml in HBSS alone at 37 °C, the temperature of the mouse body PDI polydispersity index

^b Numbers in bold characters represent the size of the vast majority (% intensity) of the NP suspensions.

^c The zeta potential was not determined for the stock solution (from the manufacturer) because of limited volume quantities

As illustrated in Fig. 4.1a, in contrast to the positive controls (arrows, panel d), no colonies were observed in the plate incubated with the presence (panels b, c, e, f) or absence (panel a) of the different PAMAM NP indicating that the solutions are sterile. To further confirm sterility, we next quantified endotoxins by a modified LAL assay, an assay in which PAMAM NP were found not to interfere [16]. Figure 4.1B shows that, indeed, the endotoxin levels were very low < 0.15 EU/ml for all the tested PAMAM NP (Fig. 4.1b).

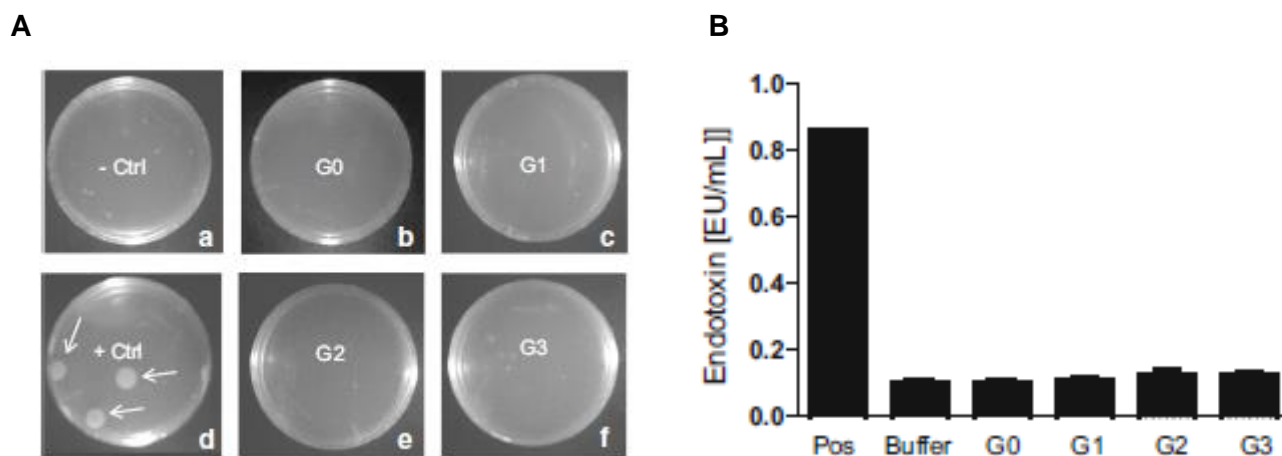


Fig. 4.1 Sterility of PAMAM used in this study.

a For testing their sterility, the PAMAM G0–G3 NP were plated onto Petri dishes as described in “Materials and Methods”. Only the contaminated positive control (+Ctrl) lead to the apparition of colonies. b Endotoxin levels were quantified by a modified LAL assay, as described in “Materials and Methods”. Results are mean \pm SEM (n = 3)

4.4.2 PAMAM NP induce a neutrophilic inflammation in vivo

We first determined if the different NP could induce a rapid inflammation in vivo, since we previously report that other NP like TiO₂ [12], but not fullerenols [13], were found to induce a rapid leukocyte recruitment after only 3 h of treatment. Based on previous studies [12, 13] and some preliminary experiments (data not shown), two concentrations 100 and 500 μ g/ml of the different PAMAM NP were used in this study. As illustrated in Fig. 4.2b, all but G0-100 NP rapidly increased the number of leukocytes recruited into the air pouch, but the results were not statistically significant. However, when looking only on the number of granulocytes (the vast majority being neutrophils), G1-500 significantly increased the influx of neutrophils (Fig. 4.2c). After 6 h of treatment with the PAMAM NP, G1-500, G2-500, G3-100 and G3-500, significantly increased the number of total leukocytes recruited into air pouches (Fig. 4.3a). For neutrophil counts, the values were significant for the same conditions but G2-500 (Fig. 4.3b). Unlike the total leukocyte counts,

the number of neutrophils was significant for G2-100. After 24 h, all PAMAM NP were found to still attract an increased number of total leukocytes into air pouches, but significance was only observed for G1-500 (Fig. 4.3c). Note that during these experiments, carrageenan (CRGN), known to prolong leukocyte influx [12, 17], was used as a positive control because the effect of LPS drastically decreased after 12 h in the murine air pouch [18, 19]. Although the number of neutrophils was increased in all conditions vs Ctrl, significance was only observed with G3-100 (Fig. 4.3d). After 48 h, the leukocyte influx was still markedly and significantly increased by CRGN, but the effect of PAMAM NP was similar to that of Ctrl, indicating that the inflammation was resorbed (data not shown).

4.4.3 PAMAM NP treatments increase the gelatinase activity detected in the murine air pouch exudates

The exudates of each mouse have been harvested, pooled and used to determine gelatinase activity by zymography. The 6 h time point was selected based on the neutrophilic infiltration observed in response to PAMAM NP. As illustrated in Fig. 4, the gelatinase activity detected in the murine air pouch exudates was increased after PAMAM NP treatment vs treatment with the buffer alone (Ctrl). Of note, treatment with G3 at 500 µg/ml was the more potent in terms of gelatinase activity and was even more potent than that induced by LPS.

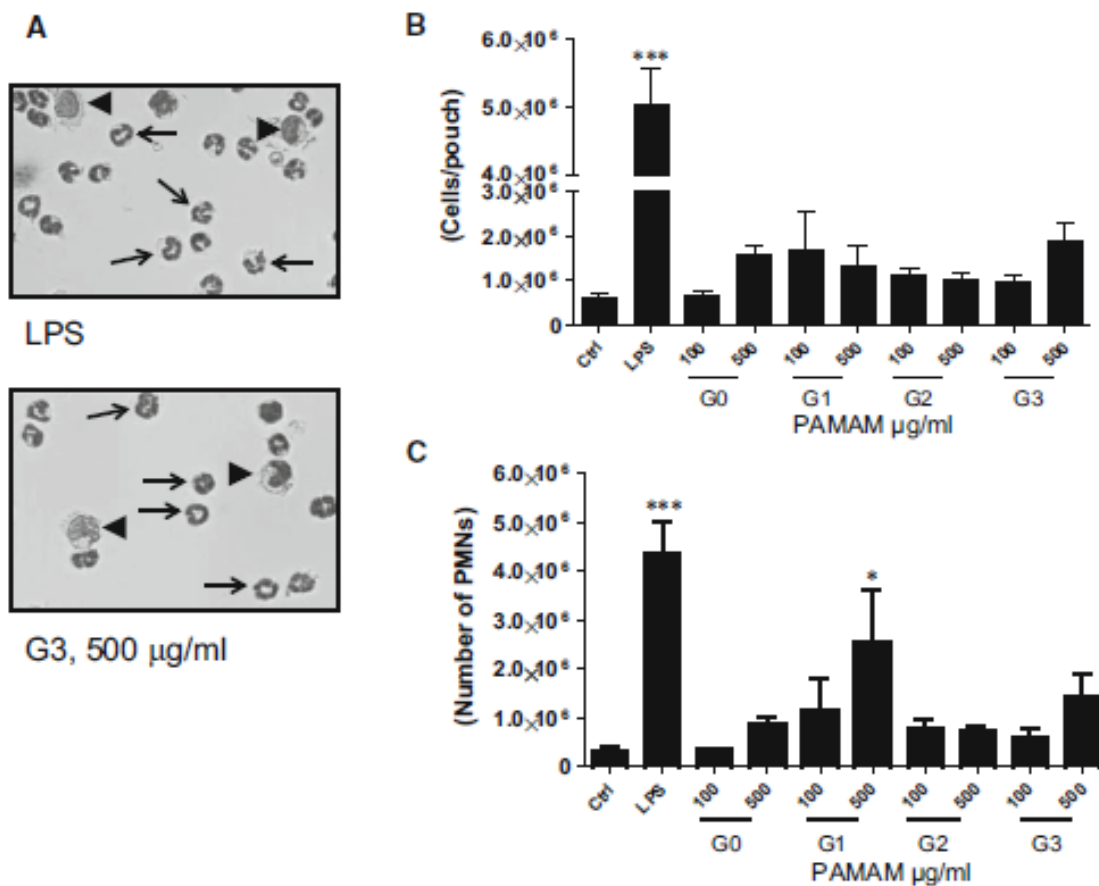


Fig. 4.2 PAMAM NP induce a rapid neutrophilic influx in vivo.

PAMAM NP were locally administered into murine air pouches and exudates were harvested after 3 h for cell counting and identification as described in “Materials and Methods”. a Typical images showing that most of leukocytes attracted by PAMAM NP (G3, at 500 µg/ml) are neutrophils (arrows) with few monocytes-macrophages (arrowheads) very similar to the positive control LPS. Total leukocyte (a) and polymorphonuclear neutrophil cell (PMNs) (b) counts are illustrated. Results are mean ± SEM (n = 4–9 mice/condition)

4.4.4 Increased expression of several analytes, including chemokines, in PAMAM NP-induced murine air pouch fluids

We have investigated the modulatory activity of PAMAM NP on the simultaneous expression of 40 different analytes by an antibody array approach. The profiles of the expression of several analytes in response to the PAMAM NP treatments are illustrated in Fig. 4.5 and all other data are given in Online Resource 1. The 6 h time point was selected because it corresponds to the maximum effect observed in response to the administration of the dendrimers (this report) and for comparison purposes. Indeed, in our hands, previous studies indicated that the maximum effect observed regarding the leukocyte recruitment using the murine air pouch model is, in general, observed between 6 and 9 h of treatment with different agents, including LPS, cytokines, etc., [18, 20–22] as well as nanoparticles other than PAMAM NP [11–13]. As illustrated in Fig. 4.5,

LPS markedly increase the production of all tested analytes but JE and TIMP-1 vs control, confirming its renowned proinflammatory activity. Although the production of several analytes is increased by several PAMAM NP, at different degrees, G3 at 500 µg/ml is the experimental conditions where the production of a greater number of analytes is increased vs controls. When compared with LPS, G3 at 500 µg/ml strongly increases the production of C5/C5a, KC, JE, MCP-5, and SDF-1 but not MIG.

The raw data on each membrane are illustrated in Fig. 4.6 as well as the list of all analytes. In this figure, each membrane used for calculating the different signal intensities obtained for each analyte is illustrated. It is clear that the positive control LPS (panel B) induces the production of most of the several analytes detected in the exudates when compared to the control (panel A). In general, the increased production of a greater number of analytes detected in the exudates correlates with the number of dendrimer generation (G3[G2[G1[G0] (see panel J vs panel C, as an example). Among the different analytes tested, the dendrimers increased the production of several chemokines known to be involved in leukocyte attraction and important in innate immunity, including CCL2/MCP-1 (JE), CCL12 (MCP-5), CXCL9 (MIG) (see the underlined spots corresponding to analytes D9-D10, D11-D12 and D13-D14), respectively, according to the array panel coordinates illustrates at the bottom of the figure. Interestingly, dendrimers are even more potent for the induction of these analytes than LPS (see underlined spots in panels C-J vs panel B). Other major analytes are indicated in the figure (arrows) as well as positive (A1-A2, A23-A24 and F1-F2) and negative (F23-F24) controls (circles) used to quantify the intensity of each analyte (in duplicate, two spots for each analyte). Of note, CCL5 (RANTES) is highly increased in response to LPS but not in response to any dendrimers (black arrow). It is important to mention that the production of some analytes predominantly known as anti-inflammatory molecules is also increased in response to dendrimers, including IL-10 and IL-1Ra (interleukin-1 receptor antagonist).

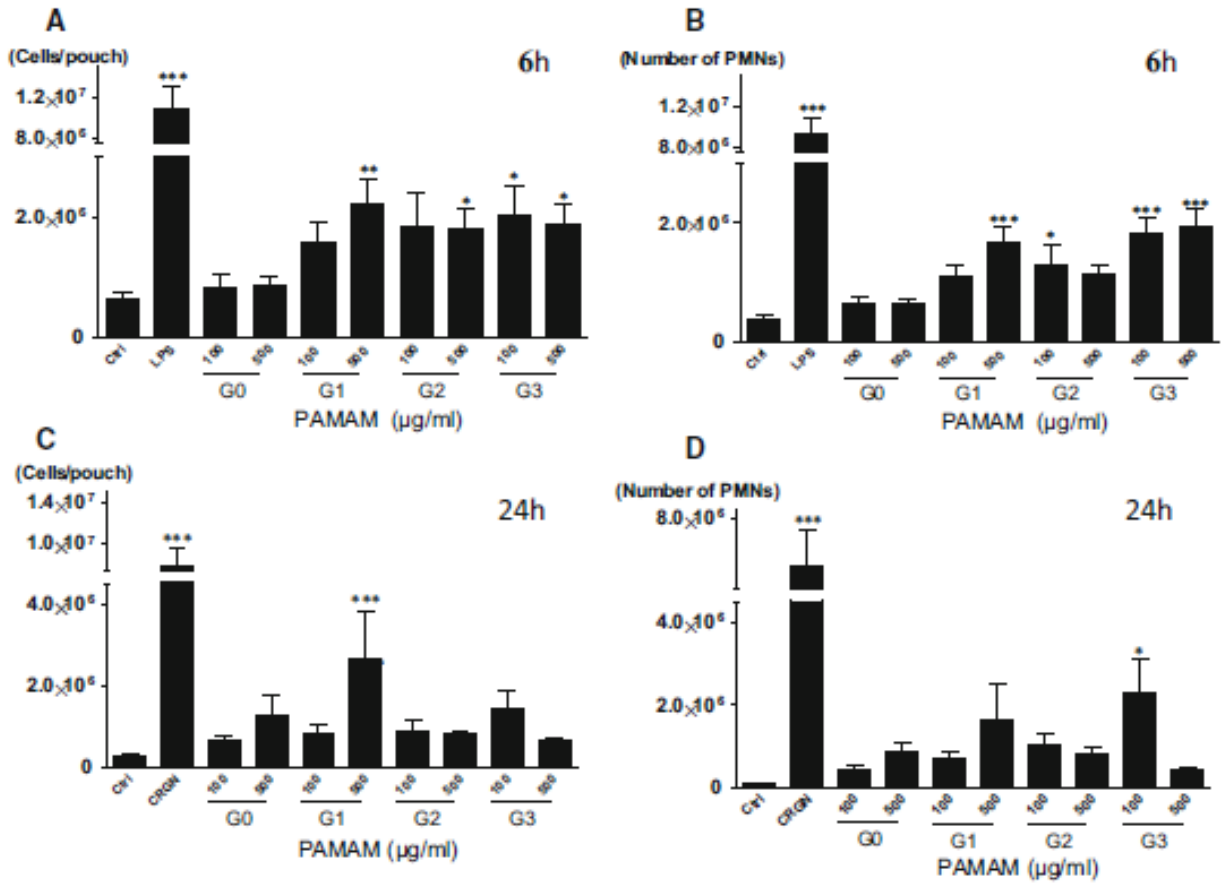


Fig. 4.3 Effect of PAMAM NP administration in the murine air pouch model over time.

PAMAM NP were administered into murine air pouches and exudates were harvested after 6 and 24 h. Leukocyte infiltration was then determined as described in “Materials and Methods”. Total leukocyte after 6 h (a) and 24 h (c) and polymorphonuclear neutrophil cell (PMNs) counts after 6 h (b) and 24 h (d) are illustrated. Results are mean ± SEM (n = 7–19 for 6 h and n = 3–9 mice/condition for 24 h). Because of the known kinetic in this model, LPS was used as a positive Ctrl for 6 h and carrageenan (CRGN) for 24 h.

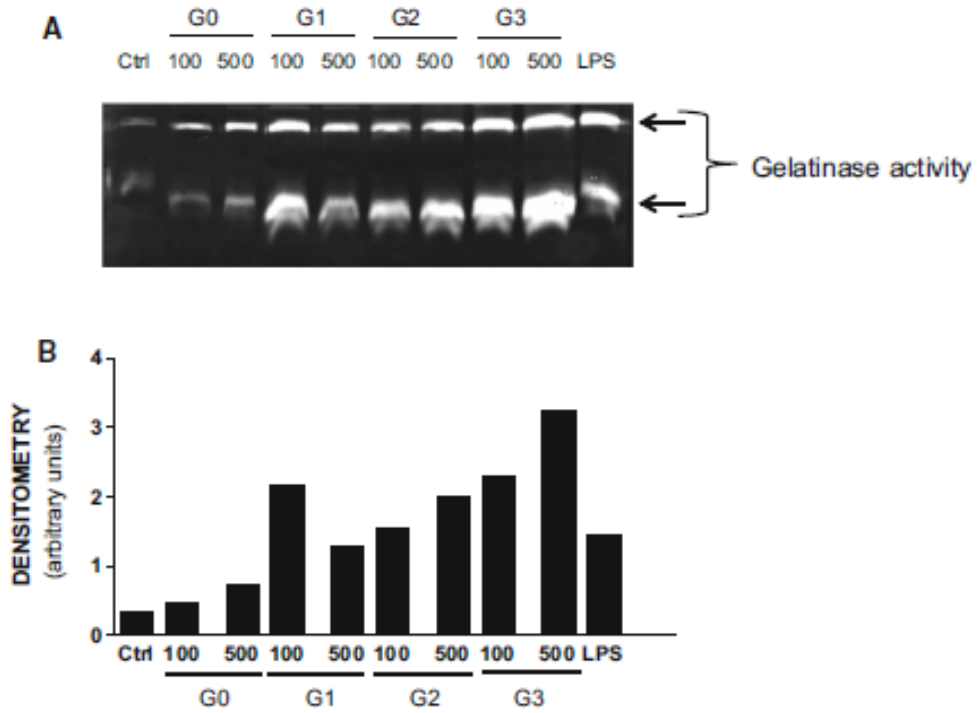


Fig. 4.4 Gelatinase activity detected in the PAMAM NP-induced murine air pouch exudates.

The presence of gelatinase activity was detected by zymography using the exudate from mice treated for 6 h with buffer (Ctrl), LPS, or the indicate generation of PAMAM NP as described in "Materials and Methods". a Typical gel obtained afterthe zymography experiments. Arrows indicated the two regions on the gel where the gelatinase activity was increased vs Ctrl. b Densitometry analysis was assessed as described in "Materials and Methods" and the results are the sum of both detected white areas and are expressed as arbitrary units. The results are from pooled exudates from at least 7 mice/condition.

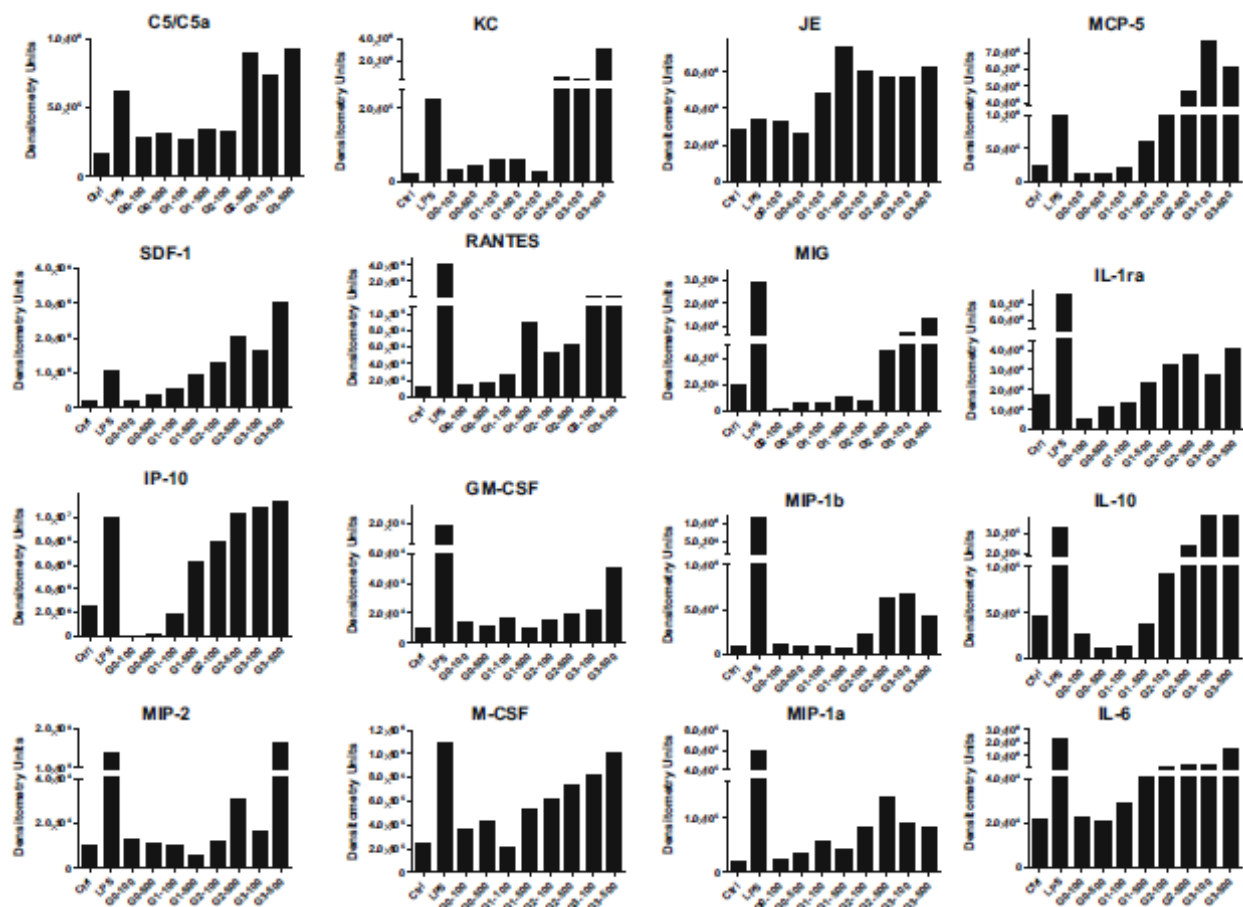


Fig. 4.5 PAMAM NP induce the production of several cytokines and chemokines.

The antibody array assay was performed with the exudates harvested after 6 h as described in “Materials and Methods”. The profile of each analyte (identified above the corresponding bar graph) is illustrated. The signal intensity (densitometry in arbitrary units) was obtained from pooled exudates of ≥ 7 mice/condition.

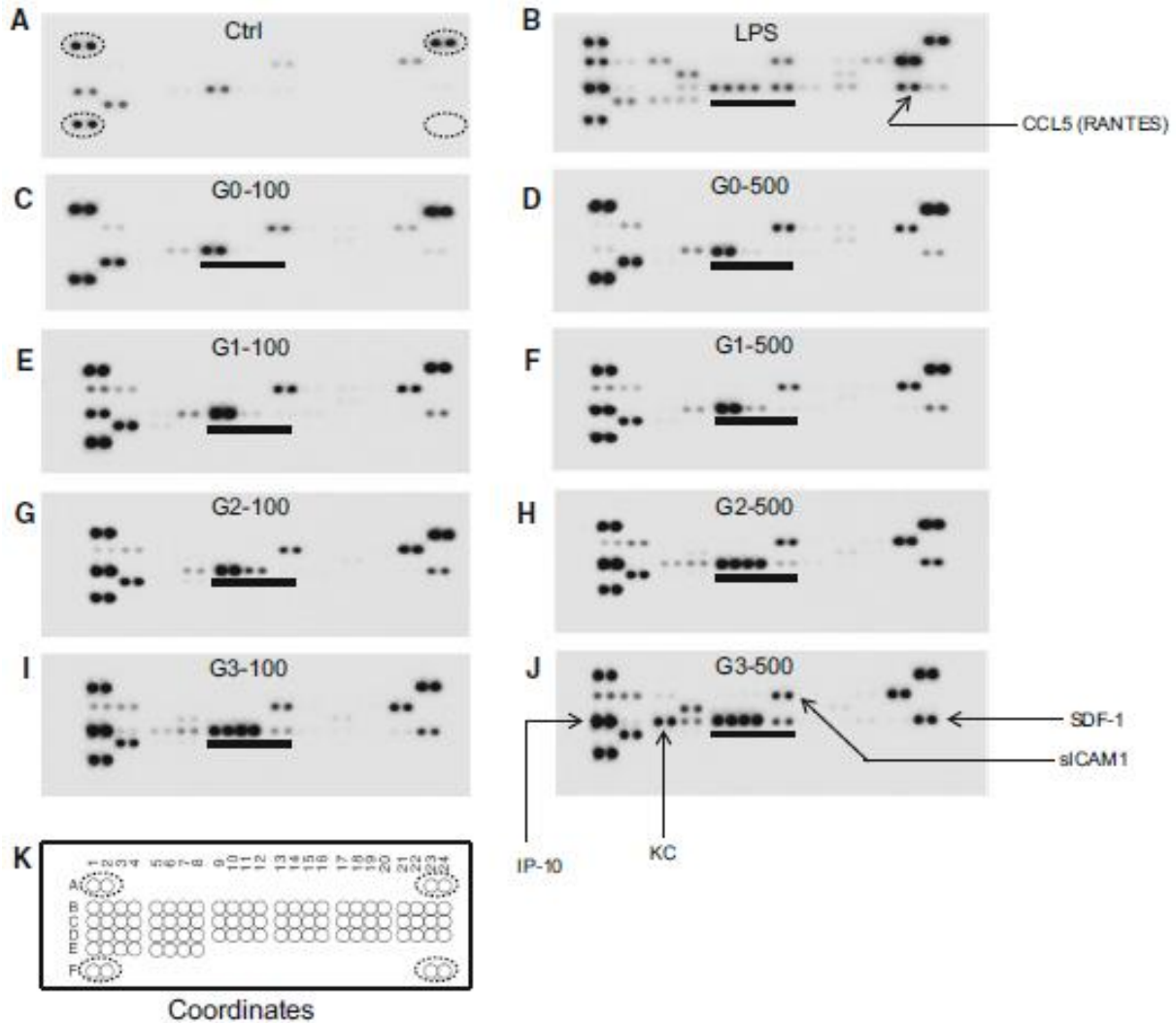


Fig. 4.6 Raw data obtained after the antibody array assay performed with the exudates harvested after 6 h.

The ten membranes for each experimental condition (a Ctrl; b LPS; c G0-100; d G0-500; e G1-100; f G1-500; g G2-100; h G2-500; i G3-100; j G3-500 $\mu\text{g/ml}$; and k coordinates) are illustrated. Dotted circles show the positive and negative controls included in the assay. Underlined analytes, chemokines known to be involved in leukocyte ttraction. The identification of the different analytes on the membranes is: positive Ctrl (A1-A2); positive Ctrl (A23-24); BCL (B1-B2); C5/C5a (B3-B4); G-CSF (B5-B6); GM-CSF (B7-B8); I-309 (B9-B10); Eotaxin (B11-B12); siCAM-1 (B13-B14); INF-c (B15-B16); IL-1a (B17-B18); IL-1b (B19-B20); IL-1ra (B21-B22); IL-2 (B23-B24); IL-3 (C1-C2); IL-4 (C3-C4); IL-5 (C5-C6); IL-6 (C7-C8); IL-7 (C9-C10); IL-10 (C11-C12); IL-13 (C13-C14); IL-12p70 (C15-C16); IL-16 (C17-C18); IL-17 (C19-C20); IL-23 (C21-C22); IL-27 (C24-C25); IP-10 (D1-D2); I-TAC (D3-D4); KC (D5-D6); M-CSF (D7-D8); JE (D9-D10); MCP-5 (D11-D12); MIG (D13-D14); MIP-1a (D15-D16); MIP-1b (D17-D18); MIP-2 (D19-D20); RANTES (D21-D22); SDF-1 (D23-D24); TARC (E1-E2); TIMP-1 (E3-E4); TNF-a (E5-E6); TREM-1 (E7-E8); Positive Ctrl (F1-F2); and Negative Ctrl (F23-F24)

4.5 Discussion

In this study, the proinflammatory activity of different generations (G0-G3) of PAMAM NP was determined using the murine air pouch model of inflammation, a model recently proposed to be included in the quality control of NP [10] and suitable to evaluate their ability to induce leukocyte infiltration [11–13, 23]. The sterility of the different dendrimers used in this study was determined before performing the in vivo experiments. Although testing the sterility of NP represents great challenges knowing that different NP could interfere with a variety of in vitro assays, including those aiming at measuring endotoxin levels [24–26], we systematically verify, if at least incubating the NP suspensions on Lysogeny broth agar plates will cause the apparition or not of colonies over time [27], a simple assay. Of note, PAMAM NP were previously found not to interfere for different kinds of assays measuring endotoxins [16], as the one used here. In this study, we show that dendrimer PAMAM NP possess proinflammatory activity in vivo by recruiting leukocytes into air pouches. At first glance, these results appear contradictory with others from several studies indicating anti-inflammatory activities of dendrimers promoting their use to treat inflammatory disorders [28–34]. In particular, our data showing that PAMAM dendrimers promote a neutrophilic infiltration are not in agreement with those from a previous study indicating that mannodendrimers (poly(phosphorhydrazone) dendrimers grafted with mannose units) were found to reduce neutrophil influx in a model of acute lung inflammation [35]. However, although the literature is rich regarding the role of dendrimers to alleviate inflammation [4, 33, 34, 36–40], it is very difficult to draw any clear conclusion on the real role of dendrimers by themselves during inflammation. Indeed, a plethora of different modified dendrimers, including PAMAM NP, are produced and studied and the experimental conditions are so different from one study to the others. Unlike the vast majority of these studies investigating the potential effect of dendrimers on other compound-induced inflammation, we have determined the direct proinflammatory role of PAMAM dendrimers of generations 0–3 bearing simple surface functionality ($-NH_2$) without any agents conjugated with them. It is clear that we observed proinflammatory activity of these dendrimers as judged by the leukocyte infiltration, especially neutrophils, and by the increased local production of several cytokines/chemokines. Moreover, the increased gelatinase activity detected in exudates of dendrimer-induced mice correlate well with a neutrophilic infiltration [10]. In response to PAMAM dendrimers (G4–G6), the murine J774A.1 monocyte/macrophage cell line was found to increase the in vitro production of the potent proinflammatory mediators MIP-2, TNF- α and IL-6 [41]. This is in agreement with the increased production of several analytes that we observed in response to PAMAM NP. It is interesting to mention that we also observed here a local increased expression of MIP-2, TNF- α and IL-6. However, we do not know at this time which cells secrete these

cytokines in the air pouch exudate. In the past, using the murine air pouch model, we have performed a study demonstrating that IL-4 was able to induce leukocyte infiltration, mostly neutrophils and monocytes-macrophages, by an indirect mechanism [18]. In this study, we harvested the lining cells (from the pouches) and re-incubated them in vitro and verify the profiles of cytokines produced in comparison with that obtained from those locally produced in the air pouch exudates. We found that some analytes, for example, the CCL2 chemokine, was only minimally produced by lining cells in vitro when compared to the local production detected in the in vivo exudates suggesting the necessity of other factors and/or players in vivo. Moreover, the profiles of analytes detected in response to IL-4 was different in terms of expression levels and of specificity in the in vivo exudate vs in vitro, indicating that other cells might be involved and that the responses are context specific. We believe that PAMAM NP act similarly to other agents, including IL-4, in the in vivo murine air pouch model [10, 12, 18, 19, 42–44] by first activating the lining cells that will rapidly respond by the local secretion of different analytes. Among them, several chemokines are secreted and will attract leukocytes, especially neutrophils. Locally, these cells can also participate in the secretion of several analytes allowing attraction of other neutrophils. Of note, we have determined here only the acute response after a unique injection of PAMAM NP aiming at answering whether or not these NP possess proinflammatory potential themselves. It would be of interest to investigate in future repetitive administrations of these PAMAM NP to determine their potential to induce persistent chronic inflammation. The murine air pouch model could be suitable for that but several others in vivo model could also be used. We believe that such studies will be of great importance knowing that unconjugated PAMAM dendrimers were previously found to positively or negatively regulate inflammation [37, 39, 41, 45]. Of note, most evidences reported in the literature regarding the anti-inflammatory activity of PAMAM NP are from in vivo experiments [37, 39], whereas those indicating proinflammatory activity originated from in vitro experiments [41, 45]. Therefore, our study is one of the first showing that unconjugated PAMAM dendrimers possess some proinflammatory activities in vivo by themselves. This has to be taken into account, particularly, for using PAMAM NP for the development of nano-medicaments.

4.6 Acknowledgments

The study was supported by grants from the Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST).

