

Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

Évaluation des risques des travailleurs exposés aux nanoparticules (NP): Les NP affectent-elles la biologie des neutrophiles de la même façon en fonction du sexe?

Par

Pierrette Kwemo

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en Sciences expérimentale de la santé

Jury d'évaluation

Président du jury et examineur interne	Jacques Bernier INRS- AFSB
Examineur externe	Caroline Gilbert CRCHUL
Directeur de recherche	Denis Girard INRS- AFSB

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier le Pr Denis Girard de m'avoir accordé la chance de travailler dans son laboratoire, tout d'abord en tant qu'étudiante stagiaire de premier cycle et par la suite comme étudiante à la maîtrise. En effet, c'est grâce à lui que j'ai été motivé à entreprendre ce parcours en Sciences expérimentales de la Santé.

J'aimerais également remercier mes collègues de travail, principalement Pascal Chhay et Isabelle Durocher pour leur aide et leur support au cours de ma formation. Merci aussi à Mr Michel Courcelles, bibliothécaire au centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, pour son soutien dans mes recherches bibliographiques.

Ce projet n'aurait certainement pas été possible sans la contribution de tous nos donateurs et j'aimerais m'arrêter pour dire merci à tous les étudiants, stagiaires, professeurs et autres employés du centre Armand-Frappier qui ont accepté de donner généreusement de leur sang.

J'estime également le support financier de l'Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en Sécurité du travail (IRSST) ainsi que celui de la Fondation Armand-Frappier pour le financement de mon projet de maîtrise.

Finalement, j'aimerais remercier ma famille et mon époux pour m'avoir grandement soutenu, de même que l'Institut national de la recherche scientifique.

RÉSUMÉ

La nanoscience et la nanotechnologie sont la révolution technologique et scientifique actuelle, et tout semble indiquer que de plus en plus de travailleurs seront exposés aux nanoparticules (NP). Ainsi, les études portant sur leurs effets potentiellement toxiques sur la santé ont pris de l'ampleur et plusieurs données scientifiques montrent leurs propriétés inflammatoires aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*.

Toutefois, ces études publiées ne prennent pas nécessairement en compte le sexe des animaux et individus avec lesquels les tests ont été effectués. Le but de ce projet est donc de combler cette lacune en déterminant si certaines NP peuvent modifier *in vitro* la biologie des neutrophiles de la même manière ou non selon le sexe des donneurs.

Pour cela nous avons fait une étude comparative entre les sexes sur l'effet des NP pour différentes fonctions du neutrophile. Nos résultats montrent un taux apoptotique significativement plus bas chez les femmes et une variabilité selon le sexe pour la libération cytokinique, le chimiotactisme et l'adhésion cellulaire.

Cela suggère que les NP pourraient agir différemment au niveau de l'inflammation en fonction du sexe chez l'humain, et permet donc de mieux définir les paramètres à prendre en considération lors des procédures d'évaluation du risque.

Mots clés : Nanotechnologie; nanoparticules; neutrophiles; sexe; travailleurs; santé; évaluation du risque.

ABSTRACT AND KEYWORDS

Nanoscience and nanotechnology are the current technological and scientific revolution, and everything seems to indicate that more and more workers will be exposed to nanoparticles (NP). Thus, studies on their potentially toxic effects on health have gained momentum and several scientific data show their inflammatory properties both *in vivo* and *in vitro*.

However, these published studies do not necessarily consider the sex of the animals and individuals with whom the tests were carried out. The aim of this project is therefore to fill this gap by determining whether certain NPs can modify the biology of neutrophils *in vitro* in the same way or not depending on the sex of the donors.

For this we did a gender-based study on the effect of NPs for different functions of the neutrophil. Our results show a significantly lower apoptotic rate in women and gender variability for cytokine release, chemotaxis, and cell adhesion.

This suggests that NPs may act differently on inflammation depending on gender in humans, and therefore helps to better define the parameters to be considered during risk assessment procedures.