4.7 BIBLIOGRAPHIE 1^{ER} ARTICLE

1. Labieniec-Watala M, Watala C. PAMAM dendrimers: destined for success or doomed to fail? Plain and modified PAMAM dendrimers in the context of biomedical applications. *J Pharm Sci.* 2015;104:2–14.
2. Mintzer MA, Grinstaff MW. Biomedical applications of dendrimers: a tutorial. *Chem Soc Rev.* 2011;40:173–90.
3. Eichman JD, Bielinska AU, Kukowska-Latallo JF, Baker JR Jr. The use of PAMAM dendrimers in the efficient transfer of genetic material into cells. *Pharm Sci Technol Today.* 2000;3:232–45.
4. Inapagolla R, Guru BR, Kurtoglu YE, Gao X, Lieh-Lai M, Bassett DJ, et al. In vivo efficacy of dendrimer-methylprednisolone conjugate formulation for the treatment of lung inflammation. *Int J Pharm.* 2010;399:140–7.
5. Benchaala I, Mishra MK, Wykes SM, Hali M, Kannan RM, Whittum-Hudson JA. Folate-functionalized dendrimers for targeting Chlamydia-infected tissues in a mouse model of reactive arthritis. *Int J Pharm.* 2014;466:258–65.
6. Wang S, Li Y, Fan J, Wang Z, Zeng X, Sun Y, et al. The role of autophagy in the neurotoxicity of cationic PAMAM dendrimers. *Biomaterials.* 2014;35:7588–97.
7. Uram L, Szuster M, Gargasz K, Filipowicz A, Walajtys-Rode E, Wolowiec S. In vitro cytotoxicity of the ternary PAMAM G3- pyridoxal-biotin bioconjugate. *Int J Nanomed.* 2013;8:4707–20.
8. Ozturk K, Erturk AS, Sarisozen C, Tulu M, Calis S. Cytotoxicity and in vitro characterization studies of synthesized Jeffaminecored PAMAM dendrimers. *J Microencapsul.* 2014;31:127–36.
9. Goncalves M, Castro R, Rodrigues J, Tomas H. The effect of PAMAM dendrimers on mesenchymal stem cell viability and differentiation. *Curr Med Chem.* 2012;19:4969–75.
10. Vandooren J, Berghmans N, Dillen C, Van Aelst I, Ronsse I, Israel LL, et al. Intradermal air pouch leukocytosis as an in vivo test for nanoparticles. *Int J Nanomed.* 2013;8:4745–56.
11. Girard D. Using the air pouch model for assessing in vivo inflammatory activity of nanoparticles. *Int J Nanomed.* 2014;9:1105–7.
12. Goncalves DM, Girard D. Titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles induce neutrophil influx and local production of several proinflammatory mediators in vivo. *Int Immunopharmacol.* 2011;21:21.
13. Goncalves DM, Girard D. Evidence that polyhydroxylated C60 fullerenes (fullerenols) amplify the effect of lipopolysaccharides to induce rapid leukocyte infiltration in vivo. *Chem Res Toxicol.* 2013;26:1884–92.
14. Babin K, Antoine F, Goncalves DM, Girard D. TiO₂, CeO₂ and ZnO nanoparticles and modulation of the degranulation process in human neutrophils. *Toxicol Lett.* 2013;221:57–63.
15. Rathe C, Ennaciri J, Garces Goncalves DM, Chiasson S, Girard D. Interleukin (IL)-4 induces leukocyte infiltration in vivo by an indirect mechanism. *Mediators Inflamm* 2009; 2009:193970.
16. Dobrovolskaia MA, Neun BW, Clogston JD, Ding H, Ljubimova J, McNeil SE. Ambiguities in applying traditional Limulus amoebocyte lysate tests to quantify endotoxin in nanoparticle formulations. *Nanomedicine (London, England)* 2010; 5:555–62.
17. Moisan E, Chiasson S, Girard D. The intriguing normal acute inflammatory response in mice lacking vimentin. *Clin Exp Immunol.* 2007;150:158–68.

18. Ratthe C, Ennaciri J, Garces Goncalves DM, Chiasson S, Girard D. Interleukin (IL)-4 induces leukocyte infiltration in vivo by an indirect mechanism. *Mediators Inflamm.* 2009;193970:10.
19. Pelletier M, Bouchard A, Girard D. In vivo and in vitro roles of IL-21 in inflammation. *J Immunol.* 2004;173:7521–30.
20. Antoine F, Simard JC, Girard D. Curcumin inhibits agent-induced human neutrophil functions in vitro and lipopolysaccharide-induced neutrophilic infiltration in vivo. *Int Immunopharmacol.* 2013;17:1101–7.
21. Lavastre V, Cavalli H, Ratthe C, Girard D. Anti-inflammatory effect of *Viscum album* agglutinin-I (VAA-I): induction of apoptosis in activated neutrophils and inhibition of lipopolysaccharide-induced neutrophilic inflammation in vivo. *Clin Exp Immunol.* 2004;137:272–8.
22. Pelletier M, Girard D. Biological functions of interleukin-21 and its role in inflammation. *Sci World J.* 2007;7:1715–35.
23. Escribano E, Fernandez-Pacheco R, Valdivia JG, Ibarra MR, Marquina C, Queralt J. Effect of magnet implant on iron biodistribution of Fe@C nanoparticles in the mouse. *Arch Pharm Res.* 2012;35:93–100.
24. Kroll A, Pillukat MH, Hahn D, Schnekenburger J. Interference of engineered nanoparticles with in vitro toxicity assays. *Arch Toxicol.* 2012;86:1123–36.
25. Oh SJ, Kim H, Liu Y, Han HK, Kwon K, Chang KH, et al. Incompatibility of silver nanoparticles with lactate dehydrogenase leakage assay for cellular viability test is attributed to protein binding and reactive oxygen species generation. *Toxicol Lett.* 2014;225:422–32.
26. Neun BW, Dobrovolskaia MA. Detection and quantitative evaluation of endotoxin contamination in nanoparticle formulations by LAL-based assays. *Methods Mol Biol.* 2011;697:121–30.
27. Goncalves DM, Girard D. Zinc oxide nanoparticles delay human neutrophil apoptosis by a de novo protein synthesis-dependent and reactive oxygen species-independent mechanism. *Toxicol In Vitro.* 2014;28:926–31.
28. Ledall J, Fruchon S, Garzoni M, Pavan GM, Caminade AM, Turrin CO, et al. Interaction studies reveal specific recognition of an anti-inflammatory polyphosphorhydrazone dendrimer by human monocytes. *Nanoscale.* 2015;7:17672–84.
29. Qi R, Majoros I, Misra AC, Koch AE, Campbell P, Marotte H, et al. Folate receptor-targeted dendrimer-methotrexate conjugate for inflammatory arthritis. *J Biomed Nanotechnol.* 2015;11:1431–41.
30. Fruchon S, Mouriou S, Thiollier T, Grandin C, Caminade AM, Turrin CO, et al. Repeated intravenous injections in non-human primates demonstrate preclinical safety of an anti-inflammatory phosphorus-based dendrimer. *Nanotoxicology.* 2015;9:433–41.
31. Fruchon S, Caminade AM, Abadie C, Davignon JL, Combette JM, Turrin CO, et al. An azabisphosphonate-capped poly(phosphorhydrazone) dendrimer for the treatment of endotoxin-induced uveitis. *Molecules.* 2013;18:9305–16.
32. Neibert K, Gosein V, Sharma A, Khan M, Whitehead MA, Maysinger D, et al. “Click” dendrimers as anti-inflammatory agents: with insights into their binding from molecular modeling studies. *Mol Pharm.* 2013;10:2502–8.
33. Bosch X. Dendrimers to treat rheumatoid arthritis. *ACS Nano.* 2011;5:6779–85.
34. Hayder M, Fruchon S, Fournie JJ, Poupot M, Poupot R. Anti-inflammatory properties of dendrimers per se. *Sci World J.* 2011;11:1367–82.

35. Blattes E, Vercellone A, Eutamene H, Turrin CO, Theodorou V, Majoral JP, et al. Mannodendrimers prevent acute lung inflammation by inhibiting neutrophil recruitment. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110:8795–800.
36. Liu X, Hao W, Lok CN, Wang YC, Zhang R, Wong KK. Dendrimer encapsulation enhances anti-inflammatory efficacy of silver nanoparticles. *J Pediatr Surg*. 2014;49:1846–51.
37. Tang Y, Han Y, Liu L, Shen W, Zhang H, Wang Y, et al. Protective effects and mechanisms of G5 PAMAM dendrimers against acute pancreatitis induced by caerulein in mice. *Biomacromolecules*. 2015;16:174–82.
38. Iezzi R, Guru BR, Glybina IV, Mishra MK, Kennedy A, Kannan RM. Dendrimer-based targeted intravitreal therapy for sustained attenuation of neuroinflammation in retinal degeneration. *Biomaterials*. 2012;33:979–88.
39. Chauhan AS, Diwan PV, Jain NK, Tomalia DA. Unexpected in vivo anti-inflammatory activity observed for simple, surface functionalized poly(amidoamine) dendrimers. *Biomacromolecules*. 2009;10:1195–202.
40. Wang B, Navath RS, Romero R, Kannan S, Kannan R. Antiinflammatory and anti-oxidant activity of anionic dendrimer-Nacetyl cysteine conjugates in activated microglial cells. *Int J Pharm*. 2009;377:159–68.
41. Naha PC, Davoren M, Lyng FM, Byrne HJ. Reactive oxygen species (ROS) induced cytokine production and cytotoxicity of PAMAM dendrimers in J774A.1 cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010;246:91–9.
42. Neves SA, Dias-Baruff M, Freitas AL, Roque-Barreira MC. Neutrophil migration induced in vivo and in vitro by marine algal lectins. *Inflamm Res Off J Eur Histamine Research Soc [et al]*. 2001;50:486–90.
43. Pelletier M, Roberge CJ, Gauthier M, Vandal K, Tessier PA, Girard D. Activation of human neutrophils in vitro and dieltrininduced neutrophilic inflammation in vivo. *J Leukoc Biol*. 2001;70:367–73.
44. Tessier PA, Naccache PH, Clark-Lewis I, Gladue RP, Neote KS, McColl SR. Chemokine networks in vivo: involvement of C-X-C and C-C chemokines in neutrophil extravasation in vivo in response to TNF-alpha. *J Immunol*. 1997;159:3595–602.
45. Mukherjee SP, Byrne HJ. Polyamidoamine dendrimer nanoparticle cytotoxicity, oxidative stress, caspase activation and inflammatory response: experimental observation and numerical simulation. *Nanomedicine*. 2013;9:202–11.

CHAPITRE 5: DEUXIÈME ARTICLE

Evaluation of the *in vitro* and *in vivo* proinflammatory activities of gold (+) and gold (-) nanoparticles.

Évaluation *in vitro* et *in vivo* des activités proinflammatoires des nanoparticules d'or (+) et d'or (-).

Auteurs :

Isabelle Durocher¹; Claudie Noël¹; Valérie Lavastre¹; Denis Girard¹

¹Laboratoire de recherche en inflammation et physiologie des granulocytes, Université du Québec, Institut National de la Recherche Scientifique (INRS)-Institut Armand-Frappier, 531 Boulevard des Prairies, Laval, QC H7V1B7, Canada

Titre de la revue ou de l'ouvrage :

Cet article est publié dans la revue Inflammation Research :

Inflamm Res 10.1007/s00011-017-1078-7. DOI 10.1007/s00011-017-1078-7

Article soumis le : 27 mars 2017 ; accepté le 26 juin 2017 ;

Contribution des auteurs :

J'ai réalisé l'ensemble des expériences *in vivo* de cet article. J'ai effectué l'analyse et la mise en forme des résultats *in vivo* et certains *in vitro*. J'ai également participé à la planification des expériences et à la rédaction et la révision de l'article. Claudie Noel a réalisé les expériences *in vitro*, a participé à la rédaction et la révision de l'article. Valérie Lavastre a participé à la planification des expériences et à la révision de l'article. Denis Girard a participé à la planification des expériences et à la rédaction et la révision de l'article.

Lien entre l'article précédent :

Cet article vise à évaluer l'hypothèse de la différence selon la charge à la surface de la nanoparticule (AuNP) et est relié aux objectifs 1 et 2.

5.1 Abstract

Objective and design the aim of this study was to determine potential effects of gold (+) and gold (-) nanoparticles, AuNP (+) and AuNP (-), on neutrophil biology.

Material or subjects Freshly isolated human neutrophils were used for the *in vitro* aspects and CD-1 mice were used in the *in vivo* murine air pouch model of acute neutrophilic inflammation. *Treatment* Human neutrophils were treated with the indicated concentrations of AuNP (+) or AuNP (-) *in vitro* and mice received 100 or 500 µg/ml AuNP (+) or AuNP(-) into air pouches. *Methods* Cellular uptake of AuNP by neutrophils was confirmed by transmission electron microscopy and the ability of the NP to modulate apoptosis, gelatinase activity, and chemokine production and chemotaxis was determined by cytology, zymography, ELISArray, antibody array, and ELISA and by a micro-chemotaxis chamber, respectively. *In vivo*, exudates were harvested after 6 h to determine the leukocyte infiltration to detect the production of several cytokines by an antibody array approach and ELISA. Oneway analysis of variance was used for statistical analysis.

Results AuNP possess proinflammatory activities *in vitro* and induce mainly a neutrophil influx *in vivo*, albeit at different degrees.

Conclusions AuNP (+) and AuNP (-) should be added as new candidates into a growing list of NP having proinflammatory activities by themselves.

Keywords: Nanoparticles; Neutrophils; Inflammation; Cytokines; Chemokine

5.2 Introduction

In the past few years, potential utilization of nanoparticles (NP) has gained a tremendous growing interest for several biomedical applications. Among them, gold nanoparticles (AuNP) are very attractive candidates in nanomedicine, especially for cancer diagnostics and treatments [1]. AuNP are particularly known not only for their size similar to cellular components, but also for their very good biocompatibility, making them promising candidates for drug delivery [2, 3]. However, as other NP, AuNP may possess some toxic effects, including inflammation [4–6]. In this respect, inflammation is certainly not unique to AuNP and is rather one of the major toxic effects of *in vitro* and *in vivo* NP exposure reported in the literature. Although AuNP possess some anti-inflammatory activities *in vivo*, there are also some studies reporting that AuNP may also possess proinflammatory effects *in vitro* [7–12]. Interestingly, *in vivo* administration of polyethylene glycol-coated AuNP of 10 and 60 nm was found to induce a recruitment of white blood cells, but when

the diameter was 5 or 30 nm, a decreased of such recruitment was observed [13]. Although inflammation is characterized by an infiltration of leukocytes, mainly neutrophils, key player cells in inflammation and the first leukocytes known to be recruited at an inflamed site, there is a lack of information regarding the direct effects of AuNP on the neutrophil biology. Recently, we documented that, although AuNP of 20 nm (AuNP20) could be internalized in cytosolic vacuoles, but that AuNP70 were mainly located at the cell membrane, both were found to induce apoptosis similarly by a caspase dependent mechanism [14]. AuNP20 and AuNP70 were found to activate endoplasmic reticulum (ER) stress, as evidenced by activation of the three ER sensors, IRE1 (inositol-requiring protein-1), ATF-6 (activating transcription factor-6), and PERK [protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase]. As other NP, AuNP can alter differently the biology of human immune cells according to parameters other than the particle sizes. Indeed, the capacity of human monocytes and macrophages to ingest AuNP with different sizes, shapes, and surface chemistry, one study reported, for example, that the uptake of gold nanorods by macrophages was more efficient than that of gold nanospheres [15]. In addition to phagocytosis, human neutrophils are also known to trap foreign bodies via NETosis, a process that is characterized by the release of decondensed chromatin and granular contents to the extracellular space [16]. Recently, AuNP were found to be trapped during NETosis, and while particle shapes were found of minor importance, positive charges markedly enhance AuNP trapping [17]. In the present study, we investigated the possibility that AuNP(+) and AuNP(-) could alter the biology of neutrophils *in vitro* on several biological functions and *in vivo* by studying neutrophil influx.

5.3 Materials and methods

5.3.1 Nanoparticles

Aqueous suspension of gold (?) nanoparticles, AuNP (+), and gold (-) nanoparticles, AuNP (-), stabilized by poly (quaternary ammonium) or by sodium polyacrylate, respectively, were purchased from Sciventions Inc. (Toronto, ONT). They were obtained at a stock solution of 1.5 mg/ml in water with a size of 1–10 nm as determined by transmission electron microscopy. They were used without any modifications and were suspended at the desired concentrations in ultrapure water. Until there is evidence to the contrary, there is no information indicating possible cytotoxic and/or regulatory effects of the stabilizers used alone on neutrophils or other types of cells.

5.3.2 Size distribution and zeta potential measurements

The size distribution and surface charge (zeta potential) of AuNP were determined by dynamic light scattering using a Malvern Zetasizer Nano-ZS (model ZEN3600 from Malvern Instruments Inc. (Westborough, MA). As detailed under, the measurements were performed at 100 µg/ml AuNP (+) or AuNP (-) in RPMI-1640 10% human serum or in ultrapure water [14].

5.3.3 Neutrophil isolation

Neutrophils were isolated from venous blood of healthy volunteers by dextran sedimentation followed by centrifugation over Ficoll–Hypaque as previously described [18–20]. Blood donations were obtained from informed and consenting individuals according to institutionally approved procedures. Cell viability was monitored by trypan blue exclusion and was always [98%. Purity was confirmed by cytology from cytocentrifuged preparations colored by the Hema 3 stain set (Fisher Scientific).

5.3.4 Cell viability

Freshly isolated human neutrophils (10×10^6 cells/ml in RPMI-1640 HEPES-P/S, supplemented with 10% heat-inactivated autologous serum) were treated for 0-24 h with or without increasing concentrations of AuNP (+) or AuNP (-) (0–100 µg/ml), as previously reported with other NP [18, 19, 21, 22]. Cell viability was monitored by trypan blue exclusion. Hereafter, we selected the concentration of 100 µg/ml for the *in vitro* assays not only for comparison purposes with other kinds of NP, but also since we previously used such a concentration for treating human neutrophils with gold NP having a diameter of 20 or 70 nm [14]. For the *in vivo* assay, we also tested a concentration of 500 µg/ml based on our previous study with other NP [23, 24].

5.3.5 Transmission electron microscopy

Freshly isolated human PMNs (10×10^6 /ml) were incubated with 100 µg/ml AuNP (+) or AuNP (-) for 0–24 h, fixed with glutaraldehyde (2.5%), and examined using a Hitachi H-7100 transmission electron microscope at different periods of time as previously published [14].

5.3.6 Determination of neutrophil apoptosis

Apoptosis was evaluated by cytology, as previously published [14, 18, 25]. Neutrophils (10×10^6 cells/ml) were incubated at 37 ° C in 5% CO₂ in 96-well plates for 24 h in the presence of the above buffer (Ctrl), 100 µg/ml AuNP (+), 100 lg/ml AuNP (-), or 1 µg/ml of the potent pro-apoptotic

plant lectin VAA-I [26]. Cells were cytocentrifuged on microscope slides and colored with the Hema-3 staining kit. Apoptosis evaluation was based on the nucleus morphology (400X). The results were expressed as the percentage of neutrophils undergoing apoptosis.

5.3.7 Zymography assay with human neutrophils

Neutrophils were treated with buffer (Ctrl), 100 µg/ml AuNP (+), 100 Ig/ml AuNP (-), or 1 µg/ml VAA-I for 30 min and samples were then centrifuged at 2000 rpm for 10 min at 4 °C. The pellets were discarded and the supernatants (30 µl, corresponding to 50,000 cells) were mixed with 10 µl of a non-reducing buffer (40% glycerol, Tris-HCl 1 M, pH 6.8, SDS 8%) and separated on 10% acrylamide gels containing 0.2% gelatin. Gels were washed twice for 30 min with 2.5% Triton X-100 and incubated overnight in digestion buffer (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM). The gels were then stained with Coomassie blue 0.1% and destained to visualize the matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activities degrading the gelatin present in the gel as previously documented [19].

5.3.8 Chemokine detection

Cells were treated with buffer (Ctrl), 1 µg/ml VAA-I, 100 µg/ml AuNP (+), or 100 µg/ml AuNP(-) for 24 h and the supernatants were pooled (n ≥ 4) and used for the simultaneous detection of the chemokines CXCL8 (IL-8), CCL2 (MCP-1), CCL5 (RANTES), CCL3 (MIP-1a), CCL4 (MIP-1b), CXCL10 (IP-10), CXCL11 (I-TAC), CXCL9 (MIG), CCL11 (eotaxin), CCL17 (TARC), CCL22 (MDC), and CXCL1 (GRO α) by ELISArray using the Human Common Chemokines Multi-Analyte ELISArray Kit MEH-009A (Qiagen Totonto ONT). IL-8 and CXCL1 (GRO α) production. The concentration of IL-8 and GRO α production was determined using a commercially available ELISA kit for IL-8 and for GRO- α (Life Technologies, Carlsbad, CA). Freshly isolated human neutrophils were incubated in the presence of buffer (Ctrl), 1 µg/ml VAA-I, 100 µg/ml AuNP (+), or 100 µg/ml AuNP (-) as above at 37 °C in 5% CO₂ for 24 h in a 24-well plate containing RPMI-1640 supplemented with 5% heat-inactivated fetal calf serum. Supernatants were harvested after centrifugation and stored at -70 °C before performing ELISA.

5.3.9 Neutrophil migration

In vitro chemotaxis was performed in a 48-well microchamber (Neuro Probe Inc., Gaithersburg, MD, USA) using a 3-µm polycarbonate membrane filter as described previously [27]. The bottom wells were loaded with RPMI, with or without agonists (final volume, 25 µl), the polycarbonate

membrane was placed over the wells, and the top layer of the chamber was added over the membrane. Neutrophils (50 μ l from a RPMI suspension of 1×10^6 cells/ml) were added into the upper wells. The chamber was incubated at 37 °C for 60 min in a humidified incubator in the presence of 5% CO₂. Upon the incubation period, the top of the chamber was removed, and the upper side of the membrane was wiped carefully with the rubber scraper provided by the manufacturer. The polycarbonate membrane was fixed in methanol, colored with Hema 3 staining kit, mounted on a glass slide, and examined with a light microscope under 400X magnification. The number of cells in five random fields was counted, and the results were expressed as relative neutrophil migration (number of cells from tested group/number of cells from control). Treatment with the chemoattractant CXCL8/IL-8 (25 nM) was used as a positive control.

5.3.10 Murine air pouch model

CD-1 female mice (6–8 weeks of age) were obtained from Charles River Laboratories (St-Constant, Canada). A period of acclimation of 1 week was allowed to animals prior to initiation of experiments. On days 0 and 3, mice were anesthetized with isofurane and 3 ml of sterile air was injected subcutaneously, in the back, with a 26-gauge needle to form an air pouch as published previously [23, 28]. On day 6, 1 ml of HBSS (Ctrl), 1 μ g/ml LPS, or 100 or 500 μ g/ml of AuNP (+) or AuNP (-) was injected into the air pouch. Mice were killed by CO₂ asphyxiation 6 h after the treatment and the pouches were washed once with 1 ml and then twice with 2 ml of HBSS containing 10 mM EDTA. Exudates were centrifuged at 100 x g for 10 min at 4 ° C and supernatants were collected and stored at -80° C for further analysis. Cells were resuspended at 0.5×10^6 cells/ml, spread onto microscope slides, stained with Hema-Stain (Fisher Scientific, Ottawa, Canada) for identification of leukocyte cell subpopulations, and were counted with a hemocytometer. All experiments were performed as per protocols approved by Animal Use and Care Committees at INRS-Institut Armand-Frappier.

5.3.11 Detection of cytokines/chemokines

Mouse antibody array kit was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN), and all the steps for the simultaneous detection of 40 analytes were performed as per the manufacturer's recommendation and as previously published [28, 29]. These analytes are listed in the corresponding figure. We selected the analytes based on the fact that the kit we used (Mouse cytokine array, panel A array kit) is the one containing the most analytes related to inflammation. Exudates (n \geq 4 mice) were harvested from the different experimental conditions described above

and were pooled to probe the membranes, within 2 weeks following the *in vivo* experiments. This was performed because of the high cost that this will represent for doing antibody array for each animal in each group. The chemiluminescent signals from the bound cytokines present in the exudates were detected by chemiluminescence using ChemiDoc™ MP Imaging System. The signal intensity was normalized to the membrane's positive control. Protein array membranes were scanned and densitometry analysis was performed using the Multi-Analyst program (Bio-Rad, Hercules, CA).

5.3.12 Murine IL-6 and CCL3 (MIP-1a) production

The concentration of IL-6 and MIP-1 α production present in the murine air pouch exudates was determined using a commercially available ELISA kit for IL-6 and for MIP-1 α (Life Technologies).

5.3.13 Statistical analysis

Experimental data are expressed as mean \pm SEM. Oneway ANOVA (Dunnett multiple-comparison test) was performed using Graph-Pad Prism (version 5.01). Differences were considered statistically significant as followed: * $p \leq 0.05$ vs control.

5.4 Results

5.4.1 Characterization and cellular uptake of the AuNP (+) and AuNP (-)

Table 5.1 shows that the data obtained after the DLS analysis. As expected, the zeta potential varies for both AuNP when they are suspended in the culture medium vs water. Some large aggregates were observed only for AuNP (-) whether the NP were suspended in culture medium or in water. In general, the NP suspensions appear relatively monodisperse. Figure 5.1 shows representative images obtained by TEM illustrating that both AuNP (+) and AuNP (-) could be ingested by human neutrophils *in vitro*. Of note, AuNP (+) were more easily observable than AuNP (-), probably because of the presence of small aggregates (Fig. 5.1a, white arrowheads).

5.4.2 Activation of human neutrophils by AuNP (+) and AuNP (-) *in vitro*

We next decided to verify if AuNP will activate human neutrophils *in vitro*. As illustrated in Fig. 5.2a, incubation of neutrophils with AuNP (-) significantly increased the spontaneous rate of apoptosis from $40.6 \pm 2.2\%$ to $56.1 \pm 2.8\%$ (mean \pm SEM, $n = 6$) after 24 h. Although a slight increase was observed when neutrophils were incubated with AuNP(+), this was not significant

(51.8 ± 5.0%). As expected, the plant lectin VAA-I was very efficient to induce apoptosis (95.9 ± 1.5%). Next, by zymography experiments, we determined the gelatinase activity present in the supernatants of AuNP-induced neutrophils after 30 min. As illustrated in Fig. 5.2b, three different regions (lanes 1–3) with gelatinase activity were observed. In comparison with control cells, AuNP (+) were found to significantly increase the gelatinase activity in lanes 1, 2, and 3, while AuNP (-) increase this effect only in lane 3. Using an ELISArray for screening purpose to detect the production of several cytokines and chemokines identified in Fig. 5.3a, we found that AuNP (+), but not AuNP (-), increase the production of IL-8 and Gro-α. We next quantified the production of these two potent chemokines by ELISA, and as shown in Fig. 5.3b, the basal production of IL-8 significantly increases from 277.3 ± 160.8 pg/ml (mean ± SEM, n = 4) to 1770.0 ± 441.8 pg/ml after treatment with AuNP (+). AuNP (-) were also found to increase the IL-8 production, albeit moderately, this was not significant (564.3 ± 254.8 pg/ml). An increase production of GROα was observed in response to VAA-I and AuNP (+), but this was not significant (Fig. 5.3c). The above experiments were conducted after 24 h of treatment with AuNP. We then decided to study the effects of AuNP on a cellular function requiring a shorter period of time of incubation. Chemotaxis was determined after an incubation of human neutrophils for 60 min in the presence of AuNP. As illustrated in Fig. 5.4, both AuNP (+) and AuNP (-) were found to increase chemotaxis. Indeed, the ratio was 1.6 ± 0.1 (mean ± SEM, n = 3) and 1.4 ± 0.07 for AuNP (+) and AuNP (-), respectively. As expected, IL-8, a chemokine that we routinely used as a positive control [27] was found to increase chemotaxis and the ratio was 2.5 ± 0.7.

Table 5.1 Characterization of AuNP (+) and AuNP (-) used in this study

NPs	Size (nm)	% Intensity	PDI	Zeta potential (mV)
AuNP(+)	189 ± 6.9 7.5 ± 13.0	99.3 ± 1.3 0.7 ± 1.3	0.3 ± 0.008	-5.5 ± 0.4 (RPMI) ^a
AuNP(-)	46.7 ± 0.02 3033 ± 2623	95.7 ± 4.1 4.3 ± 4.1	0.5 ± 3.6	-9.7 ± 2.3 (RPMI)
AuNP(+)	58.5 ± 1.9	100 ± 0	0.2 ± 0.01	27.4 ± 1.4 (water)
AuNP(-)	59.20 ± 2.4 5.54 ± 5.0 2941 ± 2547	80.9 ± 11.4 13.6 ± 7.4 4.7 ± 2.7	0.5 ± 0.01 -0.3 ± 0.3	-0.3 ± 0.3 (water)

PDI polydispersity index

a The size distribution and zeta potential of the NP were determined by dynamic light scattering using a Zetasizer Nano-ZS (model ZEN3600) from Malvern Instruments Inc. (Westborough, MA). Measurements (mean ± SD, n = 3) were performed with NP suspended at 100 µg/ml in RPMI-10% fetal beef serum at 37 °C (upper part) or in ultrapure water (bottom part)

b Numbers in bold characters represent the size of the vast majority (% intensity) of the NP suspensions

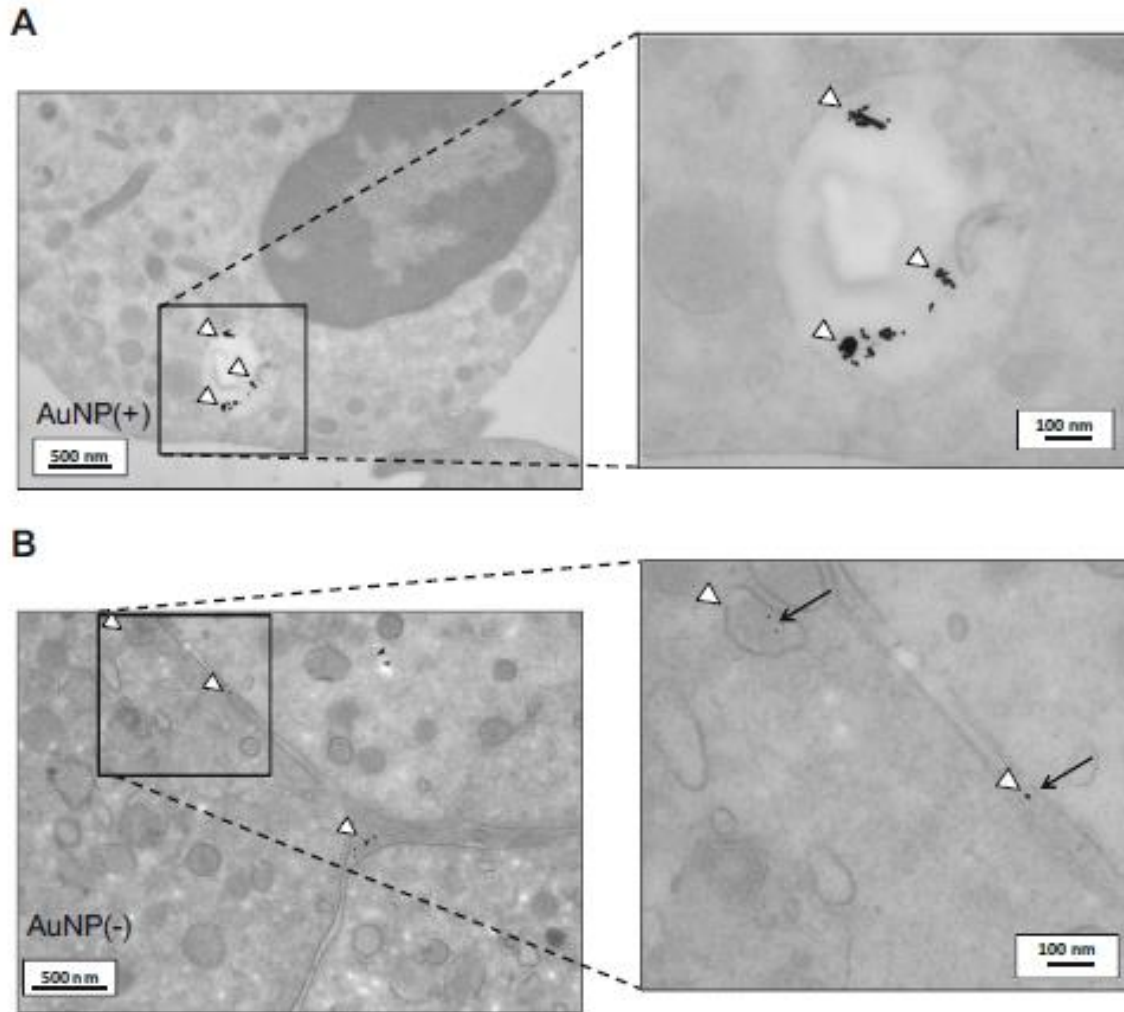


Fig. 5.1 Cellular uptake of AuNP (+) and AuNP (-) by human neutrophils.

The presence of AuNP (+) and AuNP (-) inside the cells was evaluated by transmission electron microscopy, as described in "Materials and methods". Cells (10×10^6 cells/ml) were treated for 24 h with the $100 \mu\text{g/ml}$ of AuNP (+) (a) or AuNP (-) (b) and then prepared for TEM analysis. Data are from one representative blood donor out of three. Of note, AuNP (+) were more easily observable (a white arrowheads) than AuNP (-) that appears more isolated and not aggregated (b small black arrows).

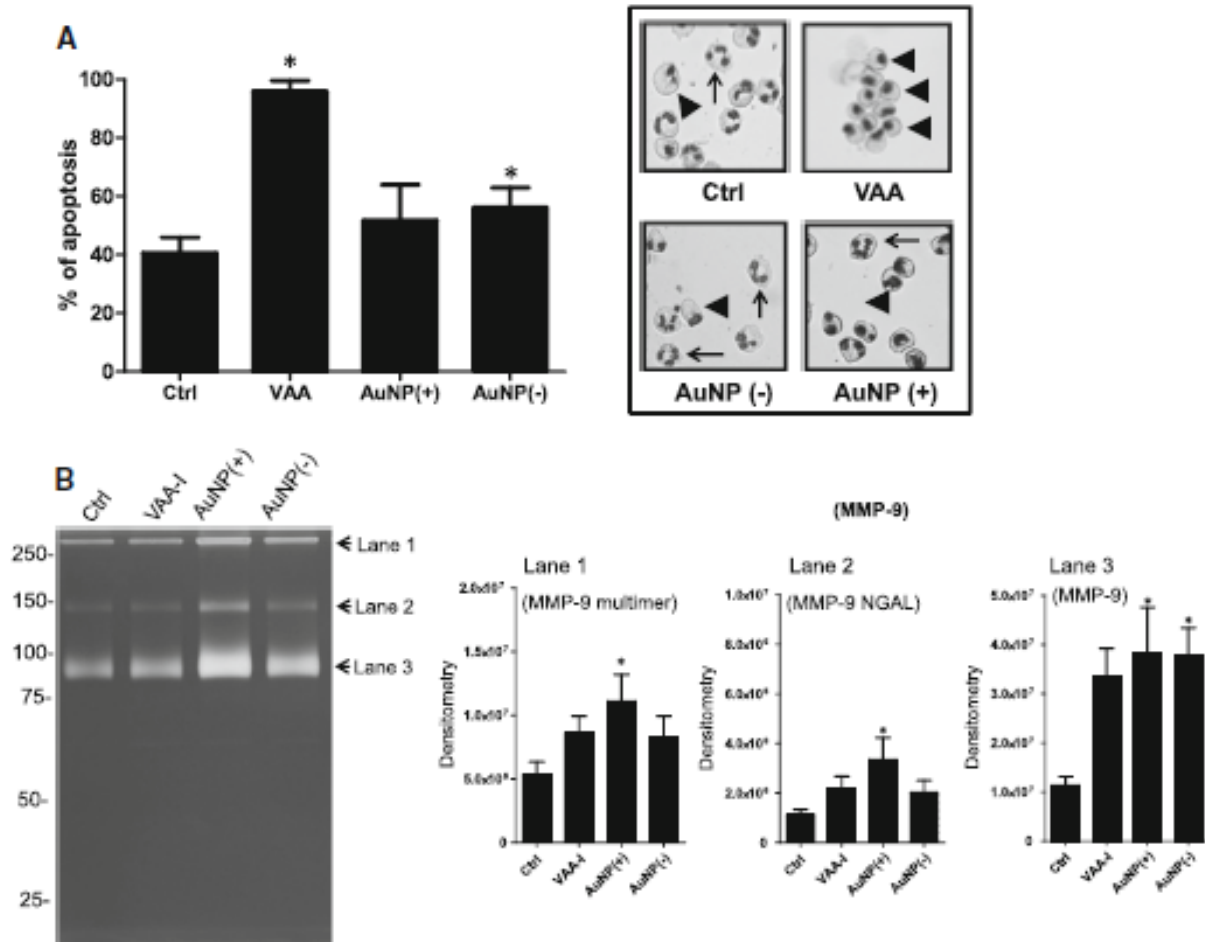


Fig. 5.2 Regulation of apoptosis and gelatinase activity by AuNP.

Freshly isolated human neutrophils were incubated in the presence of buffer (Ctrl), 1 $\mu\text{g/ml}$ VAA-I (VAA), 100 $\mu\text{g/ml}$ AuNP (+), or 100 $\mu\text{g/ml}$ AuNP (-) and apoptosis (a) and gelatinase activity (b) were determined after 24 h and 30 min, respectively, as described in "Materials and methods". a Results are mean \pm SEM (n = 6). Inset, typical images illustrating normal (arrows) and apoptotic (arrowheads) neutrophils. b One representative zymogram out of five others illustrating the three gelatinase activities indicated as lanes 1–3 representing MMP-9 multimer (1), MMP-9 neutrophil gelatinase associated lipocalin complex (MMP-9 NGAL) and MMP-9 monomer, respectively. Right part, bar graphs illustrating the densitometry for each lane (mean \pm SEM, n = 6). *, $p < 0.05$ vs Ctrl

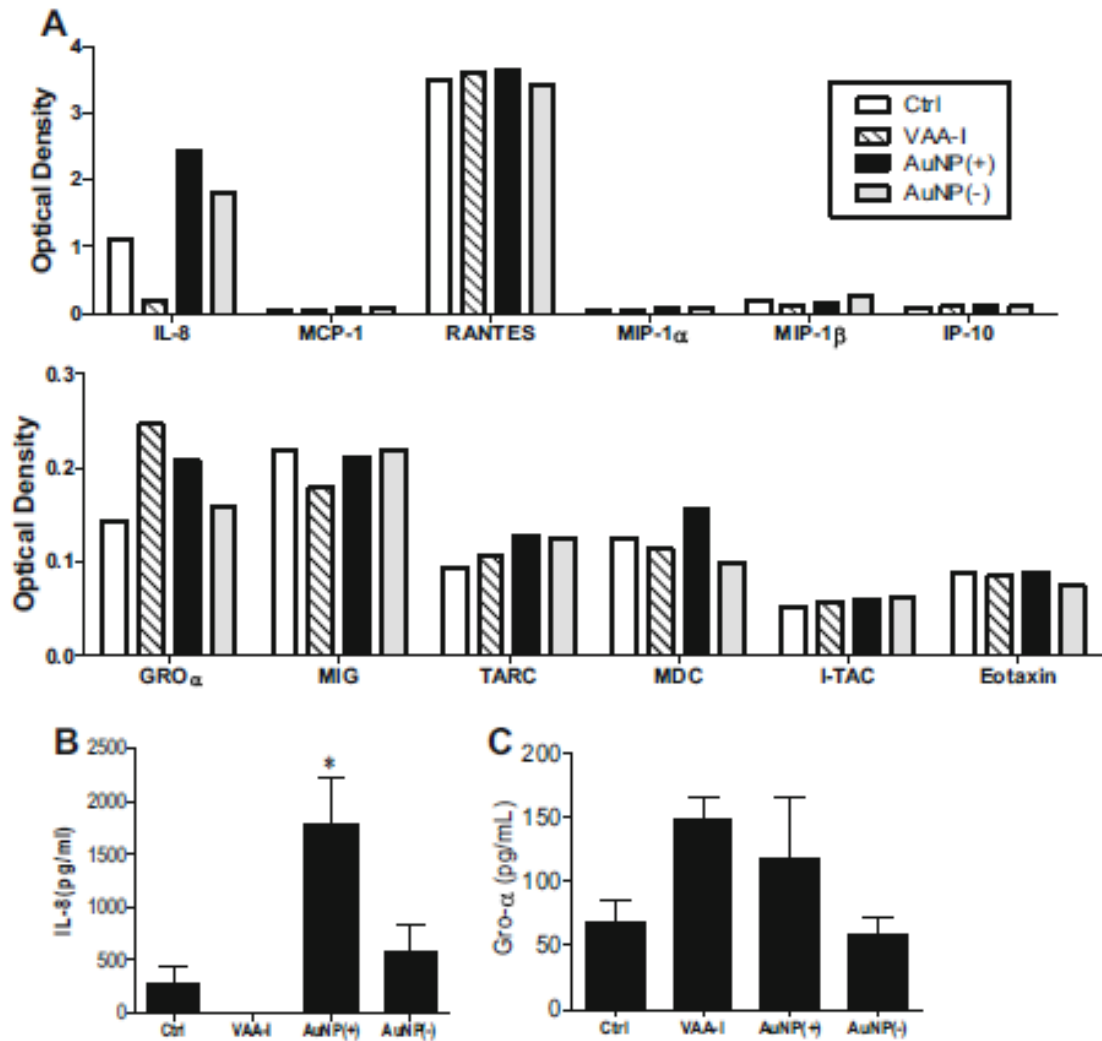


Fig.5.3 Effect of AuNP on the production of chemokines.

Freshly isolated human neutrophils were incubated in the presence of buffer (Ctrl), 1 μ g/ml VAA-I (VAA), 100 μ g/ml AuNP(+), or 100 μ g/ml AuNP(-) for 24 h and the supernatants were harvested (pooled from C \geq 4 donors) and used for the detection of the indicated chemokines using the human common chemokines multi-analyte ELISArray Kit (a) or used individually (not pooled, n \geq 4) for the quantification of IL-8 and Gro- α by ELISA (b) as described in "Materials and methods". *p < 0.05 vs Ctrl

5.4.3 Proinflammatory effects of AuNP (+) and AuNP (-) *in vivo*

The above results clearly indicate that AuNP can activate human neutrophils *in vitro*. The fact that a trend to increase chemotaxis of human neutrophil was observed in response to both AuNP (+) and AuNP (-), prompted us to study potential proinflammatory effect causing leukocyte attraction *in vivo*. Using the murine air pouch model of acute inflammation, we demonstrate that 500 $\mu\text{g/ml}$ AuNP (+) significantly increase the total number of leukocytes into the exudates from 0.23 ± 0.1 (mean \pm SEM, n C 3) to $3.4 \pm 0.9 \times 10^6$ cells/pouch (Fig. 5.5a). Since the majority of leukocytes were found to be neutrophils (inset), the rest being almost exclusively monocytes–macrophages, we next focus on the neutrophilic inflammation induced by AuNP (+). As illustrated in Fig. 5.5b, the number of neutrophils counted in the exudates significantly increased from 0.12 ± 0.06 to $2.5 \pm 0.8 \times 10^6$ cells/pouch. Using the same approach, AuNP (-) were also found to increase the total number of leukocytes from 1.4 ± 0.4 to $3.7 \pm 1.4 \times 10^6$ cells/pouch (Fig. 5.5c) as well as neutrophils from 0.6 ± 0.2 to $3.0 \pm 1.5 \times 10^6$ cells/pouch (Fig. 5.5d). However, although a clear tendency was observed, this was not statistically different. In these experiments, 3–5 mice were treated with LPS, as a positive control, and the number of leukocytes attracted into air pouches was always greater than 7×10^6 cells/pouch, where more than 85% were neutrophils (data not shown). Using an antibody array approach for the simultaneous detection of several analytes present in the exudates, we demonstrate that treatments with AuNP (+) were more potent than AuNP (-) such as for IP-10 (D1, D2), KC (D5–D6), M-CSF (D7–D8), and MCP-5 (D11–D12) as examples (Fig. 5.6). Of note, the production of these cytokines/chemokines induced by AuNP (+) was even higher than that induced by the positive control LPS. However, as expected, LPS treatment was found to increase the production of several analytes present in the air pouch exudates. Of interest, LPS but not AuNP, was found to markedly increase the production of RANTES (D21, D22), indicating a certain selectivity (black arrow, Fig. 5.6b). The ratios for all analytes are shown in Table 5.2. Because of the well-known association of IL-6 with inflammation and the potent chemotactic effect of MIP-1 α , we next quantified the amount of these two mediators present in the exudates by ELISA. As illustrated in Fig. 5.6c, although the basal concentration of IL-6 increased from 38.5 ± 9.8 pg/ml (mean \pm SEM, n = 7) to 768.6 ± 599.9 pg/ml (n = 4) and to 294.0 ± 124.8 pg/ml (n = 6) after treatment with AuNP (-) and AuNP (+), respectively, the results were extremely variable and, therefore, not statistically different. For MIP-1 α , the basal concentration observed in controls significantly increased from 9.9 ± 3.5 pg/ml (mean \pm SEM, n = 7) to 95.4 ± 37.2 pg/ml (n = 5) after treatment with AuNP (-). Although the concentration of MIP-1 α was increased to 62.8 ± 20.9 pg/ml (n = 6) after treatment with AuNP (+), this was not significant. Although the data observed on the membranes after the antibody array assay (intensities of the spots, Fig. 5.6b) correlate well with

the vast majority of the calculated ratios illustrated in Table 5.2, the results obtained by ELISA do not necessarily correlate. For example, while the ratio for IL-6 after treatment with AuNP (+) is greater than that after treatment with AuNP (-), the contrast is observed after performing ELISA, while the measured IL-6 concentration is higher after AuNP (-) vs AuNP (+) (Fig. 5.6c).

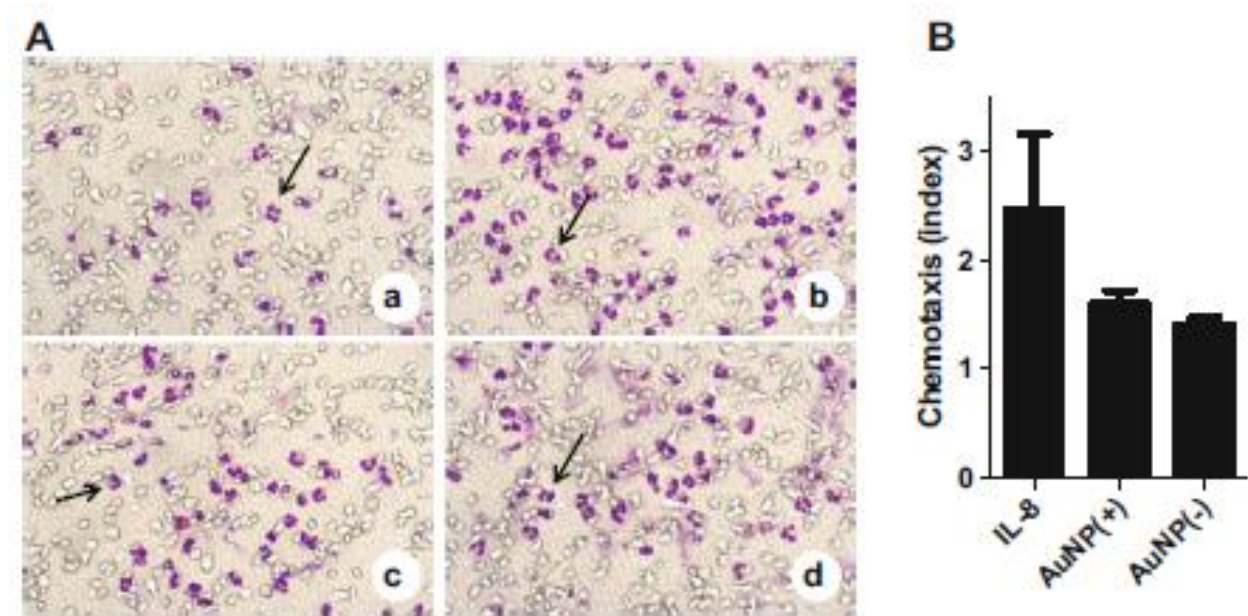


Fig. 5.4 AuNP (+) and AuNP (-) induce migration of human neutrophils.

Freshly isolated human neutrophils were incubated with 25 nM IL-8, 100 $\mu\text{g/ml}$ AuNP (+), or 100 $\mu\text{g/ml}$ AuNP (-) for 60 min and chemotaxis was determined, as described in "Materials and methods". a Typical images illustrating neutrophils on the membrane (see black arrows as examples) after treatment with buffer (a), 25 nM IL-8 (b), 100 $\mu\text{g/ml}$ AuNP (+) (c), or 100 $\mu\text{g/ml}$ AuNP (-) (d). White irregular holes correspond to empty pores. b Bar graph plotting the results illustrated as ratios (vs controls). Results are mean \pm SEM ($n = 3$)

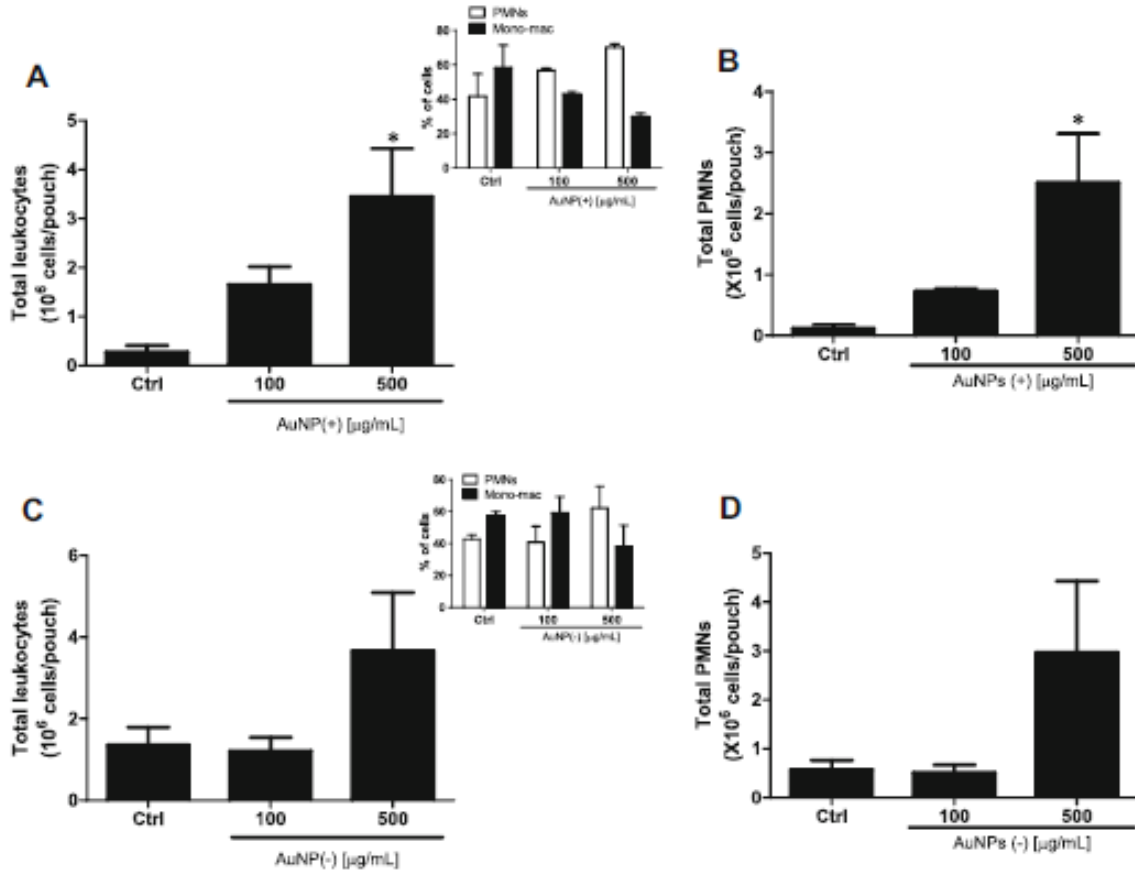


Fig. 5.5 Effect of AuNP administration in the murine air pouch model.

AuNP (+) and AuNP (-) were administered into murine air pouches at the indicated concentrations and exudates were harvested after 6 h and leukocyte infiltration was then determined, as described in “Materials and methods”. The total leukocyte numbers and differential counts (% of monocytes–macrophages, mono/Mac, and PMNs) were determined (a, c) as well as the total numbers of polymorphonuclear neutrophil cells (b, d). Results are mean \pm SEM [n = 3–4 mice for Ctrl and 5 mice for AuNP (+) and AuNP (-)]. *p < 0.05 vs Ctrl

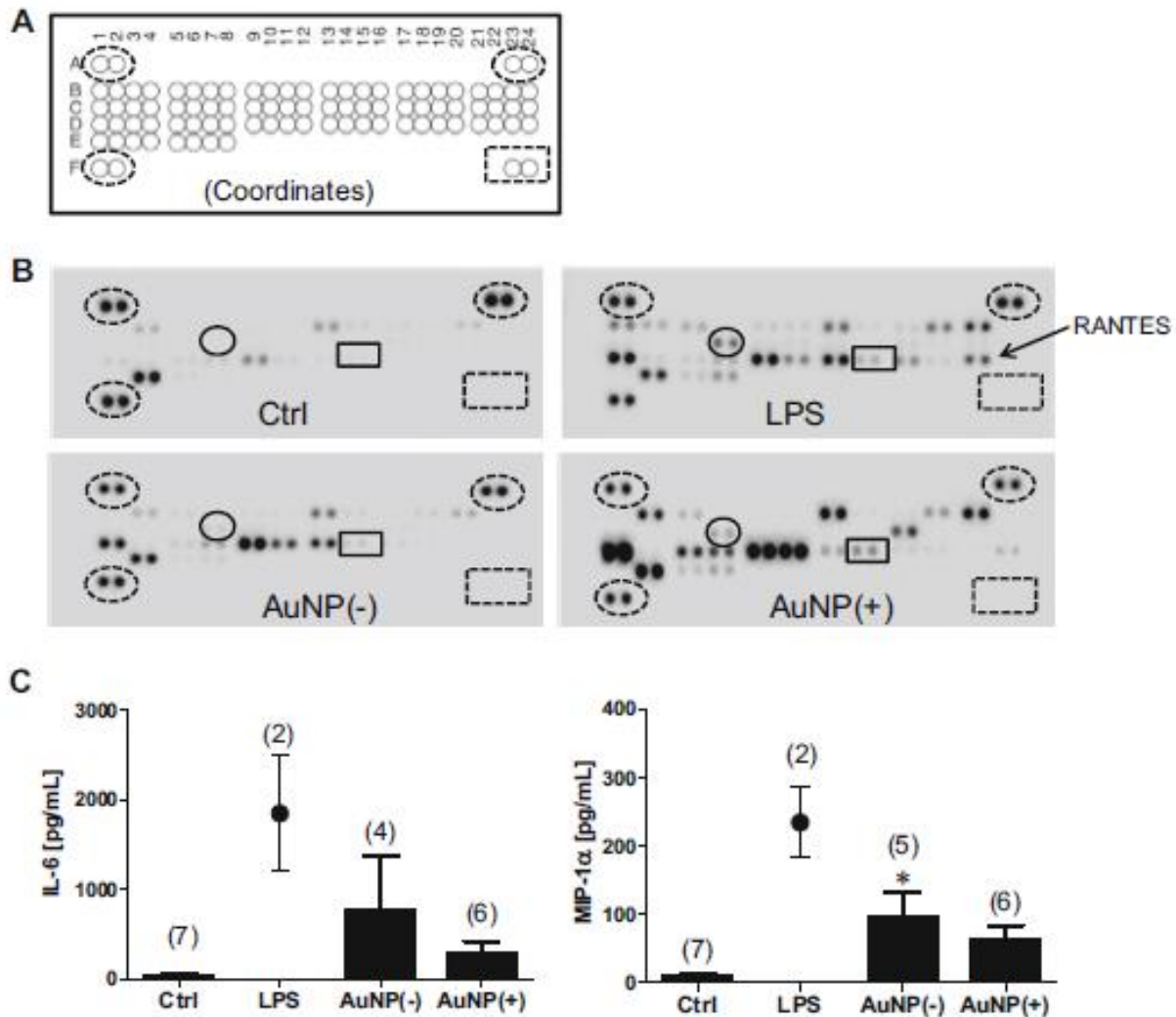


Fig. 5.6 AuNP (+) and AuNP (-) induce the local production of several cytokines and chemokines.

An antibody array assay was performed with the murine air pouch exudates harvested after 6 h, as described in "Materials and methods". a Coordinates of the different analytes on the membranes are: Positive Ctrl (A1–A2); Positive Ctrl (A23–A24); BCL (B1–B2); C5/C5a (B3–B4); G-CSF (B5–B6); GMCSF (B7–B8); I-309 (B9–B10); Eotaxin (B11–B12); sICAM-1 (B13–B14); INF-c (B15–B16); IL-1a (B17–B18); IL-1b (B19–B20); IL-1ra (B21–B22); IL-2 (B23–B24); IL-3 (C1–C2); IL-4 (C3–C4); IL-5 (C5–C6); IL-6 (C7–C8); IL-7 (C9–C10); IL-10 (C11–C12); IL-13 (C13–C14); IL-12p70 (C15–C16); IL-16 (C17–C18); IL-17 (C19–C20); IL-23 (C21–C22); IL-27 (C24–C25); IP-10 (D1–D2); I-TAC (D3–D4); KC (D5–D6); M-CSF (D7–D8); JE (D9–D10); MCP-5 (D11–D12); MIG (D13–D14); MIP-1a (D15–D16); MIP-1b (D17–D18); MIP-2 (D19–D20); RANTES (D21–D22); SDF-1 (D23–D24); TARC (E1–E2); TIMP-1 (E3–E4); TNF-α (E5–E6); TREM-1 (E7–E8); Positive Ctrl (F1–F2); and Negative Ctrl (F23–F24). b Raw data on the membrane obtained after the indicated treatment. The positive (dotted circles) and negative (dotted rectangles) controls are indicated as well as IL-6 (circles) and MIP-1a (rectangles). Arrow the position of RANTES detected in response to LPS but not AuNP (+) and AuNP (-). c Supernatants were used to measure the concentration of IL-6 and MIP-1α by ELISA. Numbers between parentheses are the number of mice. Because we frequently use LPS as positive control and to minimize the number of animals, we use only two mice for this condition that were not included in the statistical analysis (circle)

Table 5.2 Ratios for all tested analytes detected in the murine air pouch fluids

Analytes	LPS	AuNP(+)	AuNP(-)
BCL	43.4	1.6	3.8
CS/CSa	1.8	11.1	2.9
G-CSF	36.2	31.2	13.5
GM-CSF	3.0	-0.4	2.4
1-309	6.6	-0.4	3.9
Eotaxin	68.0	-8.8	35.2
sKAM-1	3.0	11.1	4.8
INF- γ	1.2	0.8	2.2
IL-1 α	3.9	4.4	1.6
IL-1 β	52.5	45.0	10.2
IL-1 α	12.5	29.5	5.3
IL-2	2.2	1.1	2.7
IL-3	4.1	3.4	5.1
IL-4	2.4	3.1	2.3
IL-5	5.0	-2.4	3.0
IL-6	137.6	93.8	37.6
IL-7	1.9	1.4	6.9
IL-10	15.2	-0.3	18.8
IL-13	8.1	0.9	12.8
IL-12p70	4.7	-1.5	5.2
IL-16	5.6	74.1	4.1
IL-17	4.0	-0.1	2.7
IL-23	16.7	-0.5	4.1
IL-27	5.3	-0.1	3.5
IP-10	38.7	111.1	50.7
I-TAC	1.4	1.0	1.3
KC	2.8	40.6	4.6
M-CSF	4.6	18.7	8.6
JE	5.8	13.4	16.8
MCP-5	13.9	105.3	41.3
MIG	67.3	20.1	86.4
MIP-1 α	14.1	33.2	10.5
MIP-1 β	144.3	33.0	31.1
MIP-2	17.7	13.2	6.8
RANTES	254.7	2.1	6.1
SDF-1	20.1	176.4	23.7
TARC	2.4	-0.4	3.3
TIMP-1	0.9	2.8	2.0
TNF- α	4.4	6.5	2.1
TREM-1	34.3	31.0	12.4

The data are illustrated as ratios (signal of tested group/Ctrl)

5.5 Discussion

In this study, we were interested in investigating if AuNP (+) and AuNP (-) can differently alter the biology of neutrophils in vitro and in vivo. Our results indicating that both AuNP (+) and AuNP (-) could be ingested by human neutrophils in vitro are in agreement with our previous study showing that AuNP20 and AuNP70 could also be ingested by these cells [14]. To the best of our knowledge, there is no other study investigating the direct effect of AuNP on human neutrophils. Since AuNP20 and AuNP70 used in this latter study were capped/stabilized with tannic acid and negatively charged, the fact that AuNP (+) used in this present study, as well as AuNP (-), were also ingested by human neutrophils, indicating that these cells can ingest similarly AuNP that are negatively or positively charged. However, we are aware that the presence of human serum in medium can modify not only the initial size but also the charges (see data from DLS analysis). Nevertheless, the differences observed here between the capacity of AuNP (+) and AuNP (-) to alter the biology of neutrophils could not be linked to a different uptake capacity of AuNP. However, by a yet an unknown mechanism, AuNP (-) were found to significantly induce apoptosis, but not AuNP (+). These results are also in agreement with those that we previously reported, indicating that both AuNP20 and AuNP70 (negatively charged) were proapoptotic for neutrophils [14]. We have also evaluated apoptosis in parallel with another method based on CD16 shedding by flow cytometry, a good marker of apoptotic human neutrophils [30] that we routinely used in our laboratory [14, 31–33]. However, we failed to observe CD16 shedding (data not shown). Of note, this is not without any precedent, since the same observation was recently made by us when testing AuNP20 and AuNP70 known to induce neutrophil apoptosis [14]. The reason is still unclear and needs to be determined. Although both AuNP (+) and AuNP (-) were found to increase gelatinase activity, AuNP (+) were clearly more potent. We cannot make any comparison of these results with other studies even our own, since gelatinase activity in AuNP20- and AuNP70-induced neutrophils was not tested. However, this is not without any precedent, since we previously documented that at least titanium dioxide (TiO₂), cerium dioxide (CeO₂), and zinc oxide (ZnO) nanoparticles increased neutrophil's gelatinase activity [19]. AuNP (+) were found to be more proinflammatory than AuNP (-) based on the cytokine production. Indeed, AuNP (+) markedly increased the production of IL-8 and Gro- α , although not significantly for this latter. However, according to the ELISArray used in this study allowing the detection of 12 cytokines/chemokines involved in inflammation, AuNP (+) seems to increase the production of only IL-8 and Gro- α when compared with AuNP(-). Yet, the ability of AuNP to induce the production of cytokines/ chemokines by human neutrophils has never been reported.

In fact, very few studies reported the effect of AuNP on the cytokine production in primary human cells. This is curious knowing the great interest to use AuNP in medicine such as for drug delivery [1, 3]. However, one study reported that AuNP10 did not increase the production of IL-1b in primary human monocytes, as assessed by ELISA [34]. In murine RAW 264.7 macrophage cells, citrate-coated AuNP (10 and 300 nm) did not increase the production of TNF- α , IL-6, and IL-10 [35]. Therefore, to date, AuNP do not increase the production of many cytokines by primary human cells, but probably a limit number. However, other studies need to be performed before drawing a clear conclusion. Our results indicating that both AuNP (+) and AuNP (-) increase slightly chemotaxis, together with the fact that they increase the production of at least two chemokines (IL-8 and GRO- α) and correlate well with their ability to increase a neutrophilic inflammation *in vivo*. The murine air pouch model of acute inflammation was recently proposed as a model to be included in the quality control of nanoparticles [36, 37]. For example, probably, the first utilization of this model for investigating the proinflammatory activity of a given NP was done by our team, where we documented that administration of TiO₂ NP into air pouches induces a neutrophilic infiltration and a local production of many cytokines/chemokines [28]. More recently, we demonstrated that different generations of polyamidoamine (PAMAM) dendrimers, devoid of any delivering molecules, possess proinflammatory activities *in vivo* by themselves by attracting leucocytes, mainly neutrophils [23]. In the present study, the direct administration of AuNP (+) into air pouches also resulted in a leukocyte infiltration, where the vast majority of cells was neutrophils, the rest being almost exclusively monocytes–macrophages. Although AuNP (-) act similar to AuNP (+) in terms of leucocyte infiltration, the results were not significant, but a clear tendency was noted, where neutrophils were the predominant cell type observed in the exudates. Therefore, both AuNP (+) and AuNP (-) induce a neutrophilic inflammation as previously observed with other types of NP, including TiO₂ [28] and PAMAM [23]. Clearly, based on an antibody array approach, AuNP (+) were more potent than AuNP (-) for increasing the local production of cytokines/chemokines detected in the murine air pouch fluids in terms of signal intensities. However, the profiles induced by AuNP (+) and AuNP (-) are similar each other, but distinct than the one observed in response to LPS. Of note, although the signal intensities appear more intense for IL-6 and MIP-1 α on the membrane after treatment with AuNP (+) vs AuNP (-), we have to take into account also the different intensities observed with the internal controls for each membrane. This could explain why the concentrations measured by ELISA are, inversely, moderately higher with AuNP (-) vs AuNP (+). In addition, this could be explained by the sensitivity of the technique and the variability from donors to donors that could be noted with ELISA. Indeed, by this latter method, each sample is tested individually unlike the antibody array approach in which the

different samples were rather pooled (pooling 4–6 samples). Therefore, we propose to use an increase number of samples to be pooled in future to perform antibody array for screening purposes. However, we believe that ELISA remains the gold standard method for measuring the concentration of a given analyte (cytokine/ chemokine) present in each sample to be tested. This is the first study investigating in parallel, the role of AuNP (+) and AuNP (-) on the biology of neutrophils. *In vitro*, both AuNP are ingested by human neutrophils, and they enhance spontaneous apoptosis, increase the gelatinase activity and the production of some chemokines, and induce migration, albeit at different degrees. *In vivo*, AuNP induce a leukocyte infiltration in the murine air pouch model, where the vast majority of cells are neutrophils and increase the local production of cytokines and chemokines. Collectively, our results demonstrate that AuNP (+) and AuNP (-) possess proinflammatory activities *in vitro* and *in vivo*.

5.6 Acknowledgements

The study was partially supported by Grants from the Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST).

5.7 BIBLIOGRAPHIE 2^E ARTICLE

1. Almeida JP, Figueroa ER, Drezek RA. Gold nanoparticle mediated cancer immunotherapy. *Nanomedicine*. 2014;10:503–14.
2. Coelho SC, Rocha S, Juzenas P, Sampaio P, Almeida GM, Silva FS, et al. Gold nanoparticle delivery-enhanced proteasome inhibitor effect in adenocarcinoma cells. *Expert Opin Drug Deliv*. 2013;10:1345–52.
3. Chandolu V, Dass CR. Treatment of lung cancer using nanoparticle drug delivery systems. *Curr Drug Discov Technol*. 2013;10:170–6.
4. Tarasova NK, Gallud A, Ytterberg AJ, Chernobrovkin A, Aranzaes JR, Astruc D, et al. Cytotoxic and proinflammatory effects of metal-based nanoparticles on THP-1 monocytes characterized by combined proteomics approaches. *J Proteome Res*. 2017;16:689–97.
5. Choi SY, Jeong S, Jang SH, Park J, Park JH, Ock KS, et al. In vitro toxicity of serum protein-adsorbed citrate-reduced goldnanoparticles in human lung adenocarcinoma cells. *Toxicol In Vitro*. 2012;26:229–37.
6. Choi K, Riviere JE, Monteiro-Riviere NA. Protein corona modulation of hepatocyte uptake and molecular mechanisms of gold nanoparticle toxicity. *Nanotoxicology*. 2017;11:64–75.
7. Hussain S, Vanoirbeek JA, Luyts K, De Vooght V, Verbeken E, Thomassen LC, et al. Lung exposure to nanoparticles modulates an asthmatic response in a mouse model. *Eur Respir J*. 2011;37:299–309.
8. Deng ZJ, Liang M, Monteiro M, Toth I, Minchin RF. Nanoparticle-induced unfolding of fibrinogen promotes Mac-1 receptor activation and inflammation. *Nat Nanotechnol*. 2011;6:39–44.
9. Cho WS, Cho M, Jeong J, Choi M, Cho HY, Han BS, et al. Acute toxicity and pharmacokinetics of 13 nm-sized PEG-coated gold nanoparticles. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009;236:16–24.
10. Sumbayev VV, Yasinska IM, Garcia CP, Gilliland D, Lall GS, Gibbs BF, et al. Gold nanoparticles downregulate interleukin-1beta-induced pro-inflammatory responses. *Small*. 2013;9:472–7.
11. Tsai CY, Shiau AL, Chen SY, Chen YH, Cheng PC, Chang MY, et al. Amelioration of collagen-induced arthritis in rats by nanogold. *Arthritis Rheum*. 2007;56:544–54.
12. Labens R, Lascelles BD, Charlton AN, Ferrero NR, Van Wettere AJ, Xia XR, et al. Ex vivo effect of gold nanoparticles on porcine synovial membrane. *Tissue Barriers*. 2013;1:e24314.
13. Zhang XD, Wu D, Shen X, Liu PX, Yang N, Zhao B, et al. Sizedependent in vivo toxicity of PEG-coated gold nanoparticles. *Int J Nanomed*. 2011;6:2071–81.
14. Noel C, Simard JC, Girard D. Gold nanoparticles induce apoptosis, endoplasmic reticulum stress events and cleavage of cytoskeletal proteins in human neutrophils. *Toxicol In Vitro*. 2016;31:12–22.
15. Bartneck M, Keul HA, Singh S, Czaja K, Bornemann J, Bockstaller M, et al. Rapid uptake of gold nanorods by primary human blood phagocytes and immunomodulatory effects of surface chemistry. *ACS Nano*. 2010;4:3073–86.