Key words: Nanotechnology; nanoparticles; neutrophils; sex; workers; health; risk assessment.

TABLE DES MATIÈRES

	Page
Remerciements.	iii
Résumé.	v
Abstract et keywords.vii
Liste des figures.xi
Liste des tableaux.	xii
Liste des abréviations.	xiii
Chapitre 1 : INTRODUCTION	1
1.1. OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES	3
Chapitre 2 : REVUE DE LA LITTÉRATURE.	4
2.1. LA NANOTECHNOLOGIE.	4
2.1.1. Définitions et applications.4
2.1.2. Au Québec en particulier.6
2.2. RISQUES ASSOCIÉS AUX NANOPARTICULES.	7
2.2.1. Définition générale.7
2.2.2. Effets néfastes sur la santé.8
2.2.3. Effets pro-inflammatoires.10
2.2.4. Impact sur le neutrophile.11
2.3. ÉVALUATION DU RISQUE CHEZ LES TRAVAILLEURS.12
2.3.1. Facteurs de risques.13
2.3.2. Limites et inconvénients.14
2.4. LES NANOPARTICULES ET LE DIMORPHISME SEXUEL.16
2.4.1. Chez les animaux.16
2.4.2. Chez l'humain.17

Chapitre 3 : MATÉRIELS ET MÉTHODES.	19
3.1. CHOIX ET CARACTÉRISATION DES NANOPARTICULES.	19
3.2. SELECTION DES DONNEURS.	21
3.3. ISOLEMENT DES NEUTROPHILES.	21
3.4. ÉVALUATION DE L' APOPTOSE PAR CYTOLOGIE	21
3.5. QUANTIFICATION DE LA LIBÉRATION DES CYTOKINES	22
3.6. ÉTUDE DE LA MIGRATION CELLULAIRE.	22
3.7. ÉTUDE DE L'ADHÉSION CELLULAIRE AVEC LA LIGNÉE EA.HY296.	23
3.8. QUANTIFICATION DES ROS LIBÉRÉS.	23
3.9. ANALYSES STATISTIQUES.	24
Chapitre 4 : RÉSULTATS ET DISCUSSION.	25
4.1. LES NANOPARTICULES RETARDENT L' APOPTOSE.	25
4.1.1. Effet prédominant chez les femmes.	25
4.1.2. Retard apoptotique indépendant de la libération des ROS.	27
4.2. QUANTIFICATION DES CYTOKINES:	30
LA RÉPONSE INFLAMMATOIRE SERAIT PLUS ÉLEVÉE CHEZ LES FEMMES	
4.3. MIGRATION ET ADHÉSION DU NEUTROPHILE AU FOYER INFLAMMATOIRE.	32
4.3.1. Les NP induisent la migration des neutrophiles de façon variable selon le sexe.	32
4.3.2. Les NP induisent l'adhésion des neutrophiles de façon variable selon le sexe.	34
4.4. DES BIAIS SEXUELS PEUVENT INTERVENIR DANS LA RÉPONSE INFLAMMATOIRE.	36
DES NEUTROPHILES CHEZ L' HUMAIN	
4.4.1. Rôles des hormones sexuelles sur l'activité neutrophilique.	37
4.4.2. L'exemple de certains virus respiratoires.	38
Chapitre 5 : CONCLUSION	41
Listes des Références.	44