16. Della Coletta AM, Bachiega TF, de Quaglia e Silva JC, Soares AM, De Faveri J, Marques SA, et al. Neutrophil extracellular traps identification in tegumentary lesions of patients with paracoccidioidomycosis and different patterns of NETs generation in vitro. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9:e0004037.
17. Bartneck M, Keul HA, Zwadlo-Klarwasser G, Groll J. Phagocytosis independent extracellular nanoparticle clearance by human immune cells. *Nano Lett*. 2010;10:59–63.
18. Poirier M, Simard JC, Antoine F, Girard D. Interaction between silver nanoparticles of 20 nm (AgNP20) and human neutrophils: induction of apoptosis and inhibition of de novo protein synthesis by AgNP20 aggregates. *J Appl Toxicol*. 2014;34:404–12.
19. Babin K, Antoine F, Goncalves DM, Girard D. TiO₂, CeO₂ and ZnO nanoparticles and modulation of the degranulation process in human neutrophils. *Toxicol Lett*. 2013;221:57–63.
20. Simard JC, Simon MM, Tessier PA, Girard D. Damage-associated molecular pattern S100A9 increases bactericidal activity of human neutrophils by enhancing phagocytosis. *J Immunol*. 2011;186:3622–31.
21. Arora S, Jain J, Rajwade JM, Paknikar KM. Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009;236:310–8.
22. Rosas-Hernandez H, Jimenez-Badillo S, Martinez-Cuevas PP, Gracia-Espino E, Terrones H, Terrones M, et al. Effects of 45-nm silver nanoparticles on coronary endothelial cells and isolated rat aortic rings. *Toxicol Lett*. 2009;191:305–13.
23. Durocher I, Girard D. In vivo proinflammatory activity of generations 0-3 (G0-G3) polyamidoamine (PAMAM) nanoparticles. *Inflamm Res*. 2016;65:745–55.
24. Goncalves DM, Girard D. Evidence that polyhydroxylated C60 fullerenes (fullerenols) amplify the effect of lipopolysaccharide to induce rapid leukocyte infiltration in vivo. *Chem Res Toxicol*. 2013;26:1884–92.
25. Goncalves DM, Girard D. Zinc oxide nanoparticles delay human neutrophil apoptosis by a de novo protein synthesis-dependent and reactive oxygen species-independent mechanism. *Toxicol In Vitro*. 2014;28:926–31.
26. Savoie A, Lavastre V, Pelletier M, Hajto T, Hostanska K, Girard D. Activation of human neutrophils by the plant lectin *Viscum album* agglutinin-I: modulation of de novo protein synthesis and evidence that caspases are involved in induction of apoptosis. *J Leukoc Biol*. 2000;68:845–53.
27. Ratthe C, Pelletier M, Roberge CJ, Girard D. Activation of human neutrophils by the pollutant sodium sulfite: effect on cytokine production, chemotaxis, and cell surface expression of cell adhesion molecules. *Clin Immunol*. 2002;105:169–75.
28. Goncalves DM, Girard D. Titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles induce neutrophil influx and local production of several proinflammatory mediators in vivo. *Int Immunopharmacol*. 2011;21:21.
29. Ratthe C, Ennaciri J, Garces Goncalves DM, Chiasson S, Girard D. Interleukin (IL)-4 induces leukocyte infiltration in vivo by an indirect mechanism. *Mediat Inflamm*. 2009;2009:193970.
30. Dransfield I, Buckle AM, Savill JS, McDowall A, Haslett C, Hogg N. Neutrophil apoptosis is associated with a reduction in CD16 (Fc gamma RIII) expression. *J Immunol*. 1994;153:1254–63.
31. Liz R, Simard JC, Leonardi LB, Girard D. Silver nanoparticles rapidly induce atypical human neutrophil cell death by a process involving inflammatory caspases and reactive oxygen species

and induce neutrophil extracellular traps release upon cell adhesion. *Int Immunopharmacol.* 2015;28:616–25.

32. Moisan E, Girard D. Cell surface expression of intermediate filament proteins vimentin and lamin B1 in human neutrophil spontaneous apoptosis. *J Leukoc Biol.* 2006;79:489–98.

33. Pelletier M, Bouchard A, Girard D. In vivo and in vitro roles of IL-21 in inflammation. *J Immunol.* 2004;173:7521–30.

34. Li Y, Italiani P, Casals E, Valkenburg D, Mertens I, Baggerman G, et al. Assessing the immunosafety of engineered nanoparticles with a novel in vitro model based on human primary monocytes. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2016;8(42):28437–28447

35. Bancos S, Stevens DL, Tyner KM. Effect of silica and gold nanoparticles on macrophage proliferation, activation markers, cytokine production, and phagocytosis in vitro. *Int J Nanomed.* 2015;10:183–206.

36. Vandooren J, Berghmans N, Dillen C, Van Aelst I, Ronsse I, Israel LL, et al. Intradermal air pouch leukocytosis as an in vivo test for nanoparticles. *Int J Nanomed.* 2013;8:4745–56.

37. Girard D. Using the air pouch model for assessing in vivo inflammatory activity of nanoparticles. *Int J Nanomed.* 2014;9:1105–7.

CHAPITRE 6 : DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

La médecine moderne évolue rapidement et la recherche pour découvrir de nouvelles technologies ou de nouveaux traitements pourrait tirer avantage de l'utilisation de NP. Toutefois, la petite taille de ces NP leur confère de nouvelles propriétés, et malgré que ce soit en partie pour cette raison qu'elles sont attrayantes, ceci pourrait modifier leur biocompatibilité et leurs interactions au niveau cellulaire. Pour ce projet, nous avons sélectionné deux types de NP : quatre générations de dendrimères PAMAM, G0; G1; G2 et G3; et des NP d'or chargées positivement (AuNP +) ou chargées négativement (AuNP -).

En fonction des tests, des modèles utilisés et des limitations du nombre de neutrophile humain disponible pour effectuer les expérimentations, nous avons sélectionné différentes doses à tester.

Pour sélectionner ces doses, nous avons dans un premier temps tenté de nous baser sur les doses qui pourraient être utilisées dans les différentes applications, puisque les données sur les effets que pourraient avoir ces NP sur les cellules neutrophiles sont inexistantes dans la littérature. Ces doses sont cependant très difficiles à évaluer, car elles peuvent varier en fonction de l'application et souvent, lorsque les NP sont utilisées en combinaison avec des médicaments, la dose mentionnée dans ces études est celle de la formulation NP-médicament et pas uniquement la NP, ce qui rend difficile l'évaluation de la concentration exacte de la NP. Nous nous sommes aussi basés sur les doses utilisées dans d'autres études similaires, c'est-à-dire sur des études qui considéraient également l'impact de ces NP, mais sur d'autres types cellulaires, ou encore les doses utilisées lors d'études avec d'autres NP sur les cellules neutrophiles. Il faut toutefois mentionner qu'il est difficile de comparer les études entre elles, car non seulement les conditions varient énormément en fonction du type de cellules utilisées et des tests effectués, mais aussi à cause des paramètres intrinsèques des NP, comme discuté dans l'introduction de cette thèse, qui varient beaucoup. Les premiers tests afin de valider ces doses ont été des tests de viabilité cellulaire, afin de s'assurer que les tests de fonctions des neutrophiles soient réalisés avec des cellules viables. Ensuite, en fonction des résultats, jusqu'à quatre doses ont été étudiées *in vitro* (10, 100, 500 et 1000 µg/ml) pour les PAMAM ou des doses de 100 ou 500 µg/ml pour les AuNP. Deux doses ont été testées *in vivo* (100 et 500 µg/ml). Les résultats sont présentés dans les deux articles scientifiques publiés (chapitre 4 et 5) ainsi que dans l'Annexe 1.

6.1 Caractérisation des NP

L'une des premières étapes lorsque nous débutons les tests avec les NP est une caractérisation. Comme mentionné dans l'introduction, les propriétés physico-chimiques des NP peuvent varier en fonction de plusieurs paramètres, dont le milieu dans lequel nous effectuons les tests ou la dilution des NP dans d'autres tampons. Bien que nous ne synthétisions pas les NP, il est tout de même essentiel d'évaluer un minimum de ces propriétés afin de voir si les tailles varient des données provenant du fabricant lorsqu'elles se retrouvent dans les divers milieux dans lesquels nous les testons.

Néanmoins, même si la taille, l'agrégation ou le potentiel zêta changent lorsque l'on utilise, par exemple, du sérum ou divers milieux de culture, il faut tester ces NP dans des conditions expérimentales les plus proches de la réalité. En effet, il a été prouvé que les protéines du sérum, notamment l'albumine, peuvent fortement interagir avec les NP, dont les PAMAM et les AuNP (Barbara Klajnert *et al.*, 2003, Sen *et al.*, 2011, Shcharbin *et al.*, 2007, Gongke Wang *et al.*, 2019). Le sérum est toutefois essentiel à la bonne survie des neutrophiles lors des tests alors bien que cela modifie certains paramètres et les interactions des NP, leur présence est nécessaire. D'autant plus que dans le corps humain ou dans les modèles *in vivo*, les NP peuvent également entrer en contact avec les diverses protéines du sang.

La distribution des tailles que nous avons observée lors des analyses au DLS (*dynamic light scattering*) révèle une variation en fonction des concentrations des NP et du milieu dans lequel se trouvent les NP. Lorsque les PAMAM des quatre générations (G0 à G3) sont analysées sans aucune dilution ou ajout de milieu quelconque, c'est-à-dire uniquement la solution obtenue du fabricant, plus de 80% des PAMAM ont de très petites tailles allant de 1,1nm (G0), 1,5nm (G1), 1,3nm (G2) et 2,4nm (G3). Ces données varient légèrement de leur taille théorique, qui sont de 1,5nm (G0), 2,2nm (G1), 2,9nm (G2) et 3,6nm (G3) (Donald A Tomalia, 2004). Ceci peut s'expliquer par le fait que la distribution des tailles mesurée par DLS est la taille hydrodynamique de tout l'échantillon, et non pas la taille de chaque NP individuelle, ce qui peut être moins précis. De plus, il est possible de modifier certains paramètres lors de la lecture des échantillons et d'utiliser les volumes plutôt que la mesure d'intensité qui peut augmenter l'intensité des tailles à cause des agrégats ou des plus grosses particules (Kaszuba *et al.*, 2008). D'autres analyses en microscopie électronique ou avec un appareil d'analyse du suivi individuel de particules (NTA-*Nanoparticle Tracking Analysis*) comme un NanoSight, permettraient de valider les tailles. Toutefois, le but de cette thèse n'est pas de synthétiser des NP et d'obtenir des NP de taille correspondant parfaitement à la théorie. Au contraire, il incombe de tester les NP dans leurs

conditions réelles, afin d'avoir une meilleure idée de leur comportement. Bien que le DLS ne soit pas la méthode la plus précise pour évaluer la taille de très petites NP (moins de 10nm), il peut nous fournir une estimation adéquate des tailles de nos échantillons, surtout lorsque les NP sont diluées dans divers milieux. C'est pour cette même raison que nous avons surtout testé les différentes NP aux dilutions utilisées lors de nos tests *in vitro* et *in vivo*. Lorsque diluées, les tailles des données recueillies au DLS sont beaucoup plus grosses et la distribution est moins uniforme. Pour les PAMAM, nous avons observé que les dilutions de 100 et 500 µg/ml augmentent le diamètre hydrodynamique et que pour la majorité des échantillons testés il y a moins de 25% des tailles qui sont entre 1 et 5nm, voire aucune pour G2-100 µg/ml, G1-500 µg/ml et G3-500µg/ml. Pour les AuNP, nous avons observé des diamètres hydrodynamiques d'environ 58,5nm (AuNP+) et 59,20nm (AuNP-) lorsque dilués dans de l'eau (100 µg/ml); et de 189nm (AuNP+) et 46,7 (AuNP-) lorsque diluées dans du RPMI supplémenté de 10% de sérum (100 µg/ml), alors que leur taille théorique est de 10nm. En fait, il est connu que la chimie de surface peut jouer un rôle fondamental dans les interactions NP-protéines. Quelques recherches se sont focalisées sur les interactions entre les protéines et les AuNP avec différentes modifications de surface (amines, pegylation (PEG), carboxyle ou peptides) (Cui *et al.*, 2014, Walkey *et al.*, 2012). Ces résultats que nous avons obtenus avec les AuNP+ et les AuNP- sont aussi concordants avec les travaux de Wang et son équipe, qui ont montré que la chimie de surface des AuNP pouvait moduler leur façon d'interagir avec l'albumine de sérum bovin (BSA). Ils ont caractérisé l'interaction entre les AuNP+ ou les AuNP- avec la BSA et ils ont démontré que les AuNP chargées positivement formaient de plus gros agrégats que les AuNP chargées négativement (Gongke Wang *et al.*, 2019).

Un aspect fondamental à prendre en considération lors de l'étude toxicologique des NP est leur possible contamination. En effet, il est primordial que les NP étudiées ne contiennent préalablement pas de toxines ou de bactéries, ce qui pourrait fausser les résultats. Il a en effet été démontré que certaines NP pouvaient contenir des traces de LPS et affecter les études toxicologiques (Smulders *et al.*, 2012, Vallhov *et al.*, 2006). C'est pourquoi nous avons testé de manière périodique la contamination des NP utilisées lors des travaux présentés dans cette thèse afin de s'assurer de l'innocuité des NP en faisant des cultures sur géloses et des tests de type LAL assay (Limulus amebocyte Lysate assay) avant de les mettre en contact avec les cellules ou les animaux.

6.2 Les AuNP et les PAMAM modulateurs de la biologie des neutrophiles Humains

Les neutrophiles jouent un rôle crucial dans la réponse immunitaire innée et ils représentent la première ligne de défense de l'organisme. Toutefois, leurs activités s'étendent bien au-delà de la réponse innée et leur influence dans la réponse adaptative est tout autant indispensable (Sébastien Jaillon *et al.*, 2013, Mantovani *et al.*, 2011, Carlos Rosales *et al.*, 2016). En effet, les nombreux médiateurs qu'ils produisent, par exemple les cytokines et les chimiokines, participent à la régulation de la réponse innée et adaptative. Ils influent ainsi sur les comportements de d'autres leucocytes impliqués dans la réponse adaptative tels les lymphocytes, les macrophages ou les cellules dendritiques (Jaillon *et al.*, 2013).

Leur régulation est finement orchestrée afin de contrôler la quantité de neutrophiles présent en fonction du contexte, et cet état d'équilibre actif qui régit les neutrophiles humains implique une régulation stricte à plusieurs niveaux afin de permettre de maintenir un nombre efficace de neutrophile selon les menaces qui envahissent le corps humain, tout en évitant une suractivation de ces cellules pour éviter les dommages collatéraux aux cellules saines avoisinantes. La courte durée de vie des neutrophiles, restreinte par leur mort programmée par apoptose, fait partie des mécanismes de régulation de ces cellules (Fox *et al.*, 2010). Lorsque les neutrophiles sont activés ou font face à une agression, l'apoptose peut toutefois être retardée pour que les neutrophiles puissent soutenir une réponse effectrice pour éliminer la menace en cours (Brostjan *et al.*, 2020).

En fait, les processus d'apoptose et la phagocytose subséquente des neutrophiles apoptotiques sont des événements capitaux, car ils sont essentiels à une bonne résolution de l'inflammation (El Kebir *et al.*, 2013). Lors de l'inflammation aiguë, le nombre de neutrophiles dans les tissus peut être extrêmement élevé en raison d'un afflux ciblé et également parce que les processus d'apoptose sont retardés par l'action des médiateurs inflammatoires présents (Ward *et al.*, 1999). Ainsi, le potentiel des neutrophiles inflammatoires pour causer des dommages aux tissus par la libération de ROS toxiques ou d'enzymes de leurs granules est très élevé. La mort par apoptose permet une élimination en toute sécurité par les cellules phagocytaires (principalement les macrophages) et permettent ainsi de limiter les dommages tissulaires lors de la résolution de l'inflammation (Silva, 2011).

L'apoptose des neutrophiles peut même représenter un intérêt de recherche comme moyen de traiter les maladies inflammatoires impliquant les neutrophiles (C. N. Serhan *et al.*, 2007, Ward *et al.*, 1999). Les molécules altérant ces processus apoptotiques ont un potentiel bénéfique si elles sont utilisées à ces fins, mais peuvent en revanche causer de sérieux dommages si elles

perturbent les processus apoptotiques des neutrophiles si elles n'avaient pas, à la base, été utilisées dans ce but.

Plusieurs molécules sont connues pour avoir le potentiel d'affecter l'apoptose des neutrophiles, soit en retardant ou soit en accélérant le processus. C'est le cas la *Viscum album agglutinin* (VAA), une lectine de plante qui provoque l'apoptose des neutrophiles (Savoie *et al.*, 2000). C'est aussi le cas de plusieurs types de NP. Par exemple, des AuNP de 20nm ont induit l'apoptose des neutrophiles et des NP d'oxyde de zinc de 20nm ont provoqué au contraire un délai dans l'apoptose des neutrophiles, ou encore des NP d'argent de 20nm ont aussi induit l'apoptose, tandis que les NP d'argent de 70nm ont retardé l'apoptose (D. M. Goncalves *et al.*, 2014, Noël *et al.*, 2016, Michelle Poirier *et al.*, 2016a). Ce ne sont pas les premières études à révéler que les PAMAM et les AuNP causent l'apoptose des cellules. Outre les neutrophiles, les PAMAM ont causés l'apoptose des fibroblastes, et les AuNP celle de kératinocytes (Schaeublin *et al.*, 2011, Uram *et al.*, 2013). Nous avons également observé une modulation de l'apoptose chez les neutrophiles humains avec les PAMAM et les AuNP +/- à la suite de stimulations de 24h.

D'abord, nous avons dénoté une augmentation du taux d'apoptose chez les PAMAM pour les quatre générations testées en cytologie et par marquage à l'annexine-V en cytométrie en flux après 24h d'exposition aux NP (Annexe 1). En cytologie, les neutrophiles apoptotiques se démarquent par la perte de leur noyau polylobé qui devient pycnotique et qui est facilement reconnaissable au microscope optique. Nous avons ainsi observé que les PAMAM ont causé une augmentation de l'apoptose et ce, en fonction de la dose utilisée. L'apoptose est observée à des concentrations de 100µg/ml, 500µg/ml et 1000µg/ml pour G0, G2 et G3 et à 500µg/ml et 1000µg/ml pour G1 (Annexe 1). L'apoptose est aussi observée en cytométrie en flux, mais elle est significative seulement pour la plus grande dose testée pour G0 (1000 µg/ml), à 500 µg/ml et 1000 µg/ml pour G1; et à toutes les doses testées pour G2 et G3 (10 µg/ml à 1000 µg/ml). Il est possible que cette différence entre l'observation visuelle au microscope et celle tirant partie de l'annexine-V en cytométrie en flux soit dû au fait que ce ne sont pas exactement les mêmes paramètres qui sont observés. En effet, l'un des premiers événements à survenir lors de l'apoptose des neutrophiles est la translocation vers le côté externe de la membrane plasmique de la phosphatidylsérine et ceci représente un mécanisme à la base de la reconnaissance des cellules apoptotiques (Fadok *et al.*, 1992). Cet événement peut avoir lieu avant que la cellule présente visuellement le noyau pycnotique. Notons aussi que cette apoptose observée chez les neutrophiles est non seulement dépendant de la dose, mais elle est dépendante de la taille des PAMAM, c'est-à-dire que plus les générations augmentent, plus le pourcentage d'apoptose

observé est élevé, allant pour la G3 à des taux quasi similaires au témoin positif VAA. De plus, les analyses en immunobuvardage de type western ont révélé une activation de la protéine caspase 3, protéine connue pour son implication dans les processus apoptotique (Annexe 1). Comme mentionné dans l'introduction, les protéines caspases jouent un rôle crucial dans les processus d'apoptose. La caspase 3 est en effet une caspase effectrice qui, une fois activée, clive des protéines structurelles clés, des protéines du cycle cellulaire et des protéines DNase, telles que la poly(ADP-ribose) polymérase, la gelsoline, l'ICAD/DFP et la kinase dépendante de l'ADN. Ces événements de clivage entraînent la condensation des cellules, et conduit ultimement à la mort cellulaire.

Pour les AuNP, nous avons également évalué les taux d'apoptose en cytologie à la suite de stimulations de 24h avec les NP. Seulement les AuNP chargées négativement ont causés l'apoptose des neutrophiles de manière significative (Article 2). Avec ce type de NP, il est également possible de suivre leurs interactions avec les neutrophiles en microscopie électronique. Malheureusement, les dendrimères PAMAM ne sont pas assez dense pour effectuer ce type d'observation en microscopie électronique, car il est très difficile de différencier ces NP des autres composantes cellulaires du neutrophile. Les images obtenues pour les AuNP révèlent que la localisation des AuNP dans les neutrophiles est différente en fonction de la charge de la NP. Bien que les deux types de AuNP aient été retrouvées à l'intérieur des cellules neutrophiles, les AuNP + ont été retrouvées à l'intérieurs de vacuoles, tandis que les AuNP – se trouvaient de manière un peu plus dispersée aléatoirement dans la cellule (Article 2).

Les membranes cellulaires étant chargées négativement, l'interaction entre les molécules positive a tendance à former des liaisons ioniques (Panyam *et al.*, 2003). Ceci pourrait faire en sorte que l'endocytose de NP chargées positivement puisse être plus efficace. Les particules cationiques sont en effet bien connues pour se lier aux groupes chargés négativement à la surface de la cellule, notamment par les interactions électrostatiques (Chaffey, 2003, Honary *et al.*, 2013).

Plusieurs études ont corroboré une interaction et une internalisation plus efficace de NP chargées positivement (Harush-Frenkel *et al.*, 2007, He *et al.*, 2010, Lunnoo *et al.*, 2019, Stojiljković *et al.*, 2016). Les travaux de Lunnoo *et al* souligne toutefois l'importance d'évaluer d'autres facteurs comme la taille, la forme et les agrégats des AuNP qui peuvent aussi interférer lors des interactions cellule-NP et indiquent qu'il n'y a pas seulement la charge pour expliquer les capacités d'interactions des AuNP (Lunnoo *et al.*, 2019). Les travaux de Noel *et al* vont également dans ce sens. En comparant deux tailles de AuNP, ils ont observé une internalisation d'AuNP de

20nm, mais les AuNP de 70 nm étaient plutôt seulement adsorbées à la surface des cellules neutrophiles et pas internalisées, bien que les deux types d'AuNP de cette étude possèdent des charges positives (Noël *et al.*, 2016). Les liens électrostatiques ne peuvent pas en effet à eux seuls justifier les interactions et l'internalisation des NP dans les cellules, d'autres facteurs sont à prendre en considération (Forest *et al.*, 2017). Des études ont par ailleurs noté, au contraire, une plus grande internalisation de NP chargées négativement (Limbach *et al.*, 2005, Patil *et al.*, 2007, Leshuai W. Zhang *et al.*, 2009). Les AuNP – que nous avons étudiées ont également été internalisées, bien que moindrement que les AuNP+. C'est également ce qu'ont conclu Cho *et al* lorsqu'ils ont évalué les interactions des AuNP avec les membranes cellulaires. Ils se sont penché sur l'impact de la charge de AuNP quant à leurs interactions et leurs internalisations dans des cellules cancéreuses épithéliales de glandes mammaires et ont observé que les AuNP – ou de charges neutres étaient moins adsorbées sur les membranes cellulaires (elles-mêmes chargées négativement), et en conséquence étaient moins fortement internalisées dans la cellules comparativement aux AuNP + (E. C. Cho *et al.*, 2009a).

Bien que les membranes plasmiques aient une charge nette négative, la distribution n'est pas parfaite et elle est modulable lors de l'activation de la cellule, ce qui pourrait expliquer des interactions avec des molécules négatives. Les neutrophiles sont des cellules très dynamiques et il a été démontré que la distribution des charges de la membrane plasmique peut être polarisée, notamment pendant les processus de chimiotaxie et de phagocytose (Magalhaes *et al.*, 2010). De plus, certaines interactions des cellules phagocytaires avec des particules de charge négatives sont bien connues, comme lors de l'interaction avec des bactéries, qui affichent également une charge nette négative (Corpe, 1970). Comme mentionné précédemment dans l'introduction, les neutrophiles possèdent une panoplie de récepteurs, dont les PRR qui reconnaissent les PAMPs et les DAMPs. Un exemple mieux caractérisé de molécules négative menant à l'activation de cellules immunitaires via les DAMPs sont les adjuvants à base de molécules d'aluminium, que l'on retrouve dans plusieurs vaccins. Plusieurs adjuvants peuvent agir en tant que ligands des récepteurs PRR et activer les réponses innées du système immunitaire (Reed *et al*, 2013).

Comme les NP étudiées lors des travaux de cette thèse sont très petites, (entre 1 et 10nm), il est possible aussi que les NP puissent être internalisées via pinocytose, un mécanisme endocytaire par lequel les cellules peuvent absorber les fluides extracellulaires et de petites molécules de manière moins spécifiques, c'est-à-dire sans inférence de récepteurs préalable.

Une étude a par ailleurs montré que des NP d'oxyde de fer couplées à des PAMAM G3 pouvaient être internalisées par des cellules épithéliales cancéreuses et que ce mécanisme pourrait être médié par pinocytose ou via diffusion directe à travers la membrane de la cellule (Shi *et al.*, 2007). Une autre étude suggère plutôt que les PAMAM seraient internalisées dans une lignée de cellules intestinales via une endocytose dépendante des clathrines (Kitchens *et al.*, 2007).

Il est à noter que les NP ne doivent pas nécessairement entrer dans la cellule pour causer des dommages. Une interaction avec les nombreux récepteurs à la surface de la cellule peut enclencher des réponses intracellulaires et activer les neutrophiles. Des dommages au niveau de la membrane plasmique peuvent altérer la biologie et la durée de vie d'une cellule. Les travaux de Noel *et al.*, qui avaient observé que les AuNP de 70nm n'étaient pas internalisées, mais étaient plutôt localisés sur la membrane des neutrophiles ont aussi notés que ces AuNP ont causés l'apoptose des neutrophiles. Il est bien connu que les PAMAM avec charges positives NH₂ sont plus toxiques que les PAMAM anionique ou neutres. En effet, la charge positive permet l'interaction avec une grande variété de biomolécules telles que l'ADN, les lipides membranaires ou les mitochondries. Plusieurs études suggèrent que les dendrimères PAMAM provoquent une instabilité dans les bicouches lipidiques et les mitochondries (Hong *et al.*, 2006, J. H. Lee *et al.*, 2009, Mecke *et al.*, 2005, Mukherjee *et al.*, 2013) .

Quoiqu'il en soit, il demeure très difficile de comparer les études entre elles et de tenter d'en tirer des conclusions générales quand il s'agit de NP. Non seulement les études sont réalisées sur des types cellulaires différents, ce qui peut expliquer une variation des effets d'une étude à l'autre, mais il faut souvent regarder au cas par cas les NP étudiées, car, comme discuté auparavant, les paramètres intrinsèques des NP peuvent grandement varier, ce qui peut occasionner des réponses cellulaires qui varient également.

6.3 Modulation des fonctions des neutrophiles par les NP *in vitro*

Étant donné que les applications envisagées pour les NP dans le domaine biomédical impliquent une exposition directe chez l'humain, nous avons choisi de tester les impacts des AuNP +/- et des PAMAM dans le neutrophile. Le neutrophile est en effet une des cellules les abondantes parmi les globules blancs et ces cellules entreront forcément en contact avec les NP étant donné leurs fonctions. Ainsi, plusieurs fonctions des neutrophiles ont été testées et ont été modulées à la suite d'une exposition aux différentes NP PAMAM ou AuNP +/-, dont la phagocytose, la dégranulation, la libération de cytokines et chimiokines et la chimiotaxie.

6.3.1 Mouvement et chimiotaxie des neutrophiles et libération de médiateurs inflammatoires

L'une des premières étapes lors de la réponse inflammatoire et une des caractéristiques propres aux neutrophiles est leur capacité à se mouvoir rapidement pour se déplacer au foyer d'inflammation. Cette étape n'est pas banale, au contraire, elle représente la première étape qui pourrait être en cause lors d'une utilisation *in vivo* des NP si les neutrophiles sont activés par les NP et suppose que les neutrophiles puissent se déplacer pour venir interagir avec les NP testées.

Dans un premier temps, les neutrophiles semblent migrer vers les NP lors des essais *in vitro*. Les tests que nous avons effectués avec les chambres de Boyden montrent un déplacement des neutrophiles ayant traversés la membrane de polycarbonate pour se diriger dans le compartiment contenant les NP (Article 2 et Annexe 1). Les taux de migration des neutrophiles est même similaire à ceux du témoin positif IL-8 dans le cas des PAMAM.

À la lumière de ces résultats, ce qui cause ce mouvement des neutrophiles n'est pas clair. En effet, nous ne savons pas concrètement ce qui peut causer le déplacement des neutrophiles. Il n'y a pas de récepteurs proprement connus reconnaissant les nanoparticules. Toutefois, certains travaux récents suggèrent que les NP pourraient agir de manière similaire aux PAMPS (*Pathogen Associated Molecular Pattern*) et aux DAMP (*danger-associated molecular patterns*), ces motifs moléculaires reconnus par le système immunitaire capable d'activer les récepteurs PRR (*Pattern recognition receptor*). Ceci serait entre autres causé par la corona des NP, qui agirait comme signal de danger (Fadeel, 2012, Moyano *et al.*, 2012).

D'autres travaux ont aussi mis en évidence l'implication d'un gradient électrostatique afin de recruter les neutrophiles lors des processus de chimiotaxie. Par exemple, la myéloperoxydase est une protéine cationique ayant un fort pouvoir attractif envers les neutrophiles. Ce potentiel chimioattractant a été étudié par *Klinke et al* et ils ont conclu que le mécanisme d'action derrière la capacité de la MPO à affecter la locomotion et le recrutement des neutrophiles serait produit via les forces électrostatiques (*Klinke et al.*, 2011).

Un autre résultat à prendre en considération est la production et la libération d'IL-8 que nous avons observé à la suite de l'exposition aux PAMAM et aux AuNP (Article 2 et Annexe 1). Lors des tests de chimiotaxie avec les chambres de Boyden, un taux de base de neutrophiles passe également à travers la membrane sans stimulation préalable. Ainsi, les cellules, même si peu nombreuses, qui réussissent à passer la membrane se retrouvent en contact avec les différentes conditions dans leurs puits respectifs. De cette manière, les neutrophiles se trouvant en contact

avec les différentes NP peuvent réagir et, si l'on se fie aux tests ÉLISA effectués (Article 2 et Annexe 1), produire et libérer des cytokines et chimiokines dont l'IL-8. L'IL-8 étant l'un des plus puissants chimioattractants des neutrophiles humains, l'effet autocrine provoque par conséquence la migration d'un plus grand nombre de neutrophiles dans les puits avec les NP.

Les cytokines jouent en effet un rôle crucial dans une panoplie d'activités biologiques et sont grandement sollicitées lors de la réponse inflammatoire. Par exemple, la communication entre les cellules immunitaires et celles environnantes lors de la rencontre d'un agent pathogène est médiée par la libération de molécules de signalisation, en particulier des cytokines et des chimiokines, qui jouent un rôle important dans l'immunité en interagissant avec des récepteurs spécifiques (Delves *et al.*, 2017, Yuwen Zhu *et al.*, 2011).

Les signaux qu'envoient les neutrophiles aux autres cellules lors de la réponse inflammatoire sont essentiels pour contribuer au déroulement de la réponse. Ils influencent ainsi cette réponse et ils peuvent orchestrer autant la réponse innée que la réponse adaptative en fonction des cytokines et chimiokines libérées. La perturbation lors des différentes étapes de l'inflammation peut avoir des conséquences sur le bon fonctionnement de la réponse entière et perturber le retour à l'homéostasie et causer des dommages à l'organisme.

Il est vrai que les neutrophiles produisent généralement des quantités plus faibles de cytokines par cellule, comparativement aux macrophages, par exemple. Mais le fait que les neutrophiles sont retrouvés en plus grand nombre au niveau des sites inflammatoires fait que leur contribution globale est non négligeable et atteint des niveaux de production et de libération de cytokines largement significatif (Carl Nathan, 2006).

Compte tenu des premiers résultats que nous avons obtenus lors de l'exposition des neutrophiles aux NP, nous avons aussi testés la libération de d'autres types cytokines et chimiokines inflammatoires par les neutrophiles exposés aux NP. Pour les AuNP, nous avons observé une augmentation de l'IL-8 comme mentionné précédemment, mais aussi de Gro- α ; bien que cette augmentation ne soit significative que pour l'IL-8 produite par les AuNP + (article 2). L'exposition aux quatre générations de PAMAM a également modulé à la hausse l'IL-6, l'IL-8 et l'IL-1 β (Annexe 1). Pour les PAMAM, les résultats varient en fonction des concentrations et des générations de dendrimères.

Ensuite, nous avons dénoté une élévation de la présence et de l'activité des MMP9 pour toutes les NP testées, avec des ratios d'environ 1,3 fois plus que le témoin négatif pour G0 et G1; 1,6 à

2 fois plus que le témoin négatif pour G2; 1,7 à 3 fois plus que le témoin négatif pour G3; et finalement près de 4 fois plus que le témoin négatif pour AuNP +/- (Article 2 et Annexe 1).

Les métalloprotéinases (MMP) sont des enzymes intervenant dans la dégradation et remodelage de tous les composants de la matrice extracellulaire (Nagase *et al.*, 1999). Les protéines MMP9 n'ont pas seulement un rôle bactéricide, mais elles contribuent au déplacement des neutrophiles en dégradant la matrice extracellulaire, ce qui facilite le passage des cellules (Keck *et al.*, 2002, Yabluchanskiy *et al.*, 2013). Les MMP participent également à différents processus biologiques et physiologiques régulés par des hormones, des facteurs de croissance et des cytokines (Kapoor *et al.*, 2016). Toutefois, une accumulation non régulée de ces protéines peut être associée à des pathologies variées comme le cancer, des pathologies rénales, cardiovasculaires ou hépatiques, l'athérosclérose ou encore des maladies neurodégénératives, pour ne nommer que ces exemples (Brkic *et al.*, 2015, Catania *et al.*, 2007, Ferroni *et al.*, 2003, Hopps *et al.*, 2015, Liang *et al.*, 2018, Lopes *et al.*, 2013, Na'ara *et al.*, 2019, X. S. Zhang *et al.*, 2018). En plus de l'activité inflammatoire propre au MMP, elles peuvent aussi amplifier la réponse inflammatoire en potentialisant d'autres molécules. L'activité protéolytique de MMP9 peut, par exemple, traiter l'IL-1 β et cliver l'IL-8 (Schönbeck *et al.*, 1998, Van den Steen *et al.*, 2000). Cette régulation est d'une grande importance, car, non seulement l'IL-1 β n'est pas sous forme de précurseur inactif lorsqu'elle est synthétisée et elle doit être clivée pour son activation, mais également pour la boucle de rétroaction positive créée par cette action puisque l'IL-1 β induit l'expression de pro-gélatinase B dans de nombreux types cellulaires (Opdenakker *et al.*, 1991). L'IL-8 cause aussi un effet similaire de rétroaction positive qui induit plus d'expression de MMP9, mais il a aussi été démontré que la forme ainsi clivée de l'IL-8 par MMP9 rend la chimiokine IL-8 dix fois plus puissante pour activer les neutrophiles (Van den Steen *et al.*, 2000).

6.3.2 Phagocytose

La phagocytose est un des mécanismes principaux pour éliminer les agents pathogènes et les débris cellulaires. Il s'agit d'un processus actif médié par des récepteurs spécifiques au cours duquel une particule est internalisée par la membrane cellulaire dans une vacuole afin de dégrader l'élément à éliminer. Nos résultats suggèrent que les neutrophiles stimulés avec les PAMAM voient leur capacité à effectuer la phagocytose par l'entremise des récepteurs Fc augmentée (annexe 1). En effet, plus de globules rouges opsonisés ont été internalisés par les neutrophiles lorsqu'ils ont été exposés aux quatre générations de PAMAM comparativement aux neutrophiles non exposés au NP.

Ceci suggère que les PAMAM pourraient être bénéfiques pour l'élimination de pathogènes en contribuant à l'amélioration des capacités phagocytaires des neutrophiles. Toutefois, il faut garder en tête que l'utilisation des PAMAM ne se fait pas nécessairement dans un contexte de défense de l'organisme où le neutrophile se doit de phagocyter les intrus ou éliminer des éléments indésirables. Les NP sont plutôt utilisées à des fins thérapeutiques ou diagnostiques très variés, mais dont l'activation des processus inflammatoires ne sont pas souhaités. Quoiqu'il en soit, l'augmentation des capacités à effectuer la phagocytose peut sembler moins dommageable qu'une diminution de cette fonction, puisque les conséquences immédiates d'une défaillance dans les capacités à effectuer la phagocytose peuvent être graves et causer une incapacité à se défendre correctement contre des envahisseurs. Il est bon de mentionner que les neutrophiles doivent quand même être en mesure de fonctionner normalement et pouvoir intervenir si une infection survenait malgré le traitement effectué avec les NP. Aussi, comme tout processus cellulaire, la phagocytose engendre des coûts énergétiques pour la cellule et mobilise les ressources. D'autant plus qu'afin d'éviter une réponse exacerbée, ces cellules entrent spontanément en apoptose après avoir effectué leur fonction comme la phagocytose (B. Zhang *et al.*, 2003). Les conséquences pour l'organisme pourraient être dommageables si les neutrophiles mobilisent leur attention sur les NP et meurent prématurément, puisque l'utilisation des NP dans les diverses applications biomédicales n'ont pas été conçues à ces fins, et il n'est pas souhaitable que les traitements interfèrent avec le bon fonctionnement des neutrophiles.

En somme, cette suractivation de la phagocytose observée est concordante avec notre résultat précédent où nous avons dénoté une augmentation des taux d'apoptose (B. Zhang *et al.*, 2003). Ces résultats pourraient laisser supposer qu'une tendance à un certain retour vers l'homéostasie pourrait survenir après une seule exposition aux NP, puisque suivant l'activation des neutrophiles et à tout l'arsenal inflammatoire déployé, après avoir effectué leurs fonctions, les cellules entrent en apoptose. Ceci pourrait limiter l'inflammation à la réponse aigue et permettre un retour à la normale. Toutefois, il est prématuré d'en tirer des conclusions définitives seulement à la suite d'une exposition sur des neutrophiles *in vitro*, d'autant plus qu'il est fort envisageable que dans un système plus complexe *in vivo* d'autres neutrophiles se présentent en renfort, surtout suite au signal chimiotactique laissé par l'Il-8 qui provoque l'attraction de nouveaux neutrophiles qui seront activés à leur tour si des NP sont toujours présentes (Mahalingam *et al.*, 1999).

6.4 Les PAMAM et les AuNP induisent une Infiltration neutrophiliques *in vivo*

Le modèle de la poche d'air murine est un modèle très utile afin d'étudier l'inflammation, car il permet en effet d'évaluer des paramètres de chacune des étapes de l'inflammation décrite dans l'introduction. En créant un environnement stérile au sein même d'un animal (divers rongeurs), il est possible de recueillir des données relatives aux réactions causées par divers composés. Ainsi, par suite d'une exposition par exemple à des NP, on peut évaluer si les cellules immunitaires sont activées, si elles migrent dans la poche d'air et examiner la réponse produite et les médiateurs inflammatoires produits. C'est pour ces raisons que ce modèle a été proposé afin d'évaluer rapidement la toxicité des NP et qu'il est largement utilisé dans la littérature pour ce type d'étude nanotoxicologique (Jennifer Vandooren *et al.*, 2013a).

L'un des premiers paramètres à évaluer lorsque l'on utilise ce modèle est la migration des cellules immunitaires dans les poches d'air à la suite de l'exposition aux NP. Les AuNP + ont provoqué une augmentation du nombre de cellules ayant migré dans les poches d'air à 6h post exposition aux NP, et ce, de manière significative (500 µg/ml). Cette hausse de cellules dans les poches d'air est principalement causée par la migration des neutrophiles (article 2). Une augmentation du nombre de neutrophiles dans les poches d'air a aussi été observée pour les AuNP -, mais celle-ci n'est pas statistiquement significative.

Le même constat a été observé avec les quatre générations de PAMAM, qui ont induit une infiltration cellulaire dans les poches d'air de manière significative à 6h post exposition aux NP pour la génération 1 (500 µg/ml), 2 (500 µg/ml) et 3 (100 µg/ml et 500 µg/ml) (article 1). Encore une fois, ces infiltrations de cellules sont principalement des neutrophiles. Aussi, les proportions de neutrophiles par rapport aux autres leucocytes mononuclés sont augmentées de manière significative pour les quatre générations de PAMAM (100 µg/ml et 500 µg/ml) (annexe 1). De plus, les PAMAM ont une cinétique qui diffère des AuNP. Dès trois heures d'exposition aux PAMAM G1 (500 µg/ml), on observe une augmentation significative du nombre de neutrophiles ayant migré dans les poches d'air; ainsi qu'une augmentation des proportions neutrophiles / cellules mononuclées en faveur des neutrophiles, et ce, dès G1 (500 µg/ml) et pour G2 et G3 aux deux concentrations testées (annexe 1). La réponse s'étend jusqu'à 24h post exposition pour les deux plus petites générations de PAMAM avec une augmentation significative des proportions de neutrophiles par rapport aux cellules sanguines mononuclées (G0 et G1 100 µg/ml et 500 µg/ml) et d'une infiltration de neutrophiles pour G1 (500 µg/ml). Le retour à la normale est rétabli à 48h post exposition (données non publiées). Ces résultats suggèrent que la taille des PAMAM influence leur conséquence sur la migration des cellules immunitaires dans les poches d'air.

À notre connaissance, ces deux études évaluant l'impact des AuNP et des PAMAM dans le modèle de la poche d'air murine que nous avons effectué sont les premières à être réalisées. Toutefois, d'autres types de NP ont déjà été testées avec ce modèle. Certaines NP sont connues pour avoir également causé un recrutement neutrophilique à différent temps post exposition au NP. Par exemple, une étude fait état du recrutement de cellules dans les poches d'air dès 3h post exposition aux NP de TiO₂ ou fullerenols en combinaison avec du LPS (Gonçalves *et al.*, 2011, Gonçalves *et al.*, 2013). Muñoz et son équipe ont rapporté une infiltration neutrophilique trois jours après l'exposition à des NP de diamant (Muñoz *et al.*, 2016). D'autres NP n'ont, au contraire, eu aucun impact quant au recrutement de cellules dans les poches d'airs, comme les NP PLGA (poly(lactic-co-glycolic) acid) (Guedj *et al.*, 2015).

Bien qu'il demeure difficile de comparer deux études complètement différentes (puisque les modèles étudiés ne sont pas les mêmes), notre étude n'est pas la première à témoigner d'une différence quant à la taille des PAMAM et à la durée de circulation dans un organisme. Malik et son équipe ont observé cet effet avec un autre type de dendrimères, cette fois-ci chargé négativement avec un groupement terminal anionique. Ils ont dénoté que les plus petites générations qu'ils ont étudiées montraient un temps de circulation plus long ainsi qu'une élimination dépendante de la taille des NP (Malik *et al.*, 2000).

Tel que l'on pouvait s'y attendre, chaque type de NP peut causer des effets différents et il n'est pas possible de tirer des conclusions similaires. Mais aussi, cela met en évidence l'importance d'élargir les fenêtres de temps au cours desquels nous effectuons les tests et souligne la nécessité d'effectuer des cinétiques. Bien que la réponse classique d'inflammation aigue attendue avec ce modèle se déroule généralement avec une initiation et une amplification dans les premières 6 à 9 heures; avec une résolution dans les 24 heures, comme c'est le cas par exemple pour le LPS, un agent souvent utilisé en tant que référence et témoin positif dans les diverses études inflammatoires puisque le type de réponse qu'il provoque est bien caractérisé; il n'en est pas de même pour les NP. La cinétique pour l'étude des NP doit être réalisée pour ne pas passer à côté des effets possible, comme le démontre nos résultats avec les PAMAM G0 et G1, où la réponse s'étendait jusqu'à 24h post exposition; ou encore l'étude sur les NP de diamant qui n'ont provoqués une réponse qu'après trois jours post exposition (Muñoz *et al.*, 2016).

De plus, conjointement au recrutement des cellules dans les poches d'air, il y a eu libération de divers médiateurs inflammatoires dont MMP9 et diverses cytokines et chimiokines, comme nous l'avons observé *in vitro* avec les neutrophiles. La présence en grande quantité des MMP9 dans nos exsudats des poches d'air témoigne de la présence des neutrophiles, puisqu'elle est l'une

des principales cellules à libérer MMP9 dans le contexte inflammatoire (J. A. Jones *et al.*, 2006, Lindsey *et al.*, 2001). Toutefois, dans le contexte *in vivo* de la poche d'air, il est clair que d'autres cellules ont cette fois-ci participées à la réponse observée. Les macrophages résidents du tissu, les fibroblastes et les cellules endothéliales ont fort probablement contribuées à envoyer des signaux aux neutrophiles qui ont largement migrés en renfort.

De plus nos résultats suggèrent que le mode d'action des NP varie des autres molécules classiques connues pour induire l'inflammation tel que le LPS. Les résultats des micros-réseaux d'anticorps indiquent en effet que ce ne sont pas les mêmes profils de cytokines et chimiokines qui sont produites et libérées en fonction de la NP. Le fait que ce profil soit différent témoigne aussi que nos NP ne sont pas contaminées aux bactéries. Parmi les quarante cytokines et chimiokines testées avec les micros-réseaux d'anticorps, plus de la moitié ont été exprimées à la hausse après une exposition aux diverses NP (articles 1 et 2). De manière générale, les AuNP + ont montré une réponse plus forte que les AuNP -, quoique les deux NP présentent des élévations des ratios par rapport au témoin négatif de plusieurs cytokines et chimiokines inflammatoire dont les augmentations les plus marquantes sont l'IL-6; l'IL-1 β ; IP-10; KC; M-CSF; JE; MCP-5; MIP-1 α ; MIP-1 β ; SDF-1 et TREM-1. Notons que plusieurs de ces médiateurs inflammatoires n'ont pas uniquement été exprimés de manière plus forte que le témoin négatif, mais également plus amplement que le témoin positif LPS. Pour les PAMAM, il semble avoir une tendance vers une réponse plus grande au fur et à mesure que les générations augmentent (G0 < G1 < G2 < G3). Les principales cytokines et chimiokines inflammatoires à avoir été modulées à la hausse par rapport au témoin négatif sont C5/C5a; KC; JE; MCP-5; IP-10; RANTES; M-CSF; MIP-1 α ; SDF-1; sICAM et l'IL-6. Ces cytokines inflammatoires sont en grande majorité des chimioattractants pour les divers leucocytes dont les lymphocytes B et T, les cellules NK, les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques et également les neutrophiles (Adams *et al.*, 1997, Baggiolini, 1998, Groves *et al.*, 1995). Les cytokines représentent de bons biomarqueurs de l'immunostimulation et leur détection est préconisé afin de tester la réactivité des cellules aux NP et leur immunotoxicité (Elsabahy *et al.*, 2013). Plusieurs études ont d'ailleurs évoqué la production et la libération de nombreuses cytokines suite une exposition aux NP (Wolf-Grosse *et al.*, 2017). Par ailleurs, il a été démontré que les AuNP ont augmenté l'expression de gènes de cytokines dans certains organes chez le rat; mais aussi la production et la libération de diverses cytokines dans le neutrophile humain (Arancibia *et al.*, 2016, Hanley *et al.*, 2009, Haseeb A. Khan *et al.*, 2013, Khatri *et al.*, 2013). Certaines de ces études ont aussi été réalisées sur les neutrophiles (DM Goncalves *et al.*, 2010, M. Poirier *et al.*, 2016b, Verdon *et al.*, 2021). D'autres NP ont au contraire eu des effets différents et ont par exemple diminué l'expression de l'IL-1 β à la suite

d'une exposition au LPS (Hsin-Ying Wu *et al.*, 2013). Cependant, à notre connaissance les PAMAM et les AuNP n'ont pas été testées quant à la production de cytokines chez les neutrophiles.

Aussi, on dénote dans nos résultats l'augmentation de deux cytokines anti-inflammatoires, l'IL-10 et l'IL-1ra. Il n'est pas étonnant de voir l'élévation de l'IL-10 étant donné toutes les autres cytokines inflammatoires produites; le rôle primaire de l'IL-10 étant de limiter la réponse inflammatoire afin de permettre un retour à l'homéostasie. L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire puissante avec un large éventail d'effets à la fois direct et indirect sur l'immunité innée et adaptative (Moore *et al.*, 2001). Elle n'inhibe non seulement divers effecteurs inflammatoires, mais accroît également la production de leurs antagonistes, dont l'IL-1ra (Jenkins *et al.*, 1994). Ceci est concordant avec nos résultats, puisque l'augmentation de l'IL-1ra a aussi été observée.

Toutefois, ces tests de micros-réseaux d'anticorps n'ont été réalisés qu'au temps 6h, soit le temps où la réponse observée quant au recrutement leucocytaire est le plus élevé, il est possible que la réponse des plus petites PAMAM se manifeste plus tard, puisque la réponse des G0 et G1 s'étend jusqu'à 24h post exposition aux NP. Comme discuté précédemment, il aurait été optimal de réaliser ces tests aussi aux autres temps afin de voir le profil de cytokines et chimiokines au fil du temps, qui forcément aurait été modulable suivant les phases d'inflammation.

6.5 Conséquence du potentiel inflammatoire des NP

Les signaux qu'envoient les neutrophiles aux autres cellules lors de la réponse inflammatoire sont essentiels pour contribuer au déroulement de la réponse. La perturbation lors des différentes étapes de l'inflammation peut avoir des conséquences sur le bon fonctionnement de la réponse entière et perturber le retour à l'homéostasie. En contexte inflammatoire, l'action rapide des neutrophiles permet une réponse efficace et à large spectre contre divers envahisseurs. Il ne faut pas toutefois que cette réponse perdure ou s'exacerbe, ou qu'elle se déclenche sans danger réel à éliminer, car les conséquences peuvent être néfastes pour la santé.

Globalement, nos résultats démontrent un potentiel pro-inflammatoire par les AuNP et les PAMAM que nous avons testées par la migration massive de neutrophiles dans les poches d'air de notre modèle *in vivo* et par la libération de divers médiateurs inflammatoires autant *in vitro* que *in vivo*.

L'inflammation est impliquée dans une panoplie de maladies ou de pathologies. À titre d'exemple, le cancer est une maladie chronique qui repose de manière critique sur l'interaction des cellules tumorales avec leur environnement. Le cancer se présente avec une inflammation, et la réponse inflammatoire est un facteur concomitant avec le développement des tumeurs. Certaines études cliniques indiquent qu'une infiltration neutrophilique au sein d'une tumeur est associée avec un mauvais pronostic (Bellocq *et al.*, 1998, Jensen *et al.*, 2009). De plus, les protéines MMP9 peuvent cliver un grand nombre de matrices extracellulaires et participer à leur remodelage (Stamenkovic, 2003, J. Vandooren *et al.*, 2013b). Ceci peut être favorable à l'établissement de tumeurs, car au cours du développement tumoral, la destruction de la membrane basale, qui est composée entre autres de collagène qui peut être détruit par MMP9, est généralement une étape essentielle qui favorise l'invasion tumorale et les métastases. Ainsi, MMP9 est associé à plusieurs pathologies cancéreuses (Chou *et al.*, 2012, Gialeli *et al.*, 2011, Leifler *et al.*, 2013, Mehner *et al.*, 2014, Pego *et al.*, 2018, Y. Zhang *et al.*, 2017). Il est à noter que MMP9 n'a pas uniquement un rôle à jouer dans l'établissement de certains cancers, mais est aussi associée à d'autres pathologies comme des maladies cardiovasculaires ou des désordres auto-immuns (de Rooy *et al.*, 2014, Ram *et al.*, 2006, Yabluchanskiy *et al.*, 2013).

L'IL-8 est une cytokine primordiale pour favoriser la réponse inflammatoire et éliminer des pathogènes, grâce à sa capacité à activer et recruter les neutrophiles. Néanmoins, il faut souligner que cette chimiokine peut aussi être liée à plusieurs pathologies, telles que l'arthrite, les maladies cardiovasculaires ou neurodégénératives, entre autres (Apostolakis *et al.*, 2009, McLarnon, 2016, Symons *et al.*, 1992).

Sans compter que la présence des neutrophiles à eux seuls est aussi corrélée à de nombreuses pathologies (Lakshman *et al.*, 2001, Lehman *et al.*, 2020, Leiding, 2017). Comme les neutrophiles possèdent des mécanismes de défenses diversifiés, les exemples de conséquences subséquentes à la suite d'un mauvais fonctionnement sont également nombreux. Lorsque ces mécanismes de régulation sont altérés ou lorsque l'inflammation aiguë ne peut pas être résolue, les neutrophiles deviennent des contributeurs de lésions tissulaires et malheureusement mener à de nombreuses pathologies.

6.6 Limite des modèles d'étude

Le fait de travailler avec des cellules neutrophiles humaines directement isolées de donneurs volontaire sains est un avantage unique. Les neutrophiles sont relativement faciles à purifier et un grand nombre de cellules peut être facilement obtenu à partir d'échantillons de sang des

volontaires humains. Toutefois, la séparation de ces cellules à partir des échantillons sanguins requière plusieurs étapes afin d'obtenir une population composée de neutrophiles. Or, ces cellules sont fragiles et facilement activables. Il faut donc procéder avec précaution lors de l'isolement des neutrophiles humains, puisque les nombreuses étapes impliquant des centrifugations, des changements de températures, la lyse des globules rouges et les divers produits utilisés ont le potentiel de les activer et d'influencer la réactivité et leur activité biologique (Rossi *et al.*, 2004). De plus, il faut être très vigilant quant à la contamination avec d'autres types de leucocytes, car même un faible pourcentage de monocytes ou éosinophile peuvent influencer la réponse des neutrophiles ou biaiser la réponse (Sabroe *et al.*, 2002).

Contrairement à d'autres populations de leucocytes, l'idée d'hétérogénéité des neutrophiles a reçu moins d'attention et est moins considérée dans les études impliquant ces cellules. Toutefois, il est maintenant évident que de nombreuses sous-populations de neutrophiles coexistent, et elles sont d'autant plus présentes lors de diverses pathologies (Silvestre-Roig *et al.*, 2016). Ces sous-populations pourraient être affectées et réagir de manière différente aux différents traitements aux NP, ce qui pourrait être une des raisons expliquant parfois la variabilité des réponses entre les différents donneurs. Aussi, les travaux présentés dans cette thèse possèdent un faible nombre de donneur pour chaque expérience (souvent n= entre 3 et 5). Il serait optimal de refaire des essais avec une plus grande population afin de consolider les résultats. De plus, bien que nous adaptions nos milieux de culture afin de recréer un environnement propice pour la survie des neutrophiles, les tests *in vitro* ne reproduisent pas l'environnement complexe dans lequel les neutrophiles se trouvent dans le corps humain, où ils reçoivent divers signaux. Nous avons en contrepartie utilisé un modèle murin *in vivo* afin de tenir comptes des diverses interactions complexes qui se produisent chez un organisme. Les souris sont d'excellents modèles, car elles sont peu dispendieuses, facilement manipulables et leur génome est bien caractérisé et présente une forte propension de gènes homologues avec ceux humains (Vandamme, 2014). De plus, les modèles *in vivo* permettent d'évaluer la pathogénèse des NP. Cependant, les résultats obtenus chez les souris ne sont pas directement transposables chez l'humain.

6.7 Conclusion et perspectives

En sommes, les travaux présentés dans cette thèse permettent de mieux comprendre l'impact des AuNP et des PAMAM de générations 0, 1, 2 et 3 sur la biologie des neutrophiles humains. Nos résultats révèlent un potentiel inflammatoire pour les AuNP, qui semble plus prononcé pour les AuNP chargées positivement. Les PAMAM ont également montrés un potentiel inflammatoire

augmentant au fil des générations ($G0 < G1 < G2 < G3$). Ces conclusions sont notamment appuyées par la migration massive des neutrophiles dans les poches d'air ainsi que par les nombreux médiateurs inflammatoires libérés par suite d'une exposition aux NP. Cependant, les travaux présentés dans cette thèse ne sont que la pointe de l'iceberg des études à réaliser quant aux impacts des AuNP et des PAMAM. Le manque de données scientifiques est flagrant et nécessite des investigations plus poussées.

Comme il s'agit des premières études visant à évaluer l'impact des AuNP et des PAMAM sur le neutrophile humain et leur impact *in vivo*, d'autres tests complémentaires sont nécessaires afin de bonifier notre compréhension des impacts de ces NP, notamment sur la mécanistique causant la réponse. Maintenant que nous avons ciblé plusieurs fonctions qui sont affectées par ces NP dans le neutrophile, il serait pertinent d'approfondir les recherches et d'étudier davantage les mécanismes impliqués. Par exemple, ce sont principalement les MAPK p38 et ERK1/2 qui sont connues pour jouer un rôle dans le processus apoptotique (Aoshiba *et al.*, 1999). Il serait pertinent de vérifier par quel mécanisme est médié l'apoptose que nous avons observé afin de mieux comprendre les mécanismes d'action des NP. Il en est de même pour les autres fonctions testées. Certaines voies de signalisation ou l'activation de certains facteurs de transcription sont répertoriés pour être impliqués dans les diverses fonctions du neutrophile, dont plusieurs MAPK comme p38, MEK/ ERK ou le facteur NF- κ B, dont les rôles n'ont pas été étudiés dans les présents travaux (Castro-Alcaraz *et al.*, 2002, Downey *et al.*, 1998, Kettritz *et al.*, 2001, Donghyuk Kim *et al.*, 2013, Mansfield *et al.*, 2000, Mócsai *et al.*, 2000). De plus, les résultats obtenus seraient bonifiés en consolidant nos résultats avec d'autres techniques complémentaires, comme la cytométrie en flux et en immunobuvardage de type western pour voir par exemple les marqueurs de granules à la surface des neutrophiles, dont les principaux sont le CD63, CD66b et le CD35.

De récentes études suggèrent que l'impact causé par le sexe serait un paramètre primordial à prendre en considération lors des études toxicologiques. En effet, des facteurs génétiques liés au chromosome X ainsi que des médiateurs hormonaux pourraient jouer un rôle en affectant la biologie des neutrophiles, comme le témoigne les taux d'apoptose différentiel des neutrophiles chez les femmes et chez les hommes, ou ces derniers affichent des taux d'apoptose des neutrophiles plus élevés (S. Jaillon *et al.*, 2019, Molloy *et al.*, 2003). Nous n'avons pas pris en considération ce paramètre, mais il serait judicieux dans la continuité des études de tenir compte de ce paramètre.

Il serait aussi pertinent de répéter les tests de manière chronique, car les effets que nous avons observés ne sont dus qu'à une seule exposition. Bien qu'un retour à l'homéostasie semble

s'établir après cette première exposition, un contexte de traitement médicamenteux exige des doses répétitives et des prises de médicaments à plus ou moins long terme selon le traitement.

En définitive, bien que les travaux présentés dans cette thèse représentent un premier aperçu des conséquences d'une exposition aux AuNP et aux PAMAM sur les neutrophiles humains et dans un modèle murin, ils requièrent une attention particulière dans le contexte d'utilisation des NP. Ces résultats devront être considérés dans l'optique d'une utilisation subséquente plus sécuritaire des NP.

BIBLIOGRAPHIE

- Adams DH & Rlloyd A (1997) Chemokines: leucocyte recruitment and activation cytokines. *The Lancet* 349(9050):490-495.
- Akçan R, Aydoğan HC, Yildirim M, Taştekin B & Sağlam N (2020) Nanotoxicity: a challenge for future medicine. *Turkish journal of medical sciences* 50(4):1180-1196.
- Akgul C, Moulding DA & Edwards SW (2001) Molecular control of neutrophil apoptosis. *FEBS Lett* 487(3):318-322.
- Akilesh MS & Wadhvani A (2020) Novel Applications of Nanotechnology in Controlling HIV and HSV Infections. *Current drug research reviews* 10.2174/2589977512999201124121931.
- Albertazzi L, Gherardini L, Brondi M, Sulis Sato S, Bifone A, Pizzorusso T, Ratto GM & Bardi G (2013) In vivo distribution and toxicity of PAMAM dendrimers in the central nervous system depend on their surface chemistry. *Molecular pharmaceutics* 10(1):249-260.
- Almeida JP, Chen AL, Foster A & Drezek R (2011) In vivo biodistribution of nanoparticles. *Nanomedicine (London, England)* 6(5):815-835.
- Amini E, Azadfallah M, Layeghi M & Talaei-Hassanlou R (2016) Silver-nanoparticle-impregnated cellulose nanofiber coating for packaging paper. *Cellulose* 23(1):557-570.
- Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD & Zychlinsky A (2012) Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol* 30:459-489.
- Anton N, Benoit JP & Saulnier P (2008) Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates-a review. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 128(3):185-199.
- Antonietti M & Landfester K (2002) Polyreactions in miniemulsions. *Progress in Polymer Science* 27(4):689-757.
- Aoshiha K, Yasui S, Hayashi M, Tamaoki J & Nagai A (1999) Role of p38-mitogen-activated protein kinase in spontaneous apoptosis of human neutrophils. *The Journal of Immunology* 162(3):1692-1700.
- Apostolakis S, Vogiatzi K, Amanatidou V & Spandidos DA (2009) Interleukin 8 and cardiovascular disease. *Cardiovascular Research* 84(3):353-360.
- Arancibia S, Barrientos A, Torrejón J, Escobar A & Beltrán CJ (2016) Copper oxide nanoparticles recruit macrophages and modulate nitric oxide, proinflammatory cytokines and PGE2 production through arginase activation. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 11(10):1237-1251.
- Asua JM (2002) Miniemulsion polymerization. *Progress in Polymer Science* 27(7):1283-1346.
- ASTM Standard E2834 (2012). Standard guide for measurement of particle size distribution of nanomaterials in suspension by nanoparticle tracking analysis (NTA).
- ASTM Standard E2456-06 (2020). Standard Terminology Relating to Nanotechnology
- Athens JW, Haab OP, Raab SO, Mauer AM, Ashenbrucker H, Cartwright GE & Wintrobe MM (1961) Leukokinetic studies. IV. The total blood, circulating and marginal granulocyte pools and the granulocyte turnover rate in normal subjects. *The Journal of clinical investigation* 40(6):989-995.
- Baggiolini M (1998) Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392(6676):565-568.

- Baglioni P, Chelazzi D & Giorgi R (2015) Innovative Nanomaterials: Principles, Availability and Scopes. *Nanotechnologies in the Conservation of Cultural Heritage*, Springer. p 1-14.
- Balasubramanian SK, Jittiwat J, Manikandan J, Ong CN, Yu LE, Ong WY. Biodistribution of gold nanoparticles and gene expression changes in the liver and spleen after intravenous administration in rats. *Biomaterials*. 2010 Mar;31(8):2034-42.
- Bargatze RF, Kurk S, Butcher EC & Jutila MA (1994) Neutrophils roll on adherent neutrophils bound to cytokine-induced endothelial cells via L-selectin on the rolling cells. *The Journal of experimental medicine* 180(5):1785-1792.
- Bastús NG, Sánchez-Tilló E, Pujals S, Farrera C, López C, Giralt E, Celada A, Lloberas J & Puentes V (2009) Homogeneous conjugation of peptides onto gold nanoparticles enhances macrophage response. *ACS Nano* 3(6):1335-1344.
- Bedau T, Schumacher N, Peters F, Prox J, Arnold P, Koudelka T, Helm O, Schmidt F, Rabe B, Jentzsch M, Rosenstiel P, Sebens S, Tholey A, Rose-John S & Becker-Pauly C (2017) Cancer-associated mutations in the canonical cleavage site do not influence CD99 shedding by the metalloprotease meprin β but alter cell migration in vitro. *Oncotarget* 8(33):54873-54888.
- Belambri SA, Rolas L, Raad H, Hurtado-Nedelec M, Dang PM & El-Benna J (2018) NADPH oxidase activation in neutrophils: Role of the phosphorylation of its subunits. *European journal of clinical investigation* 48 Suppl 2:e12951.
- Bellocq A, Antoine M, Flahault A, Philippe C, Crestani B, Bernaudin JF, Mayaud C, Milleron B, Baud L & Cadranel J (1998) Neutrophil alveolitis in bronchioloalveolar carcinoma: induction by tumor-derived interleukin-8 and relation to clinical outcome. *The American journal of pathology* 152(1):83-92.
- 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.
- Bonavita O, Massara M & Bonecchi R (2016) Chemokine regulation of neutrophil function in tumors. *Cytokine & growth factor reviews* 30:81-86.
- Boraschi D, Italiani P, Palomba R, Decuzzi P, Duschi A, Fadeel B & Moghimi SM (2017) Nanoparticles and innate immunity: new perspectives on host defence. *Seminars in immunology* 34:33-51.
- Borregaard N (2010) Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 33(5):657-670.
- Borregaard N & Cowland JB (1997) Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 89(10):3503-3521.
- Boschi F & De Sanctis F (2017) Overview of the optical properties of fluorescent nanoparticles for optical imaging. *European journal of histochemistry : EJH* 61(3):2830.
- Boucher D, Monteleone M, Coll RC, Chen KW, Ross CM, Teo JL, Gomez GA, Holley CL, Bierschenk D, Stacey KJ, Yap AS, Bezbradica JS & Schroder K (2018) Caspase-1 self-cleavage is an intrinsic mechanism to terminate inflammasome activity. *Journal of Experimental Medicine* 215(3):827-840.
- Brennan K & Zheng J (2007) Interleukin 8. *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, Enna SJ & Bylund DB (Édit.) Elsevier, New York <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.61916-6>. p 1-4.

- Briggs RT, Robinson JM, Karnovsky ML & Karnovsky MJ (1986) Superoxide production by polymorphonuclear leukocytes. A cytochemical approach. *Histochemistry* 84(4-6):371-378.
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y & Zychlinsky A (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303(5663):1532-1535.
- Brkic M, Balusu S, Libert C & Vandenbroucke RE (2015) Friends or Foes: Matrix Metalloproteinases and Their Multifaceted Roles in Neurodegenerative Diseases. *Mediators of Inflammation* 2015:620581.
- Brostjan C & Oehler R (2020) The role of neutrophil death in chronic inflammation and cancer. *Cell Death Discovery* 6(1):26.
- Brown DM, Donaldson K, Borm PJ, Schins RP, Dehnhardt M, Gilmour P, Jimenez LA & Stone V (2004) Calcium and ROS-mediated activation of transcription factors and TNF-alpha cytokine gene expression in macrophages exposed to ultrafine particles. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 286(2):L344-353.
- Buchalska M, Kras G, Oszejca M, Łasocha W & Macyk W (2010) Singlet oxygen generation in the presence of titanium dioxide materials used as sunscreens in suntan lotions. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 213(2):158-163.
- Cai L, Zhu J, Hou Y, Tong M & Kim H (2015) Influence of gravity on transport and retention of representative engineered nanoparticles in quartz sand. *Journal of Contaminant Hydrology* 181:153-160.
- Calafat J, Kuijpers TW, Janssen H, Borregaard N, Verhoeven AJ & Roos D (1993) Evidence for small intracellular vesicles in human blood phagocytes containing cytochrome b558 and the adhesion molecule CD11b/CD18. *Blood* 81(11):3122-3129.
- Caminade A-M, Fruchon S, Turrin C-O, Poupot M, Ouali A, Maraval A, Garzoni M, Maly M, Furer V, Kovalenko V, Majoral J-P, Pavan GM & Poupot R (2015) The key role of the scaffold on the efficiency of dendrimer nanodrugs. in *Nat Commun*, p 7722.
- Capucetti A, Albano F & Bonecchi R (2020) Multiple Roles for Chemokines in Neutrophil Biology. *Frontiers in immunology* 11:1259.
- Caravaggio G, Nossova L & Burich R (2016) Influence of Supports on Pd Catalysts for the Selective Catalytic Reduction of NOx with H2 and CO. *Emission Control Science and Technology* 2(1):10-19.
- Caron E & Hall A (1998) Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science* 282(5394):1717-1721.
- Castanheira FVS & Kubes P (2019) Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation. *Blood* 133(20):2178-2185.
- 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. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 169(7):3947-3953.
- Catania JM, Chen G & Parrish AR (2007) Role of matrix metalloproteinases in renal pathophysiology. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 292(3):F905-F911.
- Chaffey N (2003) Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. Molecular biology of the cell. 4th edn. *Ann Bot* 91(3):401-401.