LISTE DES FIGURES

<i>Figure 2.1</i>	Secteurs d'activités innovateurs de la nanotechnologie dans le monde.	5
<i>Figure 2.2</i>	Risques associés aux NM en milieu de travail	7
<i>Figure 2.3</i>	Effets potentiels des particules ultrafines inhalées et principales voies d'absorption des NP. 8	
<i>Figure 2.4</i>	Principales étapes d'une réponse inflammatoire aigue.	11
<i>Figure 2.5</i>	Facteurs contribuant aux effets potentiels des nanomatériaux sur la santé des travailleurs. 14	
<i>Figure 3.1</i>	Étude de la réaction inflammatoire en réponse aux neutrophiles.	24
<i>Figure 4.1</i>	Différence entre des neutrophiles vivants et des neutrophiles en apoptose au microscope optique	25
<i>Figure 4.2</i>	Effet anti-apoptotique des NP et variabilité en fonction du sexe chez l'humain.	27
<i>Figure 4.3</i>	Effets des NP sur la production des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS).	29
<i>Figure 4.4</i>	Effet variable des NP sur la production des cytokines et en fonction du sexe chez l'humain. 31	
<i>Figure 4.5</i>	Attraction des neutrophiles par certaines NP en fonction du sexe chez l'humain	33
<i>Figure 4.6</i>	Photos de neutrophiles marqués à la calcéine-AM et visibles au microscope à fluorescence	34
<i>Figure 4.7</i>	Certaines NP augmentent l'adhésion des neutrophiles de façon variable et selon le sexe des donneurs	35

LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau 2.1</i>	Méthodes d'élaboration des structures nanométriques	4
<i>Tableau 3.1</i>	Caractérisation des NP par diffusion dynamique de la lumière.	20
<i>Tableau 4.1</i>	Effet des NP sur différentes fonctions du neutrophile en fonction du sexe des donneurs. .	36

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Al₂O₃ : Oxyde d'aluminium

AR : Récepteur des androgènes

Au : Or

CeO₂ : Oxyde de cérium

CNSST : Commission des normes, de l'équité, de la santé et de la sécurité du travail

ECM : Extracellular matrix

ER : Récepteurs des estrogènes

ERK : Extracellular signal-regulated kinases

Gm-CSF : Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

GR : Globules rouges

HBSS : Hank's balanced salt solution

IL : Interleukine

INF-γ : Interféron gamma

LDH : Lactate déshydrogénase

LPS : Lipopolysaccharide

MAPK : Mitogen-activated protein kinase

NM : Nanomatériaux

NP : Nanoparticule

NT : Neutrophile

NTC : Nanotube de carbone

Pd : Palladium

PMN : Polymorphonucléaire

PPAR : Peroxisome proliferator-activated receptor

Pt : Platine

ROS : Reactive oxygen species

RPMI : Roswell Park memorial Institute medium

SST : Santé et sécurité au travail

TiO₂ : Oxyde de titanium

Tnf : Tumor necrosis factors

VAA-I : Viscum album agglutinin-I

ZnO : Oxyde de zinc

Chapitre 1

INTRODUCTION

L'exposition aux nanoparticules (NP) a particulièrement augmenté ces dernières années et cela est principalement relié au développement intense de l'industrie, de la recherche scientifique et du milieu universitaire qui multiplient le nombre de personnes à risque. En effet, plusieurs études de toxicité telles que répertoriées dans la littérature montrent les effets néfastes des NP sur la santé. Notamment, la cytotoxicité, le stress oxydatif, la génotoxicité et des inflammations ont déjà été rapportées dans des modèles *in-vitro* et *in-vivo* pour tester les NP d'argent (Braydich-Stolle et al. 2005; Oukarroum et al. , 2013), d'oxyde de titane (Hashem et al., 2020), de zinc (Prasad A. S., 2009) et les nanotubes de carbone (Shvedova et al., 2008).