- Canada-United States Regulatory Cooperation Council. (2015). Nanotechnology Initiative – Final Report Government of Canada. Retrieved from <http://nanportal.gc.ca/default.asp?lang=En&n=5A56CB00-1>
- Chandran PR & Thomas RT (2015) Chapter 14 - Gold Nanoparticles in Cancer Drug Delivery. *Nanotechnology Applications for Tissue Engineering*, Thomas S, Grohens Y & Ninan N (Édit.) William Andrew Publishing, Oxford <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-32889-0.00014-5>. p 221-237.
- Chanock SJ, el Benna J, Smith RM & Babior BM (1994) The respiratory burst oxidase. *The Journal of biological chemistry* 269(40):24519-24522.
- Chauhan A, Jain N & Diwan PD (2010) Pre-clinical and behavioural toxicity profile of PAMAM dendrimer in mice. *Royal Society of London Proceedings Series A* 466:1535-1550.
- Chen J, Wang H, Long W, Shen X, Wu D, Song S-S, Sun Y-M, Liu P-X, Fan S, Fan F & Zhang X-D (2013) Sex differences in the toxicity of polyethylene glycol-coated gold nanoparticles in mice. *International journal of nanomedicine* 8:2409-2419.
- Chen Y-S, Hung Y-C, Liao I & Huang GS (2009) Assessment of the in vivo toxicity of gold nanoparticles. *Nanoscale research letters* 4(8):858-864.
- Chen Y, Xianyu Y & Jiang X (2017) Surface Modification of Gold Nanoparticles with Small Molecules for Biochemical Analysis. *Accounts of Chemical Research* 50(2):310-319.
- Cheng Y, Samia AC, Meyers JD, Panagopoulos I, Fei B & Burda C (2008) Highly efficient drug delivery with gold nanoparticle vectors for in vivo photodynamic therapy of cancer. *Journal of the American Chemical Society* 130(32):10643-10647.
- Chesnutt BC, Smith DF, Raffler NA, Smith ML, White EJ & Ley K (2006) Induction of LFA-1-dependent neutrophil rolling on ICAM-1 by engagement of E-selectin. *Microcirculation* 13(2):99-109.
- Cho EC, Xie J, Wurm PA & Xia Y (2009a) Understanding the role of surface charges in cellular adsorption versus internalization by selectively removing gold nanoparticles on the cell surface with a I2/KI etchant. *Nano Lett* 9(3):1080-1084.
- Cho WS, Cho M, Jeong J, Choi M, Cho HY, Han BS, Kim SH, Kim HO, Lim YT, Chung BH & Jeong J (2009b) Acute toxicity and pharmacokinetics of 13 nm-sized PEG-coated gold nanoparticles. *Toxicology and applied pharmacology* 236(1):16-24.
- Chou CH, Teng CM, Tzen KY, Chang YC, Chen JH & Cheng JC (2012) MMP-9 from sublethally irradiated tumor promotes Lewis lung carcinoma cell invasiveness and pulmonary metastasis. *Oncogene* 31(4):458-468.
- Chovatiya R & Medzhitov R (2014) Stress, inflammation, and defense of homeostasis. *Molecular cell* 54(2):281-288.
- Ciaccia L (2011) Fundamentals of Inflammation. *Yale J Biol Med* 84(1):64-65.
- Cieutat AM, Lobel P, August JT, Kjeldsen L, Sengeløv H, Borregaard N & Bainton DF (1998) Azurophilic granules of human neutrophilic leukocytes are deficient in lysosome-associated membrane proteins but retain the mannose 6-phosphate recognition marker. *Blood* 91(3):1044-1058.
- Colotta F, Re F, Polentarutti N, Sozzani S & Mantovani A (1992) Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood* 80(8):2012-2020.

- Corpe WA (1970) *Attachment of marine bacteria to solid surfaces*. Academic Press, New York,
- Couvreur P, Barratt G, Fattal E, Legrand P & Vauthier C (2002) Nanocapsule technology: a review. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems* 19(2):99-134.
- Cowland JB & Borregaard N (2016a) Granulopoiesis and granules of human neutrophils. *Immunological Reviews* 273(1):11-28.
- Cowland JB & Borregaard N (2016b) Granulopoiesis and granules of human neutrophils. *Immunol Rev* 273(1):11-28.
- Cox G, Crossley J & Xing Z (1995) Macrophage engulfment of apoptotic neutrophils contributes to the resolution of acute pulmonary inflammation in vivo. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 12(2):232-237.
- Cui M, Liu R, Deng Z, Ge G, Liu Y & Xie L (2014) Quantitative study of protein coronas on gold nanoparticles with different surface modifications. *Nano Research* 7(3):345-352.
- Czarnomysy R, Bielawska A & Bielawski K (2019) Effect of 2nd and 3rd generation PAMAM dendrimers on proliferation, differentiation, and pro-inflammatory cytokines in human keratinocytes and fibroblasts. *International journal of nanomedicine* 14:7123-7139.
- Daniel MC & Astruc D (2004) Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chemical reviews* 104(1):293-346.
- Daniels TR, Bernabeu E, Rodríguez JA, Patel S, Kozman M, Chiappetta DA, Holler E, Ljubimova JY, Helguera G & Penichet ML (2012) The transferrin receptor and the targeted delivery of therapeutic agents against cancer. *Biochimica et biophysica acta* 1820(3):291-317.
- Dass D (2019) Structural and electronic properties of a C(N) fullerene with N = 20, 60, 80, 180, and 240. *Journal of molecular modeling* 26(1):9.
- Day RB & Link DC (2012) Regulation of neutrophil trafficking from the bone marrow. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 69(9):1415-1423.
- de Rooy DP, Zhernakova A, Tsonaka R, Willemze A, Kurreeman BA, Trynka G, van Toorn L, Toes RE, Huizinga TW, Houwing-Duistermaat JJ, Gregersen PK & van der Helm-van Mil AH (2014) A genetic variant in the region of MMP-9 is associated with serum levels and progression of joint damage in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 73(6):1163-1169.
- deCathelineau AM & Henson PM (2003) The final step in programmed cell death: phagocytes carry apoptotic cells to the grave. *Essays in biochemistry* 39:105-117.
- DeFranco AL, Robertson M, Locksley RM & Cunin R (2009) *Immunité: la réponse immunitaire dans les maladies infectieuses et inflammatoires*. De Boeck Supérieur. <https://books.google.fr/books?id=rszxvw6mQ6EC>
- DeLeo FR & Allen L-AH (2020) Phagocytosis and neutrophil extracellular traps. *Fac Rev* 9:25-25.
- Delves PJ, Martin SJ, Burton DR & Roitt IM (2017) *Roitt's essential immunology*. John Wiley & Sons,
- Demetri GD & Griffin JD (1991) Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood* 78(11):2791-2808.
- Dendritech (2015) PAMAM GHS MSDS NH2 Water. <http://www.dendritech.com/images/PAMAM%20GHS%20MSDS%20NH2%20Water.pdf>.

- Denkers EY, Del Rio L & Bennouna S (2003) Neutrophil production of IL-12 and other cytokines during microbial infection. *Chemical immunology and allergy* 83:95-114.
- Devarakonda B, Hill RA & de Villiers MM (2004) The effect of PAMAM dendrimer generation size and surface functional group on the aqueous solubility of nifedipine. *International Journal of Pharmaceutics* 284(1):133-140.
- De Jong, W. H., Hagens, W. I., Krystek, P., Burger, M. C., Sips, A. J. A. M., & Geertsma, R. E. (2008). Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials*, 29(12), 1912–1919.
- Dobrovolskaia MA & McNeil SE (2007) Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nature nanotechnology* 2(8):469.
- Downey GP, Butler JR, Tapper H, Fialkow L, Saltiel AR, Rubin BB & Grinstein S (1998) Importance of MEK in neutrophil microbicidal responsiveness. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 160(1):434-443.
- Dransfield I, Stocks SC & Haslett C (1995) Regulation of cell adhesion molecule expression and function associated with neutrophil apoptosis. *Blood* 85(11):3264-3273.
- Duarte DB, Vasko MR & Fehrenbacher JC (2012) Models of inflammation: carrageenan air pouch. *Current protocols in pharmacology* Chapter 5:Unit5.6.
- Duffin R, Leitch AE, Fox S, Haslett C & Rossi AG (2010) Targeting granulocyte apoptosis: mechanisms, models, and therapies. *Immunol Rev* 236:28-40.
- Dunford R, Salinaro A, Cai L, Serpone N, Horikoshi S, Hidaka H & Knowland J (1997) Chemical oxidation and DNA damage catalysed by inorganic sunscreen ingredients. *FEBS Letters* 418(1):87-90.
- Dupre-Crochet S, Erard M & Nubetae O (2013) ROS production in phagocytes: why, when, and where? *J Leukoc Biol* 94(4):657-670.
- Dusinska M, Magdolenova Z & Fjellsbø LM (2013) Toxicological aspects for nanomaterial in humans. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 948:1-12.
- Ebelegi A, Allen E, Nimibofa A & Donbebe W (2017) A Review of Synthesis, Characterization and Applications of Functionalized Dendrimers. 2017:8-14.
- 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.
- El Kebir D & Filep JG (2013) Targeting neutrophil apoptosis for enhancing the resolution of inflammation. *Cells* 2(2):330-348.
- Elsabahy M & Wooley KL (2013) Cytokines as biomarkers of nanoparticle immunotoxicity. *Chem Soc Rev* 42(12):5552-5576.
- Environnement Canada (2021), Ébauche des Directives pour la déclaration et les essais de substances nouvelles : substances chimiques et polymères. *En ligne*: <https://www.canada.ca/fr/environnement-changement-climatique/services/gestion-pollution/evaluation-substances-nouvelles/chimiques-polymeres/directives/declaration-essais.html>. Page consultée le 15 janvier 2022.
- Ermolin MS, Fedotov PS, Ivaneev AI, Karandashev VK, Fedyunina NN & Eskina VV (2017) Isolation and quantitative analysis of road dust nanoparticles. *Journal of Analytical Chemistry* 72(5):520-532.

- Fadeel B (2012) Clear and present danger? Engineered nanoparticles and the immune system. *Swiss medical weekly* 142(2526).
- Fadok VA, Voelker D, Campbell P, Cohen J, Bratton D & Henson P (1992) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *The Journal of Immunology* 148(7):2207-2216.
- Falagan-Lotsch P, Grzincic EM & Murphy CJ (2016) One low-dose exposure of gold nanoparticles induces long-term changes in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113(47):13318-13323.
- Fällman M, Lew DP, Stendahl O & Andersson T (1989) Receptor-mediated phagocytosis in human neutrophils is associated with increased formation of inositol phosphates and diacylglycerol. Elevation in cytosolic free calcium and formation of inositol phosphates can be dissociated from accumulation of diacylglycerol. *The Journal of clinical investigation* 84(3):886-891.
- Fantuzzi G & Dinarello CA (1999) Interleukin-18 and interleukin-1 beta: two cytokine substrates for ICE (caspase-1). *Journal of clinical immunology* 19(1):1-11.
- Faraday M (1857) X. The Bakerian Lecture.—Experimental relations of gold (and other metals) to light. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* (147):145-181.
- Faurschou M & Borregaard N (2003) Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and infection* 5(14):1317-1327.
- Feghali CA & Wright TM (1997) Cytokines in acute and chronic inflammation. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 2:d12-26.
- Ferroni P, Basili S, Martini F, Cardarello CM, Ceci F, Di Franco M, Bertazzoni G, Gazzaniga PP & Alessandri C (2003) Serum metalloproteinase 9 levels in patients with coronary artery disease: a novel marker of inflammation. *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research* 51(5):295-300.
- Filippi M-D (2019) Neutrophil transendothelial migration: updates and new perspectives. *Blood* 133(20):2149-2158.
- Fink SL & Cookson BT (2006) Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cellular microbiology* 8(11):1812-1825.
- Fitzer-Attas CJ, Lowry M, Crowley MT, Finn AJ, Meng F, DeFranco AL & Lowell CA (2000) Fcγ receptor-mediated phagocytosis in macrophages lacking the Src family tyrosine kinases Hck, Fgr, and Lyn. *The Journal of experimental medicine* 191(4):669-682.
- Folkman J, Merler E, Abernathy C & Williams G (1971) Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *The Journal of experimental medicine* 133(2):275-288.
- Forest V & Pourchez J (2017) Preferential binding of positive nanoparticles on cell membranes is due to electrostatic interactions: A too simplistic explanation that does not take into account the nanoparticle protein corona. *Materials Science and Engineering: C* 70:889-896.
- Foss Hansen S, Heggelund LR, Revilla Besora P, Mackevica A, Boldrin A & Baun A (2016) Nanoproducts – what is actually available to European consumers? *Environmental Science: Nano* 3(1):169-180.
- Fouret P, du Bois RM, Bernaudin JF, Takahashi H, Ferrans VJ & Crystal RG (1989) Expression of the neutrophil elastase gene during human bone marrow cell differentiation. *The Journal of experimental medicine* 169(3):833-845.

- Fox S, Leitch AE, Duffin R, Haslett C & Rossi AG (2010) Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. *Journal of innate immunity* 2(3):216-227.
- Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V & Zychlinsky A (2007) Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *Journal of Cell Biology* 176(2):231-241.
- Futosi K, Fodor S & Mócsai A (2013) Reprint of Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *International immunopharmacology* 17(4):1185-1197.
- Gainet J, Chollet-Martin S, Brion M, Hakim J, Gougerot-Pocidallo MA & Elbim C (1998) Interleukin-8 production by polymorphonuclear neutrophils in patients with rapidly progressive periodontitis: an amplifying loop of polymorphonuclear neutrophil activation. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 78(6):755-762.
- Garlanda C, Dinarello CA & Mantovani A (2013) The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity* 39(6):1003-1018.
- Gaspar EB, Sakai YI & Gaspari ED (2014) A mouse air pouch model for evaluating the immune response to *Taenia crassiceps* infection. *Experimental parasitology* 137:66-73.
- Geering B, Stoeckle C, Conus S & Simon HU (2013) Living and dying for inflammation: neutrophils, eosinophils, basophils. *Trends in immunology* 34(8):398-409.
- Germolec DR, Shipkowski KA, Frawley RP & Evans E (2018) Markers of Inflammation. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1803:57-79.
- Ghezzi P, Floridi L, Boraschi D, Cuadrado A, Manda G, Levic S, D'Acquisto F, Hamilton A, Athersuch TJ & Selley L (2018) Oxidative Stress and Inflammation Induced by Environmental and Psychological Stressors: A Biomarker Perspective. *Antioxidants & redox signaling* 28(9):852-872.
- Gialeli C, Theocharis AD & Karamanos NK (2011) Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *The FEBS journal* 278(1):16-27.
- Girard D (2014) Using the air pouch model for assessing in vivo inflammatory activity of nanoparticles. *International journal of nanomedicine* 9:1105-1107.
- Gleiter H (2000) Nanostructured materials: basic concepts and microstructure. *Acta Materialia* 48(1):1-29.
- Goddard DH, Bomalaski JS & Clark MA (1998) Phospholipase A2 activating protein induces tumor regression. *Drug news & perspectives* 11(2):104-110.
- Golstein P & Kroemer G (2007) Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in biochemical sciences* 32(1):37-43.
- Goncalves D, Chiasson S & Girard D (2010) Activation of human neutrophils by titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles. *Toxicology in Vitro* 24(3):1002-1008.
- Goncalves DM & Girard D (2014) Zinc oxide nanoparticles delay human neutrophil apoptosis by a de novo protein synthesis-dependent and reactive oxygen species-independent mechanism. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 28(5):926-931.

- Gonçalves DM & Girard D (2011) Titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles induce neutrophil influx and local production of several pro-inflammatory mediators in vivo. *International immunopharmacology* 11(8):1109-1115.
- Gonçalves DM & Girard D (2013) Evidence that polyhydroxylated C60 fullerenes (fullerenols) amplify the effect of lipopolysaccharides to induce rapid leukocyte infiltration in vivo. *Chemical research in toxicology* 26(12):1884-1892.
- Greenberg S, Chang P, Wang DC, Xavier R & Seed B (1996) Clustered syk tyrosine kinase domains trigger phagocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93(3):1103-1107.
- Greenberg S & Grinstein S (2002) Phagocytosis and innate immunity. *Current Opinion in Immunology* 14(1):136-145.
- Greish K, Thiagarajan G, Herd H, Price R, Bauer H, Hubbard D, Burckle A, Sadekar S, Yu T, Anwar A, Ray A & Ghandehari H (2012) Size and surface charge significantly influence the toxicity of silica and dendritic nanoparticles. *Nanotoxicology* 6(7):713-723.
- Groves D & Jiang Y (1995) Chemokines, a family of chemotactic cytokines. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 6(2):109-118.
- Guedj A-S, Kell AJ, Barnes M, Stals S, Gonçalves D, Girard D & Lavigne C (2015) Preparation, characterization, and safety evaluation of poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles for protein delivery into macrophages. *International journal of nanomedicine* 10:5965.
- Hainfeld JF, Dilmanian FA, Slatkin DN & Smilowitz HM (2008) Radiotherapy enhancement with gold nanoparticles. *Journal of pharmacy and pharmacology* 60(8):977-985.
- Hackley, V. A., & DelRio, F. W. (2013). Standard Guide for Size Measurement of Nanoparticles Using Atomic Force Microscopy.
- Halets I, Shcharbin D, Klajnert B & Bryszewska M (2013) Contribution of hydrophobicity, DNA and proteins to the cytotoxicity of cationic PAMAM dendrimers. *International journal of pharmaceutics* 454(1):1-3.
- Hammad S, Abdou AM & Omar MA (2014) Gebel-criteria for risk assessment in nanotoxicology. *EXCLI J* 13:1196-1197.
- Hampton MB, Kettle AJ & Winterbourn CC (1998) Inside the Neutrophil Phagosome: Oxidants, Myeloperoxidase, and Bacterial Killing. *Blood* 92(9):3007-3017.
- Hanayama R, Tanaka M, Miyasaka K, Aozasa K, Koike M, Uchiyama Y & Nagata S (2004) Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in MFG-E8-deficient mice. *Science* 304(5674):1147-1150.
- Hanley C, Thurber A, Hanna C, Punnoose A, Zhang J & Wingett DG (2009) The Influences of Cell Type and ZnO Nanoparticle Size on Immune Cell Cytotoxicity and Cytokine Induction. *Nanoscale Research Letters* 4(12):1409.
- Harush-Frenkel O, Debotton N, Benita S & Altschuler Y (2007) Targeting of nanoparticles to the clathrin-mediated endocytic pathway. *Biochemical and biophysical research communications* 353(1):26-32.
- Hassanen EI, Morsy EA, Hussien AM, Ibrahim MA & Farroh KY (2020) The effect of different concentrations of gold nanoparticles on growth performance, toxicopathological and immunological parameters of broiler chickens. *Biosci Rep* 40(3):BSR20194296.
- He C, Hu Y, Yin L, Tang C & Yin C (2010) Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials* 31(13):3657-3666.

- Henglein A (1985) Modern Trends in Colloid Science and Chemistry and Biology. (Ed.: H. F. Birke), *Birkhauser, Stuttgart*, :p. 121.
- Henry RM, Hoppe AD, Joshi N & Swanson JA (2004) The uniformity of phagosome maturation in macrophages. *The Journal of cell biology* 164(2):185-194.
- Hetz C (2012) The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13(2):89-102.
- Hillyer, J., & Albrecht, R. (1998). Correlative Instrumental Neutron Activation Analysis, Light Microscopy, Transmission Electron Microscopy, and X-ray Microanalysis for Qualitative and Quantitative Detection of Colloidal Gold Spheres in Biological Specimens. *Microscopy and Microanalysis*, 4(5), 481-490. doi:10.1017/S143192769898045X
- Hirai H & Kondo K (1991) Modified phases of diamond formed under shock compression and rapid quenching. *Science* 253(5021):772-774.
- Homburg CH, de Haas M, von dem Borne AE, Verhoeven AJ, Reutelingsperger CP & Roos D (1995) Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro. *Blood* 85(2):532-540.
- Honary S & Zahir F (2013) Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (Part 1). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 12(2):255-264.
- Hong S, Leroueil PR, Janus EK, Peters JL, Kober MM, Islam MT, Orr BG, Baker JR, Jr. & Banaszak Holl MM (2006) Interaction of polycationic polymers with supported lipid bilayers and cells: nanoscale hole formation and enhanced membrane permeability. *Bioconjug Chem* 17(3):728-734.
- Hopps E & Caimi G (2015) Matrix metalloproteases as a pharmacological target in cardiovascular diseases. *European review for medical and pharmacological sciences* 19(14):2583-2589.
- Hsu JC, Naha PC, Lau KC, Chhour P, Hastings R, Moon BF, Stein JM, Witschey WRT, McDonald ES, Maidment ADA & Cormode DP (2018) An all-in-one nanoparticle (AION) contrast agent for breast cancer screening with DEM-CT-MRI-NIRF imaging. *Nanoscale* 10(36):17236-17248.
- Huang X, Jain PK, El-Sayed IH & El-Sayed MA (2008) Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles. *Lasers in medical science* 23(3):217-228.
- Hubbard D, Enda M, Bond T, Moghaddam SP, Conarton J, Scaife C, Volckmann E & Ghandehari H (2015) Transepithelial Transport of PAMAM Dendrimers Across Isolated Human Intestinal Tissue. *Molecular pharmaceuticals* 12(11):4099-4107.
- Hughes CE & Nibbs RJB (2018) A guide to chemokines and their receptors. *The FEBS journal* 285(16):2944-2971.
- Ilinskaya A & Dobrovol'skaia M (2016) Interaction Between Nanoparticles and Plasma Proteins: Effects on Nanoparticle Biodistribution and Toxicity. 10.1007/978-3-319-41421-8_15. p 505-520.
- Indik ZK, Park JG, Pan XQ & Schreiber AD (1995) Induction of phagocytosis by a protein tyrosine kinase. *Blood* 85(5):1175-1180.
- ISO (2015) ISO/TS 80004-2; Nanotechnologies — Vocabulaire — Partie 2: Nano-objets.).
- ISO 10808 (2010) (en) Nanotechnologies — Characterization of nanoparticles in inhalation exposure chambers for inhalation toxicity testing

- Jaillon S, Berthenet K & Garlanda C (2019) Sexual Dimorphism in Innate Immunity. *Clinical reviews in allergy & immunology* 56(3):308-321.
- Jaillon S, Galdiero MR, Del Prete D, Cassatella MA, Garlanda C & Mantovani A (2013) Neutrophils in innate and adaptive immunity. *Seminars in immunopathology*. Springer, p 377-394.
- Jain PK, El-Sayed IH & El-Sayed MA (2007) Au nanoparticles target cancer. *nano today* 2(1):18-29.
- Janeway C (2005) *Immunobiology: The Immune System In Health And Disease*. Garland Science Taylor & Francis Group. <https://books.google.ca/books?id=aWN6kgEACAAJ>
- Roberts JC, Bhalgat MK, Zera RT. Preliminary biological evaluation of polyamidoamine (PAMAM) Starburst dendrimers. *J Biomed Mater Res*. 1996 Jan;30(1):53-65.
- Jenkins JK, Malyak M & Arend WP (1994) The effects of interleukin-10 on interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 beta production in human monocytes and neutrophils. *Lymphokine and cytokine research* 13(1):47-54.
- Jensen HK, Donskov F, Marcussen N, Nordmark M, Lundbeck F & von der Maase H (2009) Presence of intratumoral neutrophils is an independent prognostic factor in localized renal cell carcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27(28):4709-4717.
- Jeong YS, Oh WK, Kim S & Jang J (2011) Cellular uptake, cytotoxicity, and ROS generation with silica/conducting polymer core/shell nanospheres. *Biomaterials* 32(29):7217-7225.
- Jin Z, Piao L, Sun G, Lv C, Jing Y & Jin R (2021) Dual functional nanoparticles efficiently across the blood-brain barrier to combat glioblastoma via simultaneously inhibit the PI3K pathway and NKG2A axis. *Journal of drug targeting* 29(3):323-335.
- Jones CF, Campbell RA, Brooks AE, Assemi S, Tadjiki S, Thiagarajan G, Mulcock C, Weyrich AS, Brooks BD, Ghandehari H & Grainger DW (2012) Cationic PAMAM dendrimers aggressively initiate blood clot formation. *ACS Nano* 6(11):9900-9910.
- Jones JA, Barbour JR, Lowry AS, Bouges S, Beck C, McClister DM, Jr., Mukherjee R & Ikonomidis JS (2006) Spatiotemporal expression and localization of matrix metalloproteinase-9 in a murine model of thoracic aortic aneurysm. *Journal of vascular surgery* 44(6):1314-1321.
- Jorch SK & Kubersky P (2017) An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nature medicine* 23(3):279-287.
- Julien O, Zhuang M, Wiita AP, O'Donoghue AJ, Knudsen GM, Craik CS & Wells JA (2016) Quantitative MS-based enzymology of caspases reveals distinct protein substrate specificities, hierarchies, and cellular roles. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113(14):E2001-E2010.
- Kansas GS (1996) Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* 88(9):3259-3287.
- Kapoor C, Vaidya S, Wadhwan V, H, Kaur G & Pathak A (2016) Seesaw of matrix metalloproteinases (MMPs). *Journal of Cancer Research and Therapeutics* 12(1):28-35.
- Kasama T, Strieter RM, Standiford TJ, Burdick MD & Kunkel SL (1993) Expression and regulation of human neutrophil-derived macrophage inflammatory protein 1 alpha. *The Journal of experimental medicine* 178(1):63-72.

- Kaszuba M, McKnight D, Connah MT, McNeil-Watson FK & Nobbmann U (2008) Measuring sub nanometre sizes using dynamic light scattering. *Journal of Nanoparticle Research* 10(5):823-829.
- Kearney CJ, Cullen SP, Tynan GA, Henry CM, Clancy D, Lavelle EC & Martin SJ (2015) Necroptosis suppresses inflammation via termination of TNF- or LPS-induced cytokine and chemokine production. *Cell death and differentiation* 22(8):1313-1327.
- Keck T, Balcom JHt, Fernández-del Castillo C, Antoniu BA & Warshaw AL (2002) Matrix metalloproteinase-9 promotes neutrophil migration and alveolar capillary leakage in pancreatitis-associated lung injury in the rat. *Gastroenterology* 122(1):188-201.
- Keller AA, McFerran S, Lazareva A & Suh S (2013) Global life cycle releases of engineered nanomaterials. *Journal of Nanoparticle Research* 15(6):1692.
- Kennedy LC, Bickford LR, Lewinski NA, Coughlin AJ, Hu Y, Day ES, West JL & Drezek RA (2011) A new era for cancer treatment: gold-nanoparticle-mediated thermal therapies. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 7(2):169-183.
- Kesharwani P, Banerjee S, Gupta U, Mohd Amin MCI, Padhye S, Sarkar FH & Iyer AK (2015) PAMAM dendrimers as promising nanocarriers for RNAi therapeutics. *Materials Today* 18(10):565-572.
- Kettritz R, SCHREIBER A, LUFT FC & HALLER H (2001) Role of Mitogen-Activated Protein Kinases in Activation of Human Neutrophils by Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies. *Journal of the American Society of Nephrology* 12(1):37-46.
- Khan HA, Abdelhalim MAK, Alhomida AS & Al-Ayed MS (2013) Effects of Naked Gold Nanoparticles on Proinflammatory Cytokines mRNA Expression in Rat Liver and Kidney. *BioMed Research International* 2013:590730.
- Khan IU, Serra CA, Anton N & Vandamme TF (2015) Production of nanoparticle drug delivery systems with microfluidics tools. *Expert opinion on drug delivery* 12(4):547-562.
- Khatri M, Bello D, Pal AK, Cohen JM, Woskie S, Gassert T, Lan J, Gu AZ, Demokritou P & Gaines P (2013) Evaluation of cytotoxic, genotoxic and inflammatory responses of nanoparticles from photocopiers in three human cell lines. *Particle and fibre toxicology* 10(1):42.
- Kiefer F, Brumell J, Al-Alawi N, Latour S, Cheng A, Veillette A, Grinstein S & Pawson T (1998) The Syk protein tyrosine kinase is essential for Fcγ receptor signaling in macrophages and neutrophils. *Molecular and cellular biology* 18(7):4209-4220.
- Kim D & Haynes CL (2013) The role of p38 MAPK in neutrophil functions: single cell chemotaxis and surface marker expression. *The Analyst* 138(22):6826-6833.
- Kim HK, De La Luz Sierra M, Williams CK, Gulino AV & Tosato G (2006) G-CSF down-regulation of CXCR4 expression identified as a mechanism for mobilization of myeloid cells. *Blood* 108(3):812-820.
- Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA & Kuby J (2007) *Kuby Immunology*. W. H. Freeman. <https://books.google.fr/books?id=oOsFf2WfE5wC>
- Kitchens KM, Foraker AB, Kolhatkar RB, Swaan PW & Ghandehari H (2007) Endocytosis and Interaction of Poly (Amidoamine) Dendrimers with Caco-2 Cells. *Pharmaceutical research* 24(11):2138-2145.
- Klajnert B & Bryszewska M (2001) Dendrimers: properties and applications. *Acta biochimica Polonica* 48(1):199-208.

- Klajnert B, Stanisławska L, Bryszewska M & Pałecz B (2003) Interactions between PAMAM dendrimers and bovine serum albumin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1648(1):115-126.
- Klinke A, Nussbaum C, Kubala L, Friedrichs K, Rudolph TK, Rudolph V, Paust HJ, Schröder C, Benten D, Lau D, Szocs K, Furtmüller PG, Heeringa P, Sydow K, Duchstein HJ, Ehmke H, Schumacher U, Meinertz T, Sperandio M & Baldus S (2011) Myeloperoxidase attracts neutrophils by physical forces. *Blood* 117(4):1350-1358.
- Kobayashi Y (2008) The role of chemokines in neutrophil biology. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 13:2400-2407.
- Köhler A, De Filippo K, Hasenberg M, van den Brandt C, Nye E, Hosking MP, Lane TE, Männ L, Ransohoff RM, Hauser AE, Winter O, Schraven B, Geiger H, Hogg N & Gunzer M (2011) G-CSF-mediated thrombopoietin release triggers neutrophil motility and mobilization from bone marrow via induction of Cxcr2 ligands. *Blood* 117(16):4349-4357.
- Kolaczowska E & Kubes P (2013) Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* 13(3):159-175.
- Kreibig U & Vollmer M (1995) Theoretical considerations. *Optical properties of metal clusters*, Springer. p 13-201.
- Kupsa T, Horacek JM & Jebavy L (2012) The role of cytokines in acute myeloid leukemia: a systematic review. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia* 156(4):291-301.
- Kwiatkowska K & Sobota A (1999) Signaling pathways in phagocytosis. *Bioessays* 21(5):422-431.
- Lakshman R & Finn A (2001) Neutrophil disorders and their management. *Journal of Clinical Pathology* 54(1):7-19.
- Lan S, Yang H, Zhang G, Wu X, Chen Q, Chen L, Chen H & Guo T (2017) Importance of Solvent Removal Rate on the Morphology and Device Performance of Organic Photovoltaics with Solvent Annealing. *ACS applied materials & interfaces* 9(24):20679-20685.
- Larsen GL & Henson PM (1983) Mediators of Inflammation. *Annual Review of Immunology* 1(1):335-359.
- Lawrence SM, Corriden R & Nizet V (2018) The Ontogeny of a Neutrophil: Mechanisms of Granulopoiesis and Homeostasis. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 82(1).
- Lee JH, Cha KE, Kim MS, Hong HW, Chung DJ, Ryu G & Myung H (2009) Nanosized polyamidoamine (PAMAM) dendrimer-induced apoptosis mediated by mitochondrial dysfunction. *Toxicology letters* 190(2):202-207.
- Lee WL, Harrison RE & Grinstein S (2003) Phagocytosis by neutrophils. *Microbes and infection* 5(14):1299-1306.
- Lefort CT, Rossaint J, Moser M, Petrich BG, Zarbock A, Monkley SJ, Critchley DR, Ginsberg MH, Fässler R & Ley K (2012) Distinct roles for talin-1 and kindlin-3 in LFA-1 extension and affinity regulation. *Blood* 119(18):4275-4282.
- Lehman HK & Segal BH (2020) The role of neutrophils in host defense and disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 145(6):1535-1544.

- Lei J, Rosenzweig JM, Mishra MK, Alshehri W, Brancusi F, McLane M, Almalki A, Bahabry R, Arif H, Rozzah R, Alyousif G, Shabi Y, Alhehaily N, Zhong W, Facciabene A, Kannan S, Kannan RM & Burd I (2017) Maternal dendrimer-based therapy for inflammation-induced preterm birth and perinatal brain injury. *Scientific reports* 7(1):6106.
- Leiding JW (2017) Neutrophil Evolution and Their Diseases in Humans. *Frontiers in immunology* 8:1009-1009.
- Leifler KS, Svensson S, Abrahamsson A, Bendrik C, Robertson J, Gauldie J, Olsson AK & Dabrosin C (2013) Inflammation induced by MMP-9 enhances tumor regression of experimental breast cancer. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 190(8):4420-4430.
- Lemire J, Alhasawi A, Appanna VP, Tharmalingam S & Appanna VD (2017) Metabolic defence against oxidative stress: the road less travelled so far. *Journal of applied microbiology* 123(4):798-809.
- Levy BD, Clish CB, Schmidt B, Gronert K & Serhan CN (2001) Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nature immunology* 2(7):612-619.
- 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 J, Li H, Xu J, Zhao X, Song S & Zhang H (2020) Myocardial infarction biomarker C-reactive protein detection on nanocomposite aptasensor. *Biotechnology and applied biochemistry* 10.1002/bab.2093.
- Li X, Tsibouklis J, Weng T, Zhang B, Yin G, Feng G, Cui Y, Savina IN, Mikhalovska LI, Sandeman SR, Howel CA & Mikhalovsky SV (2017) Nano carriers for drug transport across the blood-brain barrier. *Journal of drug targeting* 25(1):17-28.
- Li X, Zhang Q, Hou P, Chen M, Hui W, Vermorken A, Luo Z, Li H, Li Q & Cui Y (2015) Gold magnetic nanoparticle conjugate-based lateral flow assay for the detection of IgM class antibodies related to TORCH infections. *International journal of molecular medicine* 36(5):1319-1326.
- Li Y, Wang W, Yang F, Xu Y, Feng C & Zhao Y (2019) The regulatory roles of neutrophils in adaptive immunity. *Cell Communication and Signaling* 17(1):147.
- Liang J, Chen M, Hughes D, Chumanovich AA, Altilla S, Kaza V, Lim CU, Kiaris H, Myhreye K, Pena MM, Broude EV & Roninson IB (2018) CDK8 Selectively Promotes the Growth of Colon Cancer Metastases in the Liver by Regulating Gene Expression of TIMP3 and Matrix Metalloproteinases. *Cancer research* 78(23):6594-6606.
- Limbach LK, Li Y, Grass RN, Brunner TJ, Hintermann MA, Muller M, Gunther D & Stark WJ (2005) Oxide nanoparticle uptake in human lung fibroblasts: effects of particle size, agglomeration, and diffusion at low concentrations. *Environmental science & technology* 39(23):9370-9376.
- Lindsey M, Wedin K, Brown MD, Keller C, Evans AJ, Smolen J, Burns AR, Rossen RD, Michael L & Entman M (2001) Matrix-dependent mechanism of neutrophil-mediated release and activation of matrix metalloproteinase 9 in myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation* 103(17):2181-2187.
- Liu H, Liu T, Wang H, Li L, Tan L, Fu C, Nie G, Chen D & Tang F (2013) Impact of PEGylation on the biological effects and light heat conversion efficiency of gold nanoshells on silica nanorattles. *Biomaterials* 34(28):6967-6975.

- Liu X, Atwater M, Wang J & Huo Q (2007) Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* 58(1):3-7.
- Liz-Marzán LM (2020) Nanometals: formation and color. *Colloidal Synthesis of Plasmonic Nanometals*, Jenny Stanford Publishing. p 1-13.
- Lopes J, Adiguzel E, Gu S, Liu SL, Hou G, Heximer S, Assoian RK & Bendeck MP (2013) Type VIII collagen mediates vessel wall remodeling after arterial injury and fibrous cap formation in atherosclerosis. *Am J Pathol* 182(6):2241-2253.
- Lunoo T, Assawakhajornsak J & Puangmali T (2019) In Silico Study of Gold Nanoparticle Uptake into a Mammalian Cell: Interplay of Size, Shape, Surface Charge, and Aggregation. *The Journal of Physical Chemistry C* 123(6):3801-3810.
- Luo Y-H, Chang LW & Lin P (2015) Metal-Based Nanoparticles and the Immune System: Activation, Inflammation, and Potential Applications. *BioMed Research International* 2015:143720.
- Magalhaes MAO & Glogauer M (2010) Pivotal Advance: Phospholipids determine net membrane surface charge resulting in differential localization of active Rac1 and Rac2. *Journal of leukocyte biology* 87(4):545-555.
- Mahalingam S & Karupiah G (1999) Chemokines and chemokine receptors in infectious diseases. *Immunology and cell biology* 77(6):469-475.
- Maher MA, Naha PC, Mukherjee SP & Byrne HJ (2014) Numerical simulations of in vitro nanoparticle toxicity—the case of poly (amido amine) dendrimers. *Toxicology in vitro* 28(8):1449-1460.
- Maji SK, Sreejith S, Joseph J, Lin M, He T, Tong Y, Sun H, Yu SW-K & Zhao Y (2014) Upconversion Nanoparticles as a Contrast Agent for Photoacoustic Imaging in Live Mice. *Advanced Materials* 26(32):5633-5638.
- Malik N, Wiwattanapatapee R, Klopsch R, Lorenz K, Frey H, Weener JW, Meijer EW, Paulus W & Duncan R (2000) Dendrimers: relationship between structure and biocompatibility in vitro, and preliminary studies on the biodistribution of 125I-labelled polyamidoamine dendrimers in vivo. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 65(1-2):133-148.
- Mansfield PJ, Shayman JA & Boxer LA (2000) Regulation of polymorphonuclear leukocyte phagocytosis by myosin light chain kinase after activation of mitogen-activated protein kinase. *Blood* 95(7):2407-2412.
- Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C & Jaillon S (2011) Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature reviews immunology* 11(8):519-531.
- Martin C, Riou B & Vallet B (2006) *Physiologie humaine appliquée*. Arnette. <https://books.google.ca/books?id=pyB-YERyjJ4C>
- Massena S, Christoffersson G, Hjertström E, Zcharia E, Vlodaysky I, Ausmees N, Rolny C, Li JP & Phillipson M (2010) A chemotactic gradient sequestered on endothelial heparan sulfate induces directional intraluminal crawling of neutrophils. *Blood* 116(11):1924-1931.
- Massol P, Montcourrier P, Guillemot JC & Chavrier P (1998) Fc receptor-mediated phagocytosis requires CDC42 and Rac1. *The EMBO journal* 17(21):6219-6229.
- McDonald B, McAvoy EF, Lam F, Gill V, de la Motte C, Savani RC & Kubes P (2008) Interaction of CD44 and hyaluronan is the dominant mechanism for neutrophil sequestration in inflamed liver sinusoids. *The Journal of experimental medicine* 205(4):915-927.

- McEver RP & Cummings RD (1997) Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *The Journal of clinical investigation* 100(11 Suppl):S97-103.
- McInnes IB (2013) 26 - Cytokines. *Kelley's Textbook of Rheumatology (Ninth Edition)*, Firestein GS, Budd RC, Gabriel SE, McInnes IB & O'dell JR (Édit.) W.B. Saunders, Philadelphia <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-1738-9.00026-8>. p 369-381.
- McLarnon J (2016) Chemokine Interleukin-8 (IL-8) in Alzheimer's and Other Neurodegenerative Diseases. *Journal of Alzheimer's Disease & Parkinsonism* 6.
- Mecke A, Majoros IJ, Patri AK, Baker JR, Jr., Holl MM & Orr BG (2005) Lipid bilayer disruption by polycationic polymers: the roles of size and chemical functional group. *Langmuir* 21(23):10348-10354.
- Medzhitov R (2008) Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454(7203):428-435.
- Medzhitov R (2010) Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell* 140(6):771-776.
- Mehner C, Hockla A, Miller E, Ran S, Radisky DC & Radisky ES (2014) Tumor cell-produced matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) drives malignant progression and metastasis of basal-like triple negative breast cancer. *Oncotarget* 5(9):2736-2749.
- Meijer OC, Koorneef LL & Kroon J (2018) Glucocorticoid receptor modulators. *Annales d'endocrinologie* 79(3):107-111.
- Menezes GB, Lee WY, Zhou H, Waterhouse CC, Cara DC & Kubes P (2009) Selective down-regulation of neutrophil Mac-1 in endotoxemic hepatic microcirculation via IL-10. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 183(11):7557-7568.
- Menjoge AR, Rinderknecht AL, Navath RS, Faridnia M, Kim CJ, Romero R, Miller RK & Kannan RM (2011) Transfer of PAMAM dendrimers across human placenta: prospects of its use as drug carrier during pregnancy. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 150(3):326-338.
- Miriam M, Markus GM, Edgar GE & Irv LW (2002) Origine des cellules dendritiques. *Hématologie* 7(6):429-439.
- Mitsudome T & Kaneda K (2013) Gold nanoparticle catalysts for selective hydrogenations. *Green Chemistry* 15(10):2636-2654.
- Mócsai A, Jakus Z, Vántus T, Berton G, Lowell CA & Ligeti E (2000) Kinase pathways in chemoattractant-induced degranulation of neutrophils: the role of p38 mitogen-activated protein kinase activated by Src family kinases. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 164(8):4321-4331.
- Molloy EJ, O'Neill AJ, Grantham JJ, Sheridan-Pereira M, Fitzpatrick JM, Webb DW & Watson RWG (2003) Sex-specific alterations in neutrophil apoptosis: the role of estradiol and progesterone. *Blood* 102(7):2653-2659.
- Monopoli MP, Åberg C, Salvati A & Dawson KA (2012) Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nature Nanotechnology* 7(12):779-786.
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL & O'Garra A (2001) Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19:683-765.
- Morris CJ (2003) Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 225:115-121.

- Moulding DA, Akgul C, Derouet M, White MR & Edwards SW (2001) BCL-2 family expression in human neutrophils during delayed and accelerated apoptosis. *Journal of leukocyte biology* 70(5):783-792.
- Moyano DF, Goldsmith M, Solfiell DJ, Landesman-Milo D, Miranda OR, Peer D & Rotello VM (2012) Nanoparticle Hydrophobicity Dictates Immune Response. *Journal of the American Chemical Society* 134(9):3965-3967.
- Mukherjee SP & Byrne HJ (2013) Polyamidoamine dendrimer nanoparticle cytotoxicity, oxidative stress, caspase activation and inflammatory response: experimental observation and numerical simulation. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 9(2):202-211.
- Muller RH, Mader K & Gohla S (2000) Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* 50(1):161-177.
- Muñoz LE, Bilyy R, Biermann MHC, Kienhöfer D, Maueröder C, Hahn J, Brauner JM, Weidner D, Chen J, Scharin-Mehlmann M, Janko C, Friedrich RP, Mielenz D, Dumych T, Lootsik MD, Schauer C, Schett G, Hoffmann M, Zhao Y & Herrmann M (2016) Nanoparticles size-dependently initiate self-limiting NETosis-driven inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113(40):E5856-E5865.
- Munoz LE, Gaipal US, Franz S, Sheriff A, Voll RE, Kalden JR & Herrmann M (2005) SLE--a disease of clearance deficiency? *Rheumatology (Oxford)* 44(9):1101-1107.
- Murphy BM, O'Neill AJ, Adrain C, Watson RW & Martin SJ (2003) The apoptosome pathway to caspase activation in primary human neutrophils exhibits dramatically reduced requirements for cytochrome C. *The Journal of experimental medicine* 197(5):625-632.
- Na'ara S, Amit M & Gil Z (2019) L1CAM induces perineural invasion of pancreas cancer cells by upregulation of metalloproteinase expression. *Oncogene* 38(4):596-608.
- Nagase H & Woessner JF, Jr. (1999) Matrix metalloproteinases. *The Journal of biological chemistry* 274(31):21491-21494.
- Nathan C (2002) Points of control in inflammation. *Nature* 420(6917):846-852.
- Nathan C (2006) Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature reviews immunology* 6(3):173-182.
- Nauseef WM (2007) How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol Rev* 219:88-102.
- Nel A, Xia T, Mädler L & Li N (2006) Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311(5761):622-627.
- Nel AE, Madler L, Velegol D, Xia T, Hoek EM, Somasundaran P, Klaessig F, Castranova V & Thompson M (2009) Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nature materials* 8(7):543-557.
- Nguyen SH, Allin-Pfister AC & Bourouina R (2008) *Manuel d'anatomie et de physiologie*. Ed. Lamarre. <https://books.google.ca/books?id=hoZ-PXONNQkC>
- Nigavekar, S. S., Sung, L. Y., Llanes, M., El-Jawahri, A., Lawrence, T. S., Becker, C. W., ... & Khan, M. K. (2004). 3H dendrimer nanoparticle organ/tumor distribution. *Pharmaceutical research*, 21(3), 476-483.

- Niu Y, Wang P, Zhao Y & Fan A (2013) Turn-on colorimetric sensor for ultrasensitive detection of thrombin using fibrinogen-gold nanoparticle conjugate. *The Analyst* 138(5):1475-1482.
- Noël C, Simard JC & Girard D (2016) Gold nanoparticles induce apoptosis, endoplasmic reticulum stress events and cleavage of cytoskeletal proteins in human neutrophils. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 31:12-22.
- Nordenfelt P & Tapper H (2011) Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *Journal of leukocyte biology* 90(2):271-284.
- Nowack B & Bucheli TD (2007) Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)* 150(1):5-22.
- OECD (2021, Evaluation of Tools and Models Used for Assessing Environmental Exposure to Manufactured Nanomaterials;
- O'Shea JJ, Gadina M & Siegel RM (2019) 9 - Cytokines and Cytokine Receptors. *Clinical Immunology (Fifth Edition)*, Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Schroeder HW, Frew AJ & Weyand CM (Édit.) Elsevier, London <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6896-6.00009-0>. p 127-155.e121.
- Oberdorster G (2005) Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Part. Fibre Toxicol.* 2.
- Opdenakker G, Masure S, Grillet B & Van Damme J (1991) Cytokine-mediated regulation of human leukocyte gelatinases and role in arthritis. *Lymphokine and cytokine research* 10(4):317-324.
- Ostiguy C RB, Woods C., SoucyB., (2010) RAPPORT R-646 Les nanoparticules de synthèse; Connaissances actuelles sur les risques et les mesures de prévention en SST; 2e édition; IRSST.
- Pan Y, Leifert A, Graf M, Schiefer F, Thoröe-Boveleth S, Broda J, Halloran MC, Hollert H, Laaf D, Simon U & Jahnen-Dechent W (2013) High-sensitivity real-time analysis of nanoparticle toxicity in green fluorescent protein-expressing zebrafish. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 9(6):863-869.
- Pan Y, Leifert A, Ruau D, Neuss S, Bornemann J, Schmid G, Brandau W, Simon U & Jahnen-Dechent W (2009) Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 5(18):2067-2076.
- Panyam J & Labhsetwar V (2003) Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced drug delivery reviews* 55(3):329-347.
- Park JG, Murray RK, Chien P, Darby C & Schreiber AD (1993) Conserved cytoplasmic tyrosine residues of the gamma subunit are required for a phagocytic signal mediated by Fc gamma RIIIA. *The Journal of clinical investigation* 92(4):2073-2079.
- Parratt JR & West GB (1958) Inhibition by various substances of oedema formation in the hind-paw of the rat induced by 5-hydroxytryptamine, histamine, dextran, egg-white and compound 48/80. *British journal of pharmacology and chemotherapy* 13(1):65-70.
- Pasparakis M & Vandenabeele P (2015) Necroptosis and its role in inflammation. *Nature* 517(7534):311-320.
- Patel M, De Paoli SH, Elhelu OK, Farooq S & Simak J (2019) Cell membrane disintegration and extracellular vesicle release in a model of different size and charge PAMAM dendrimers effects on cultured endothelial cells. *Nanotoxicology* 13(5):664-681.

- Patil S, Sandberg A, Heckert E, Self W & Seal S (2007) Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential. *Biomaterials* 28(31):4600-4607.
- Pego ER, Fernández I & Núñez MJ (2018) Molecular basis of the effect of MMP-9 on the prostate bone metastasis: A review. *Urologic oncology* 36(6):272-282.
- Petri B & Sanz MJ (2018) Neutrophil chemotaxis. *Cell and tissue research* 371(3):425-436.
- Phillipson M, Heit B, Colarusso P, Liu L, Ballantyne CM & Kubes P (2006) Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *The Journal of experimental medicine* 203(12):2569-2575.
- Poirier M, Simard J-C & Girard D (2016a) Silver nanoparticles of 70 nm and 20 nm affect differently the biology of human neutrophils. *Journal of immunotoxicology* 13(3):375-385.
- Poirier M, Simard JC, Antoine F & Girard D (2014) Interaction between silver nanoparticles of 20 nm (AgNP20) and human neutrophils: induction of apoptosis and inhibition of de novo protein synthesis by AgNP20 aggregates. *Journal of applied toxicology : JAT* 34(4):404-412.
- Poirier M, Simard JC & Girard D (2016b) Silver nanoparticles of 70 nm and 20 nm affect differently the biology of human neutrophils. *Journal of immunotoxicology* 13(3):375-385.
- Pokharkar V, Dhar S, Bhumkar D, Mali V, Bodhankar S & Prasad B (2009) Acute and subacute toxicity studies of chitosan reduced gold nanoparticles: a novel carrier for therapeutic agents. *Journal of biomedical nanotechnology* 5(3):233-239.
- Pouran HM (2018) Engineered Nanomaterials in the Environment, their Potential Fate and Behaviour and Emerging Techniques to Measure Them. *Handbook of Environmental Materials Management*, Hussain CM (Édit.) Springer International Publishing, Cham10.1007/978-3-319-58538-3_95-1. p 1-15.
- Premack BA & Schall TJ (1996) Chemokine receptors: gateways to inflammation and infection. *Nature medicine* 2(11):1174-1178.
- Prima-Québec (2018-2019) Construire l'avenir-Rapport annuel 2018-2019. <https://www.prima.ca/wp-content/uploads/2020/03/PRIMA-RAPPORT-ANNUEL-201819.pdf>.
- Pryor JB, Harper BJ & Harper SL (2014) Comparative toxicological assessment of PAMAM and thiophosphoryl dendrimers using embryonic zebrafish. *International journal of nanomedicine* 9:1947-1956.
- R-nano.fr (2021) Déclaration des substances à l'état nanoparticulaire. www.R-nano.fr.
- Raffaele Badolato SF, Lucia D, Notarangelo, Gianfranco Savoldi (2004) Congenital Neutropenia: Advances in Diagnosis and Treatment. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 4(6).
- Ram M, Sherer Y & Shoenfeld Y (2006) Matrix metalloproteinase-9 and autoimmune diseases. *Journal of clinical immunology* 26(4):299-307.
- Rather LJ (1971) Disturbance of function (functio laesa): the legendary fifth cardinal sign of inflammation, added by Galen to the four cardinal signs of Celsus. *Bulletin of the New York Academy of Medicine* 47(3):303-322.
- Recchiuti A, Mattoscio D & Isopi E (2019) Roles, Actions, and Therapeutic Potential of Specialized Pro-resolving Lipid Mediators for the Treatment of Inflammation in Cystic Fibrosis. *Frontiers in Pharmacology* 10(252).

- Riley RS & Day ES (2017) Gold nanoparticle-mediated photothermal therapy: applications and opportunities for multimodal cancer treatment. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* 9(4):e1449.
- Rodriguez-Quijada C, Sanchez-Purra M, de Puig H & Hamad-Schifferli K (2018) Physical Properties of Biomolecules at the Nanomaterial Interface. *The journal of physical chemistry. B* 122(11):2827-2840.
- Roos D, van Bruggen R & Meischl C (2003) Oxidative killing of microbes by neutrophils. *Microbes and infection* 5(14):1307-1315.
- Rosales C (2018) Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? *Frontiers in physiology* 9:113.
- Rosales C, Demaurex N, Lowell CA & Uribe-Querol E (2016) Neutrophils: Their Role in Innate and Adaptive Immunity. *Journal of Immunology Research* 2016:1469780.
- Rossi A, Ward C & Dransfield I (2004) Getting to Grips With the Granulocyte: Manipulation of Granulocyte Behaviour and Apoptosis by Protein Transduction Methods. *Biochemical Society transactions* 32(Pt3):452-455.
- Rudack C, Maune S, Eble J & Schroeder JM (2003) The primary role in biologic activity of the neutrophil chemokines IL-8 and GRO-alpha in cultured nasal epithelial cells. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 23(2):113-123.
- Rudramurthy GR & Swamy MK (2018) Potential applications of engineered nanoparticles in medicine and biology: an update. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* 23(8):1185-1204.
- Russo RC, Garcia CC, Teixeira MM & Amaral FA (2014) The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. *Expert review of clinical immunology* 10(5):593-619.
- Sabroe I, Jones EC, Usher LR, Whyte MK & Dower SK (2002) Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 168(9):4701-4710.
- Sadauskas, E., Jacobsen, N. R., Danscher, G., Stoltenberg, M., Vogel, U., Larsen, A., Kreyling, W., & Wallin, H. (2009a). Biodistribution of gold nanoparticles in mouse lung following intratracheal instillation. *Chemistry Central journal*, 3, 16. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-3-16>
- Sadauskas E, Danscher G, Stoltenberg M, Vogel U, Larsen A, Wallin H. (2009b) Protracted elimination of gold nanoparticles from mouse liver. *Nanomedicine*. Jun;5(2):162-9. doi: 10.1016/j.nano.2008.11.002. Epub 2009 Feb 12. PMID: 19217434.
- Santé-Canada (2011) Énoncé de politique sur la définition ad hoc de Santé Canada s'appliquant aux nanomatériaux.
- Santé-Canada (2016) Rapport: Nanoparticules fabriquées – aspects liés à la santé et à la sécurité <https://www.canada.ca/fr/emploi-developpement-social/services/sante-securite/rapports/nanoparticules-fabriquees.html> (en ligne)
- 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.

- Sanyakamdhorn S, Agudelo D & Tajmir-Riahi HA (2017) Review on the targeted conjugation of anticancer drugs doxorubicin and tamoxifen with synthetic polymers for drug delivery. *Journal of biomolecular structure & dynamics* 35(11):2497-2508.
- Sapsford KE, Algar WR, Berti L, Gemmill KB, Casey BJ, Oh E, Stewart MH & Medintz IL (2013) Functionalizing nanoparticles with biological molecules: developing chemistries that facilitate nanotechnology. *Chemical reviews* 113(3):1904-2074.
- Saribas Z, Ergun H, Mamuk S, Köseoglu-Eser O & Melli M (2012) Critical appraisal of air pouch infection model in rats. *Annals of clinical and laboratory science* 42(1):50-56.
- Sadauskas E, Wallin H, Stoltenberg M, Vogel U, Doering P, Larsen A, Danscher G.(2007) Kupffer cells are central in the removal of nanoparticles from the organism. Part Fibre Toxicol. Oct 19;4:10. doi: 10.1186/1743-8977-4-10.
- Savill J (1997) Apoptosis in resolution of inflammation. *Journal of leukocyte biology* 61(4):375-380.
- Savill J, Fadok V, Henson P & Haslett C (1993) Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunology today* 14(3):131-136.
- Savill JS, Wyllie AH, Henson JE, Walport MJ, Henson PM & Haslett C (1989) Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *The Journal of clinical investigation* 83(3):865-875.
- Savoie A, Lavastre V, Pelletier M, Hajto T, Hostanska K & Girard D (2000) Activation of human neutrophils by the plant lectin *Viscum album* agglutinin-I: modulation of de novo protein synthesis and evidence that caspases are involved in induction of apoptosis. *Journal of leukocyte biology* 68(6):845-853.
- Sayes CM & Warheit DB (2009) Characterization of nanomaterials for toxicity assessment. *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology* 1(6):660-670.
- Schaeublin NM, Braydich-Stolle LK, Schrand AM, Miller JM, Hutchison J, Schlager JJ & Hussain SM (2011) Surface charge of gold nanoparticles mediates mechanism of toxicity. *Nanoscale* 3(2):410-420.
- Schaming D (2018) Utilisation des nanoparticules d'or en catalyse. *Annales des Mines-Realites industrielles*. FFE, p 45-48.
- Schett G, Elewaut D, McInnes IB, Dayer JM & Neurath MF (2013) How cytokine networks fuel inflammation: Toward a cytokine-based disease taxonomy. *Nature medicine* 19(7):822-824.
- Scholl JA, Koh AL & Dionne JA (2012) Quantum plasmon resonances of individual metallic nanoparticles. *Nature* 483(7390):421-427.
- Schönbeck U, Mach F & Libby P (1998) Generation of Biologically Active IL-1 β by Matrix Metalloproteinases: A Novel Caspase-1-Independent Pathway of IL-1 β Processing. *The Journal of Immunology* 161(7):3340-3346.
- Schroder K & Tschopp J (2010) The Inflammasomes. *Cell* 140:821-832.
- 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.
- Segal AW (2005) How neutrophils kill microbes. *Annual review of immunology* 23:197-223.

- Segal AW, Dorling J & Coade S (1980) Kinetics of fusion of the cytoplasmic granules with phagocytic vacuoles in human polymorphonuclear leukocytes. *Biochemical and morphological studies. The Journal of cell biology* 85(1):42-59.
- Selders GS, Fetz AE, Radic MZ & Bowlin GL (2017) An overview of the role of neutrophils in innate immunity, inflammation and host-biomaterial integration. *Regenerative biomaterials* 4(1):55-68.
- Selye H (1953) Induction of topical resistance to acute tissue injury; an experimental study with the granuloma pouch technique. *The Surgical clinics of North America* 10.1016/s0039-6109(16)34043-9:1417-1446.
- Selye H (1957) Effect of inflammation upon the growth of transplantable neoplasms as demonstrated by the double granuloma-pouch technique. *British journal of cancer* 11(4):550-553.
- Semerad CL, Christopher MJ, Liu F, Short B, Simmons PJ, Winkler I, Levesque JP, Chappel J, Ross FP & Link DC (2005) G-CSF potently inhibits osteoblast activity and CXCL12 mRNA expression in the bone marrow. *Blood* 106(9):3020-3027.
- Sen T, Mandal S, Haldar S, Chattopadhyay K & Patra A (2011) Interaction of Gold Nanoparticle with Human Serum Albumin (HSA) Protein Using Surface Energy Transfer. *The Journal of Physical Chemistry C* 115(49):24037-24044.
- Sengeløv H, Kjeldsen L, Kroeze W, Berger M & Borregaard N (1994) Secretory vesicles are the intracellular reservoir of complement receptor 1 in human neutrophils. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 153(2):804-810.
- Serhan CN (2008) Systems approach with inflammatory exudates uncovers novel anti-inflammatory and pro-resolving mediators. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 79(3-5):157-163.
- Serhan CN (2014) Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature* 510(7503):92-101.
- Serhan CN, Brain SD, Buckley CD, Gilroy DW, Haslett C, O'Neill LA, Perretti M, Rossi AG & Wallace JL (2007) Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21(2):325-332.
- Serhan CN, Ward PA & Gilroy DW (2010) *Fundamentals of Inflammation*. Cambridge University Press. <https://books.google.ca/books?id=cJq1RMPKEYkC>
- Shahbazia B, Khodabandehloo M, Rezaei MJ, Rouhia S, Ramazanzadeh R & Basirie MR (2015) In vivo and in vitro cytotoxicity and mutagenicity considerations of poly (amido amine) dendrimer. *Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences* 4(1):101-110.
- Shaw SK, Bamba PS, Perkins BN & Luscinskas FW (2001) Real-time imaging of vascular endothelial-cadherin during leukocyte transmigration across endothelium. *J Immunol* 167(4):2323-2330.
- Shcharbin D, Janicka M, Wasiak M, Palecz B, Przybyszewska M, Zaborski M & Bryszewska M (2007) Serum albumins have five sites for binding of cationic dendrimers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1774(7):946-951.
- Sheshachalam A, Srivastava N, Mitchell T, Lacy P & Eitzen G (2014) Granule protein processing and regulated secretion in neutrophils. *Frontiers in immunology* 5:448.

- Shi X, Thomas TP, Myc LA, Kotlyar A & Baker Jr JR (2007) Synthesis, characterization, and intracellular uptake of carboxyl-terminated poly (amidoamine) dendrimer-stabilized iron oxide nanoparticles. *Physical Chemistry Chemical Physics* 9(42):5712-5720.
- Siegel J, Kaimlová M, Vyhnálková B, Trelin A, Lyutakov O, Slepíčka P, Švorčík V, Veselý M, Vokatá B, Malinský P, Šlouf M, Hasal P & Hubáček T (2020) Optomechanical Processing of Silver Colloids: New Generation of Nanoparticle-Polymer Composites with Bactericidal Effect. *International journal of molecular sciences* 22(1).
- Silva MT (2011) Macrophage phagocytosis of neutrophils at inflammatory/infectious foci: a cooperative mechanism in the control of infection and infectious inflammation. *Journal of leukocyte biology* 89(5):675-683.
- Silvestre-Roig C, Hidalgo A & Soehnlein O (2016) Neutrophil heterogeneity: implications for homeostasis and pathogenesis. *Blood* 127(18):2173-2181.
- Singh R & Nalwa HS (2011) Medical applications of nanoparticles in biological imaging, cell labeling, antimicrobial agents, and anticancer nanodrugs. *Journal of biomedical nanotechnology* 7(4):489-503.
- Singh RP & Ramarao P (2012) Cellular uptake, intracellular trafficking and cytotoxicity of silver nanoparticles. *Toxicology letters* 213(2):249-259.
- Smulders S, Kaiser J-P, 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(1):41.
- Sohal IS, O'Fallon KS, Gaines P, Demokritou P & Bello D (2018) Ingested engineered nanomaterials: state of science in nanotoxicity testing and future research needs. *Particle and fibre toxicology* 15(1):29.
- Sonavane G, Tomoda K, Sano A, Ohshima H, Terada H, Makino K. (2008) In vitro permeation of gold nanoparticles through rat skin and rat intestine: effect of particle size. *Colloids Surf B Biointerfaces*. Aug 1;65(1):1-10
- Srinageshwar B, Florendo M, Clark B, Johnson K, Munro N, Peruzzaro S, Antcliff A, Andrews M, Figacz A, Swanson D, Dunbar GL, Sharma A & Rossignol J (2020) A Mixed-Surface Polyamidoamine Dendrimer for In Vitro and In Vivo Delivery of Large Plasmids. *Pharmaceutics* 12(7).
- Srinageshwar B, Peruzzaro S, Andrews M, Johnson K, Hietpas A, Clark B, McGuire C, Petersen E, Kippe J, Stewart A, Lossia O, Al-Gharaibeh A, Antcliff A, Culver R, Swanson D, Dunbar G, Sharma A & Rossignol J (2017) PAMAM Dendrimers Cross the Blood-Brain Barrier When Administered through the Carotid Artery in C57BL/6J Mice. *International journal of molecular sciences* 18(3):628.
- Stamenkovic I (2003) Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *The Journal of pathology* 200(4):448-464.
- Stieger N, Liebenberg W, Aucamp M & De Villiers M (2012) Dendrimer-Based Drug Delivery Systems: From Theory to Practice. 10.1002/9781118275238.ch3. p 93-137.
- Stojiljković A, Kuehni-Boghenbor K, Gaschen V, Schüpbach G, Mevissen M, Kinnear C, Möller AM & Stoffel MH (2016) High-content analysis of factors affecting gold nanoparticle uptake by neuronal and microglial cells in culture. *Nanoscale* 8(37):16650-16661.
- Subramaniam J, Murugan K, Panneerselvam C, Kovendan K, Madhiyazhagan P, Dinesh D, Kumar PM, Chandramohan B, Suresh U & Rajaganesh R (2016) Multipurpose

- effectiveness of *Couroupita guianensis*-synthesized gold nanoparticles: high antiplasmodial potential, field efficacy against malaria vectors and synergy with *Aplocheilus lineatus* predators. *Environmental Science and Pollution Research* 23(8):7543-7558.
- Sudimack J & Lee RJ (2000) Targeted drug delivery via the folate receptor. *Advanced drug delivery reviews* 41(2):147-162.
- Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM & Chilvers ER (2010) Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends in immunology* 31(8):318-324.
- Sun Y, Guo F, Zou Z, Li C, Hong X, Zhao Y, Wang C, Wang H, Liu H & Yang P (2015) Cationic nanoparticles directly bind angiotensin-converting enzyme 2 and induce acute lung injury in mice. *Particle and fibre toxicology* 12(1):1-13.
- Swanson JA & Baer SC (1995) Phagocytosis by zippers and triggers. *Trends in cell biology* 5(3):89-93.
- Symons JA, Wong WL, Palladino MA & Duff GW (1992) Interleukin 8 in Rheumatoid and Osteoarthritis. *Scandinavian Journal of Rheumatology* 21(2):92-94.
- Taub D, Conlon K, Lloyd A, Oppenheim J & Kelvin D (1993) Preferential migration of activated CD4+ and CD8+ T cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta. *Science* 260(5106):355-358.
- Tecchio C, Micheletti A & Cassatella MA (2014) Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression. *Frontiers in immunology* 5:508.
- Thiagarajan G, Greish K & Ghandehari H (2013) Charge affects the oral toxicity of poly(amidoamine) dendrimers. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* 84(2):330-334.
- Thomas JM (1988) Colloidal metals: past, present and future. *Pure and Applied Chemistry* 60(10):1517-1528.
- Thomson AW & Lotze MT (2003) *The Cytokine Handbook*. Academic Press. <https://books.google.ca/books?id=NslT52NqvZ4C>
- Tomalia DA (2004) Birth of a new macromolecular architecture: dendrimers as quantized building blocks for nanoscale synthetic organic chemistry. *Aldrichimica Acta* 37(2):39-57.
- Tomalia DA (2016) Special Issue: "Functional Dendrimers". *Molecules (Basel, Switzerland)* 21(8).
- Tomalia DA, Baker H, Dewald J, Hall M, Kallos G, Martin S, Roeck J, Ryder J & Smith P (1985) A New Class of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules. *Polymer Journal* 17(1):117-132.
- Turner MD, Nedjai B, Hurst T & Pennington DJ (2014) Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1843(11):2563-2582.
- Uram L, Szuster M, Gargasz K, Filipowicz A, Walajtys-Rode E & Wolowiec S (2013) In vitro cytotoxicity of the ternary PAMAM G3-pyridoxal-biotin bioconjugate. *Int J Nanomedicine* 8:4707-4720.
- Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W, Brinkmann V, Jungblut PR & Zychlinsky A (2009) Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic

- protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS pathogens* 5(10):e1000639.
- Vajja BN, Juluri S, Kumari M, Kole L, Chakrabarti R & Joshi VD (2004) Lipopolysaccharide-induced paw edema model for detection of cytokine modulating anti-inflammatory agents. *International immunopharmacology* 4(7):901-909.
- Vallhov H, Qin J, Johansson SM, Ahlborg N, Muhammed MA, Scheynius A & Gabrielsson S (2006) The importance of an endotoxin-free environment during the production of nanoparticles used in medical applications. *Nano letters* 6(8):1682-1686.
- Van den Steen PE, Proost P, Wuyts A, Van Damme J & Opdenakker G (2000) Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO- α and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood* 96(8):2673-2681.
- Vandamme TF (2014) Use of rodents as models of human diseases. *Journal of pharmacy & bioallied sciences* 6(1):2-9.
- Vandooren J, Berghmans N, Dillen C, Van Aelst I, Ronsse I, Israel LL, Rosenberger I, Kreuter J, Lellouche J-P, Michaeli S, Locatelli E, Franchini MC, Aiertza MK, Sánchez-Abella L, Loinaz I, Edwards DR, Shenkman L & Opdenakker G (2013a) Intradermal air pouch leukocytosis as an in vivo test for nanoparticles. *International journal of nanomedicine* 8:4745-4756.
- Vandooren J, Van den Steen PE & Opdenakker G (2013b) Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): the next decade. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 48(3):222-272.
- Verdon R, Gillies SL, Brown DM, Henry T, Tran L, Tyler CR, Rossi AG, Stone V & Johnston HJ (2021) Neutrophil activation by nanomaterials in vitro: comparing strengths and limitations of primary human cells with those of an immortalized (HL-60) cell line. *Nanotoxicology* 15(1):1-20.
- Viswanath V & Santhakumar K (2017) Perspectives on dendritic architectures and their biological applications: From core to cell. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 173:61-83.
- von Andrian UH, Chambers JD, McEvoy LM, Bargatze RF, Arfors KE & Butcher EC (1991) Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte beta 2 integrins in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88(17):7538-7542.
- Walkey CD, Olsen JB, Guo H, Emili A & Chan WCW (2012) Nanoparticle Size and Surface Chemistry Determine Serum Protein Adsorption and Macrophage Uptake. *Journal of the American Chemical Society* 134(4):2139-2147.
- Wang G, Yan C, Gao S & Liu Y (2019) Surface chemistry of gold nanoparticles determines interactions with bovine serum albumin. *Materials Science and Engineering: C* 103:109856.
- Wang J (2018) Neutrophils in tissue injury and repair. *Cell and tissue research* 371(3):531-539.
- Wang J & Fan Y (2014) Lung injury induced by TiO₂ nanoparticles depends on their structural features: size, shape, crystal phases, and surface coating. *International journal of molecular sciences* 15(12):22258-22278.

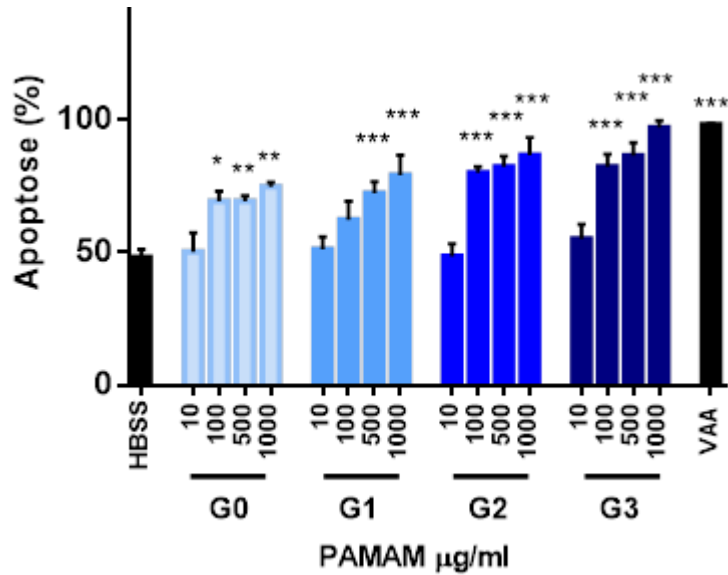
- Wang X, Qin W, Zhang Y, Zhang H & Sun B (2016) Endotoxin promotes neutrophil hierarchical chemotaxis via the p38-membrane receptor pathway. *Oncotarget* 7(45):74247-74258.
- Ward C, Dransfield I, Chilvers ER, Haslett C & Rossi AG (1999) Pharmacological manipulation of granulocyte apoptosis: potential therapeutic targets. *Trends in Pharmacological Sciences* 20(12):503-509.
- Weill B & Batteux F (2003) *Immunopathologie et réactions inflammatoires*. De Boeck Supérieur. <https://books.google.ca/books?id=W6PXmDcywP0C>
- Wheater PR, Young B, Heath JW & Validire P (2001) *Histologie fonctionnelle*. De Boeck. <https://books.google.ca/books?id=PmqpAwAAQBAJ>
- Wheeler MA, Smith SD, García-Cardena G, Nathan CF, Weiss RM & Sessa WC (1997) Bacterial infection induces nitric oxide synthase in human neutrophils. *The Journal of clinical investigation* 99(1):110-116.
- Whitesides GM (2006) The origins and the future of microfluidics. *Nature* 442(7101):368-373.
- Whyte MK, Meagher LC, MacDermot J & Haslett C (1993) Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 150(11):5124-5134.
- Winter CA, Risley EA & Nuss GW (1962) Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 111:544-547.
- Wisse E, De Zanger RB, Charels K, Van Der Smissen P & McCuskey RS (1985) The liver sieve: considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of Disse. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 5(4):683-692.
- Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P & Halbwachs-Mecarelli L (2000) Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 80(5):617-653.
- Wolf-Grosse S, Rokstad AM, Ali S, Lambris JD, Mollnes TE, Nilsen AM & Stenvik J (2017) Iron oxide nanoparticles induce cytokine secretion in a complement-dependent manner in a human whole blood model. *International journal of nanomedicine* 12:3927-3940.
- Wong J, Johnston B, Lee SS, Bullard DC, Smith CW, Beaudet AL & Kubes P (1997) A minimal role for selectins in the recruitment of leukocytes into the inflamed liver microvasculature. *The Journal of clinical investigation* 99(11):2782-2790.
- Wu H-Y, Chung M-C, Wang C-C, Huang C-H, Liang H-J & Jan T-R (2013) Iron oxide nanoparticles suppress the production of IL-1beta via the secretory lysosomal pathway in murine microglial cells. *Particle and fibre toxicology* 10(1):46.
- Wu L-p, Ficker M, Christensen JB, Trohopoulos PN & Moghimi SM (2015) Dendrimers in Medicine: Therapeutic Concepts and Pharmaceutical Challenges. *Bioconjugate Chemistry* 26(7):1198-1211.
- Yabluchanskiy A, Ma Y, Iyer RP, Hall ME & Lindsey ML (2013) Matrix metalloproteinase-9: Many shades of function in cardiovascular disease. *Physiology (Bethesda, Md.)* 28(6):391-403.
- Yamamoto A, Taniuchi S, Tsuji S, Hasui M & Kobayashi Y (2002) Role of reactive oxygen species in neutrophil apoptosis following ingestion of heat-killed *Staphylococcus aureus*. *Clinical and experimental immunology* 129(3):479-484.

- Yamashita K, Takahashi A, Kobayashi S, Hirata H, Mesner PW, Jr., Kaufmann SH, Yonehara S, Yamamoto K, Uchiyama T & Sasada M (1999) Caspases mediate tumor necrosis factor- α -induced neutrophil apoptosis and downregulation of reactive oxygen production. *Blood* 93(2):674-685.
- Yan C, Gu J, Lv Y, Shi W & Jing H (2017) Improved intestinal absorption of water-soluble drugs by acetylation of G2 PAMAM dendrimer nanocomplexes in rat. *Drug Delivery and Translational Research* 7(3):408-415.
- Yen HJ, Hsu SH & Tsai CL (2009) Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 5(13):1553-1561.
- Yipp BG & Kubes P (2013) Antibodies against neutrophil LY6G do not inhibit leukocyte recruitment in mice in vivo. *Blood* 121(1):241-242.
- Yokomizo T, Izumi T, Chang K, Takuwa Y & Shimizu T (1997) A G-protein-coupled receptor for leukotriene B₄ that mediates chemotaxis. *Nature* 387(6633):620-624.
- Yu J, Zhang X, Hao X, Zhang X, Zhou M, Lee CS & Chen X (2014) Near-infrared fluorescence imaging using organic dye nanoparticles. *Biomaterials* 35(10):3356-3364.
- Zarbock A & Ley K (2009) Neutrophil adhesion and activation under flow. *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)* 16(1):31-42.
- Zarbock A, Ley K, McEver RP & Hidalgo A (2011) Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. *Blood* 118(26):6743-6751.
- Zawrotniak M & Rapala-Kozik M (2013) Neutrophil extracellular traps (NETs) - formation and implications. *Acta biochimica Polonica* 60(3):277-284.
- Zeyons O (2008) *Physico-chemical and biological interactions between manufactured nanoparticles and environmental bacteria*. (Université Pierre et Marie Curie - Paris VI). <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00331931> (Consulté le 2008-09-25)
- Zhang B, Hirahashi J, Cullere X & Mayadas TN (2003) Elucidation of molecular events leading to neutrophil apoptosis following phagocytosis: cross-talk between caspase 8, reactive oxygen species, and MAPK/ERK activation. *The Journal of biological chemistry* 278(31):28443-28454.
- Zhang C & Tomalia DA (2001) Gel Electrophoretic Characterization of Dendritic Polymers. *Dendrimers and Other Dendritic Polymers*, <https://doi.org/10.1002/0470845821.ch10>. p 237-253.
- Zhang LW & Monteiro-Riviere NA (2009) Mechanisms of Quantum Dot Nanoparticle Cellular Uptake. *Toxicological Sciences* 110(1):138-155.
- Zhang X-D, Wu H-Y, Di Wu Y-YW, Chang J-H, Zhai Z-B, Meng A-M, Liu P-X, Zhang L-A & Fan F-Y (2010) Toxicologic effects of gold nanoparticles in vivo by different administration routes. *International journal of nanomedicine* 5:771.
- Zhang XS, Wang KY, Gao JQ, Li RJ, Guan QB & Song L (2018) Study on the expression of p53 and MMP-2 in patients with lung cancer after interventional therapy. *Oncology letters* 16(4):4291-4296.
- Zhang Y & Chen Q (2017) Relationship between matrix metalloproteinases and the occurrence and development of ovarian cancer. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas* 50(6):e6104.

- Zheng L, Sjölander A, Eckerdal J & Andersson T (1996) Antibody-induced engagement of beta 2 integrins on adherent human neutrophils triggers activation of p21ras through tyrosine phosphorylation of the protooncogene product Vav. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93(16):8431-8436.
- Zhu L & Lin M (2020) The Synthesis of Nano-Doxorubicin and its Anticancer Effect. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* 10.2174/1871520621666201229115612.
- Zhu Y, Yao S & Chen L (2011) Cell Surface Signaling Molecules in the Control of Immune Responses: A Tide Model. *Immunity* 34(4):466-478.

ANNEXE I

A) Apoptose – cytologie



B) Apoptose – FACs

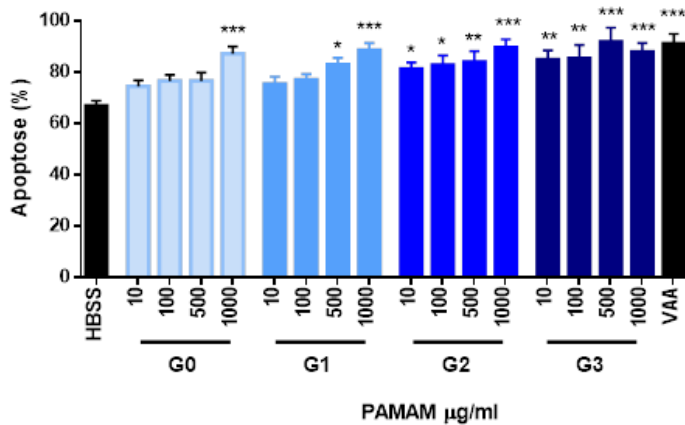


Figure A1: Effet des dendrimères PAMAM sur l'apoptose des neutrophils humains

Les neutrophiles ($10^6/ml$) ont été incubés en présence des dendrimères PAMAM G0-G3, VAA ($1\mu g/ml$) ou un volume équivalent de HBSS pour 24h. Les pourcentages d'apoptose des neutrophiles ont été mesurés par cytologie, à partir d'une cytocentrifugation des cellules sur une lame de microscope coloré par Hema 3 kit et observé au microscope optique (A). L'apoptose a également été mesurée en cytométrie en flux à la suite des stimulations de 24h et à un marquage à l'Annexin-V (B). $n \geq 5$

Caspase 3

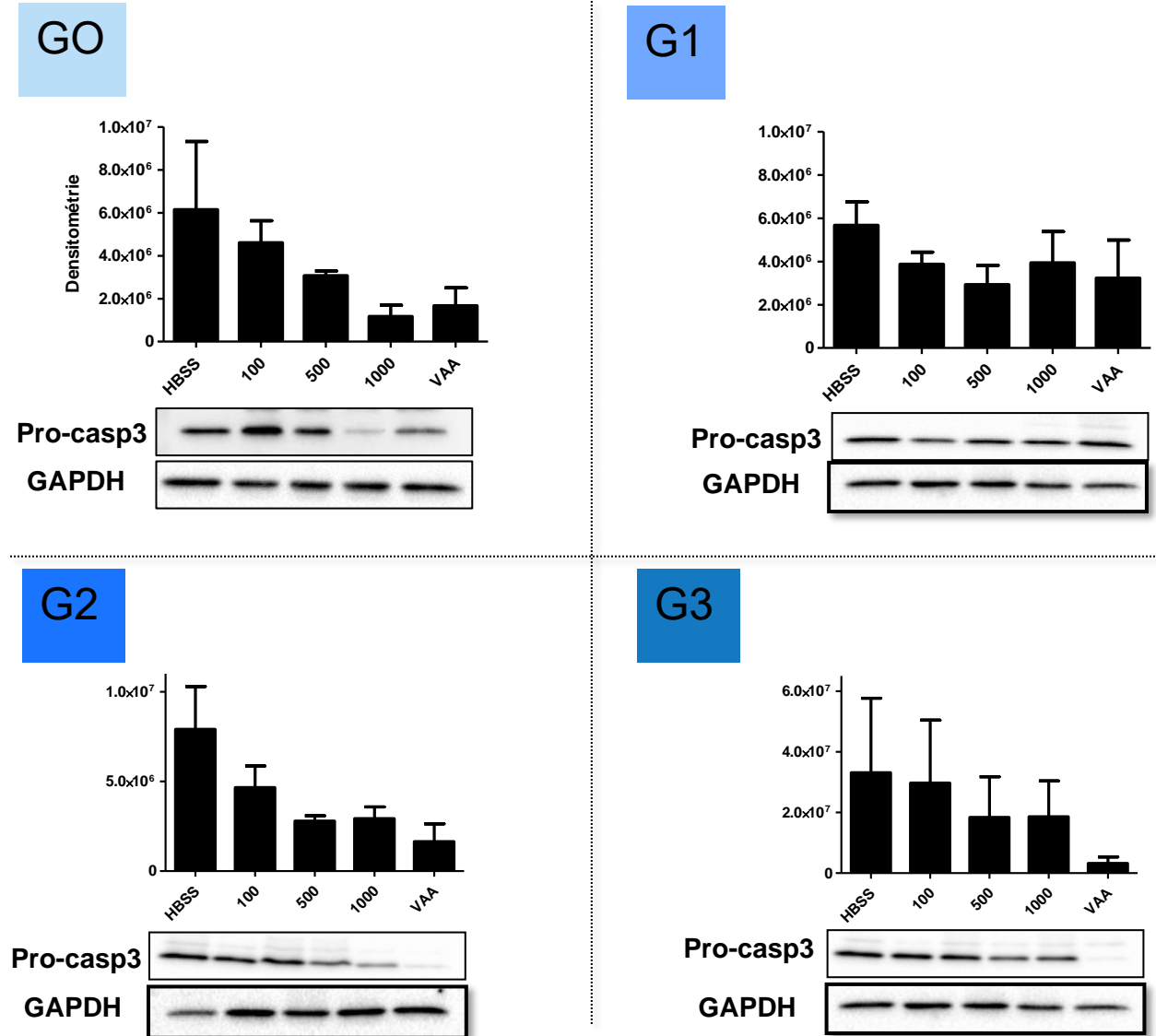
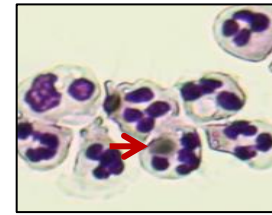
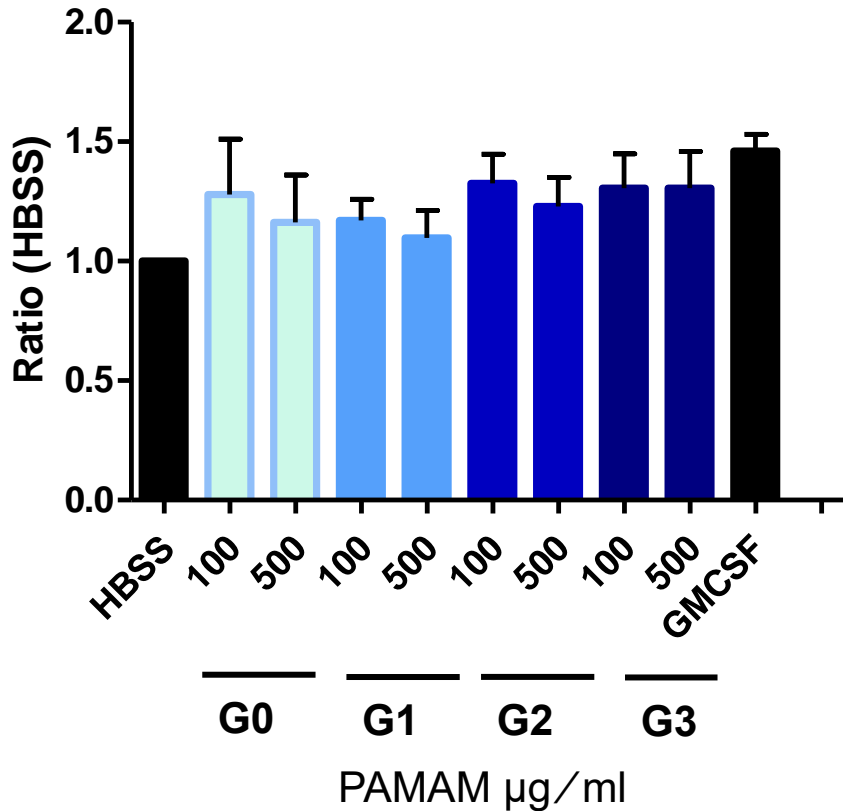


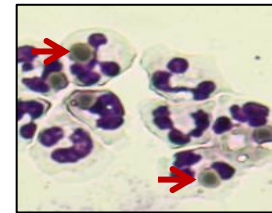
Figure A2: Rôle des dendrimères PAMAM (G0-G3) sur l'activation de la caspase 3 dans le neutrophile

Les neutrophiles ($10^6/ml$) ont été incubés en présence des dendrimères PAMAM G0-G3, VAA ($1\mu g/ml$), ou un volume équivalent de HBSS. A) Exemples représentatifs montrant le clivage de la pro-caspase 3 mesurée par immunobuvardage de type western à la suite des stimulations de 24h $n \geq 3$

Phagocytose de globules rouges opsonisés



HBSS



G3-100 µg/ml

Figure A3: Phagocytose de globules rouges opsonisés.

Les cellules ont été stimulées avec des concentrations de 100 et 500 µg/ml, au GM-CSF (65ng/ml) ou HBSS pendant 30 min. Les cellules ont ensuite été incubées avec des globules rouges de moutons opsonisés dans un ratio de 1:5 pour 1 heure à 37°C. Les pourcentages de phagocytose des neutrophiles ont été mesurés par cytologie, à partir d'une cyto-centrifugation des cellules sur une lame de microscope coloré avec un kit commercial Hema 3 et observé au microscope optique. a. Exemples représentatifs des lames de microscopes. b. Pourcentages de phagocytose en cytologie à la suite d'une coloration. ($n \geq 3$)

Zymographie- Activité gélatinases

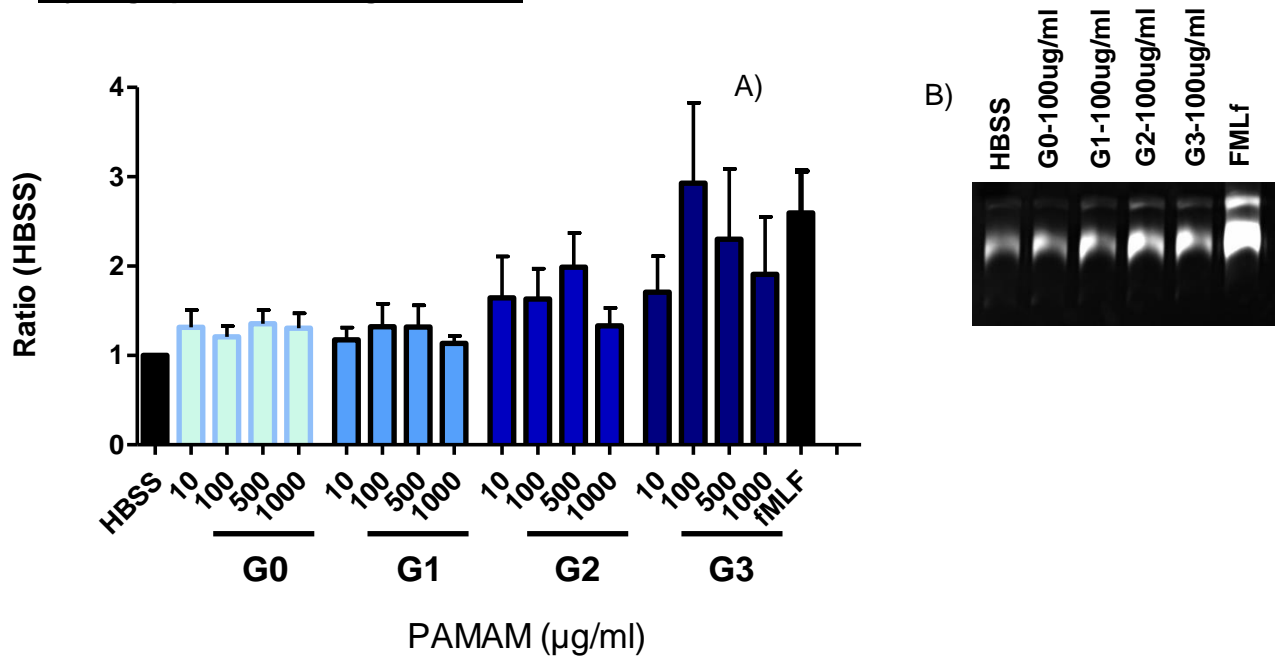


Figure A4: Activité gélatinase des exsudats des neutrophiles humains après une stimulation aux PAMAM.

La présence et l'activité des gélatinases ont été mesurés par zymographie. Les neutrophiles (10×10^6) ont été stimulés avec les PAMAM (10, 100, 500 ou $1000 \mu\text{g/ml}$), FMLf ou HBSS pendant 1 heure. Les surnageants ont subi une électrophorèse en conditions non réductrices sur gel SDS-PAGE avec 0,2% de gélatine pour évaluer la présence et l'activité gélatinasiq. a) photographie d'un gel de zymographie. b) Analyses densitométriques des gels de zymographie. ($n \geq 3$)

Production de cytokines

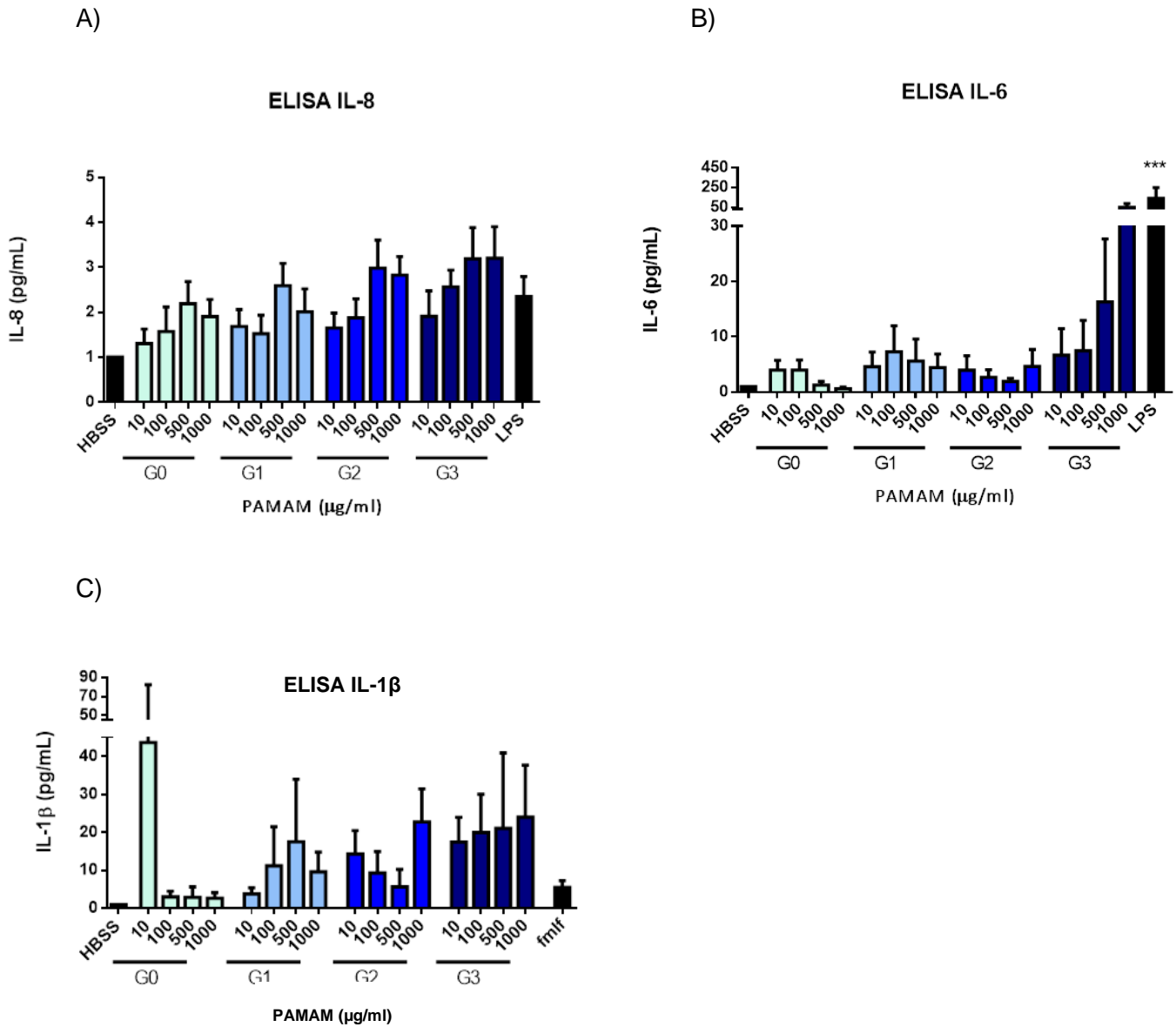
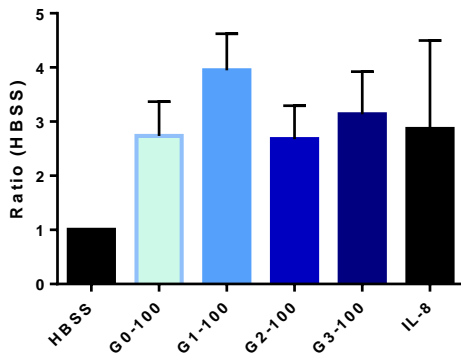


Figure A5: Production de cytokines/chimiokines après exposition aux nanoparticules.

Les neutrophiles ont été mis en contact avec les nanoparticules PAMAM (10,100, 500 ou 1000 μ g/ml), LPS, FMLf ou HBSS pendant 21 heures. **a)** Résultat des ELISA Arrays IL-8 **b)** Résultat des ELISA Arrays IL-6 **c)** Résultat des ELISA Arrays IL-1 β . (n \geq 3).

Migration des neutrophiles

A)



B)

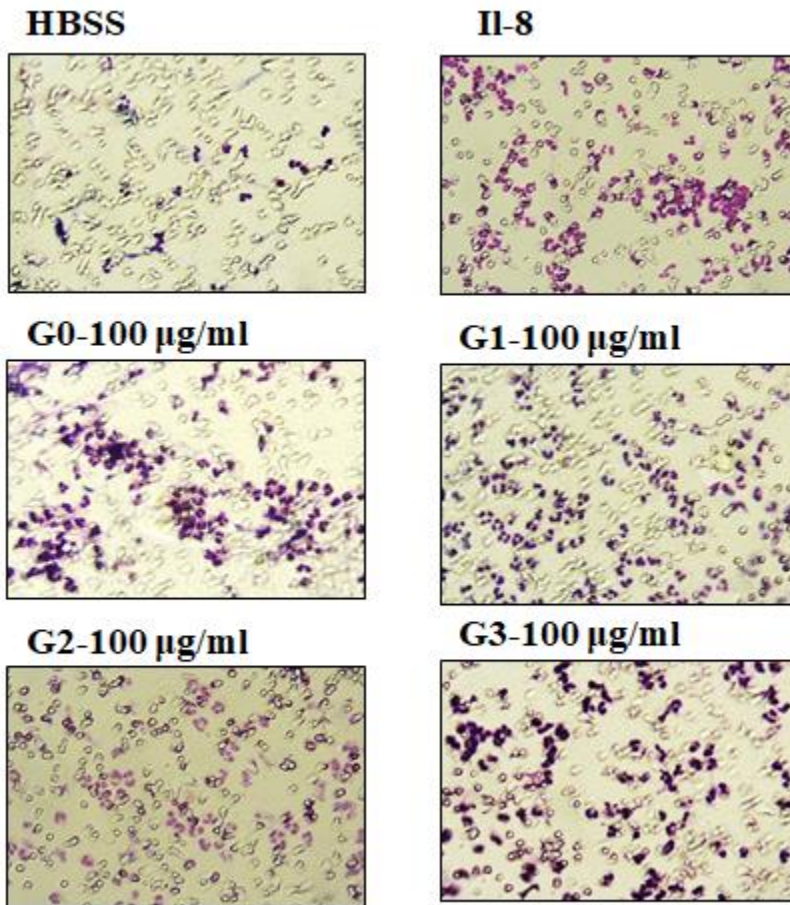


Figure A6 : Les PAMAM induisent la migration des neutrophiles humains.

Les neutrophiles humains fraîchement isolés ont été incubés avec 25 nM d'IL-8, 100 µg/ml de PAMAM (G0 à G3) (60 min). La chimiotaxie a été évaluée avec des chambres de Boyden. A) Représentation graphique illustrée en ratios. B) Images représentatives de la migration sur la membrane. (n = 3)

Migration des neutrophiles *in vivo*

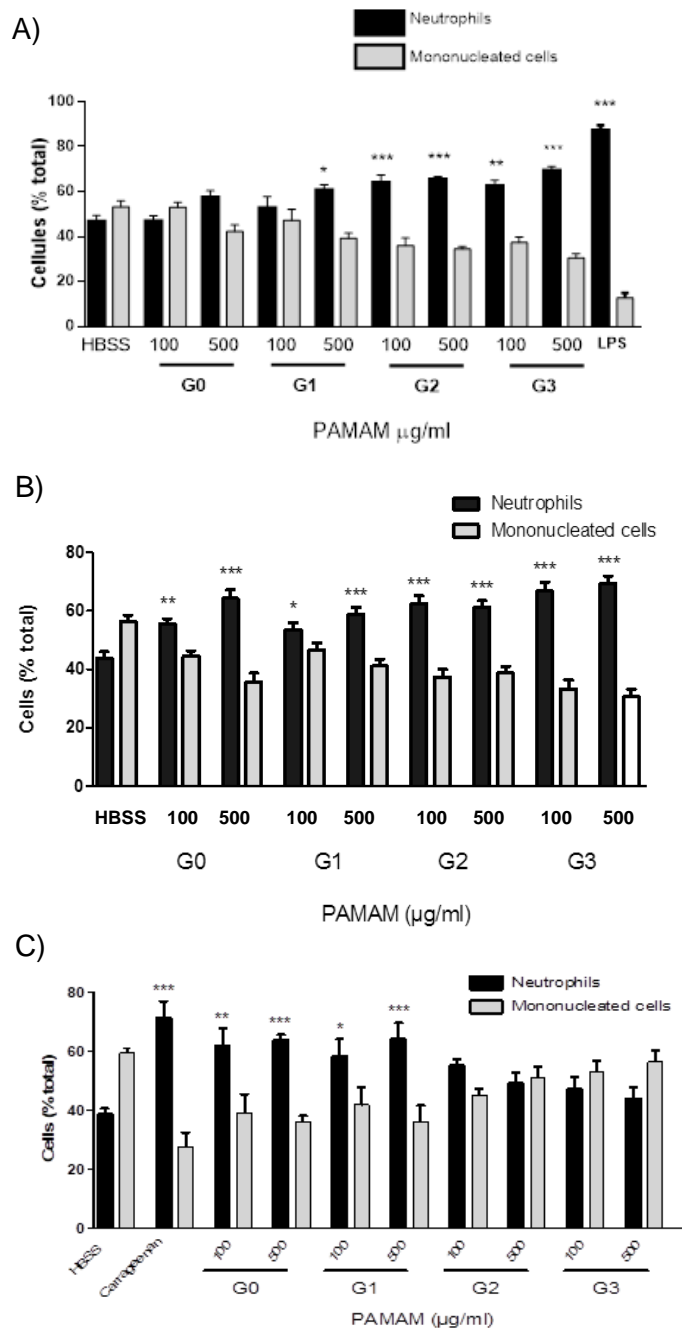


Figure A7 : Effet de l'administration des PAMAM dans le modèle de poche d'air murine après 3h; 6h et 24h.

Les PAMAM ont été administrées dans des poches d'air murines et les exsudats ont été récoltés après a) 3h; b) 6h et c) 24h. Les proportions de neutrophiles versus les autres cellules mononuclées ont été comptées.