Ces dernières années, on a pu observer une prise de conscience sur l'urgence de développer des connaissances relatives aux risques des NP de synthèse pour la santé et la sécurité en milieu de travail (SST) de même que pour l'environnement et la santé des populations en général (Ostiguy C. et al., 2010). Bien que les études *in-vivo* chez l'animal sont très courantes, les données humaines plus rares, proviennent en grande partie de notre laboratoire. Il existe encore plusieurs lacunes dans le domaine de la nanotoxicologie rendant difficile l'uniformité dans la caractérisation des NP (toxicité ou innocuité), dans la prise des décisions au niveau des législations et dans les mesures de prévention à adopter. L'une d'entre elle consiste à arriver à déterminer le paramètre qui relie le mieux l'exposition aux effets toxiques observés. En effet, pour la plupart des produits chimiques, on observe une bonne corrélation entre la dose d'exposition exprimée en masse de produit et les effets mesurés. Toutefois dans le cas des NP, de très nombreuses études ont permis de démontrer que la masse ne constitue pas une unité permettant d'obtenir une bonne corrélation avec les effets observés. Au contraire, les principales données disponibles suggèrent majoritairement qu'à masse égale, les NP sont plus toxiques que les microparticules pour un même produit (Ostiguy C. et al., 2010).

On ignore aussi à ce jour si l'effet des NP pourrait être influencé par la nature du sexe chez l'humain et aucune étude cytotoxique prenant en considération ce facteur n'a encore été faite jusqu'à maintenant. Cela est d'autant plus surprenant lorsqu'on sait que pour beaucoup de métiers aujourd'hui, certaines tâches demeurent encore plus axées vers l'un des sexes plutôt que l'autre; entre autres le domaine de la construction, la soudure et les cosmétiques. Ce projet visait donc à répondre à cette

question en étudiant l'impact que certaines NP métalliques (Platinum, palladium) et oxyde de métal (Titane, cérium, zinc) pourraient avoir sur la biologie des neutrophiles humains, marqueurs clés de l'inflammation. En effet, l'inflammation est largement reconnue et acceptée comme un risque majeur associé à l'utilisation des NP. Une étude comparative entre des donneurs hommes et femmes a été réalisée afin de mesurer la capacité de certaines NP à altérer différentes fonctions du neutrophile. Les fonctions étudiées ici sont essentiellement l'apoptose, la libération de cytokines, la migration ou chimiotactisme, l'adhésion cellulaire ainsi que la libération des ROS.

À partir des résultats obtenus, on a pu démontrer que quatre des NP testées étaient anti-apoptotiques soient le palladium (Pd), l'oxyde de cérium (CeO_2), de titane (TiO_2) et de zinc (ZnO). Cependant, cet effet était principalement observé du côté des femmes. Pour toutes les autres fonctions hormis le stress oxydatif pour lequel aucun effet n'a été observé, une nette variabilité entre les deux sexes a été relevée mais sans corrélation évidente avec l'effet toxique observé. Par ailleurs, la majeure partie des résultats de cette étude rentrait en contradiction avec ceux qui avaient déjà été publiés dans le passé par notre laboratoire.

Le retard apoptotique des neutrophiles plus important chez les femmes, pourrait probablement entraîner un risque plus élevé dans le développement de maladies professionnelles liées à l'inflammation. Par ailleurs, l'inflammation étant une réponse biologique normale du corps face à diverses formes d'agressions physiques ou internes, les différences notées à ce niveau entre les sexes peuvent également expliquer d'autres inégalités en matière de santé telles que le taux de mortalité, les risques d'affection ou de complications graves liés à l'effet des NP (asthme, affections oncologiques, hépatiques, rénales etc.). Ces travaux enclenchent une sonnette d'alarme auprès des organismes SST afin de prendre en considération le sexe dans leur procédure d'évaluation du risque, inclure aussi ce paramètre dans les études de toxicité liées aux nanomatériaux (NM).

1.1. OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES

L'hypothèse émise ici est celle selon laquelle certaines NP agiraient différemment chez les neutrophiles, cellules clefs de l'inflammation, en fonction du fait qu'elles proviennent de donneurs hommes ou femmes. Le principal objectif ici est de déterminer si certaines NP peuvent altérer la biologie de neutrophiles femmes et hommes de la même façon en étudiant certaines de leurs fonctions. Les objectifs spécifiques sont de déterminer les effets des NP sur l'apoptose, la production des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, IL-8 et TNF), la migration cellulaire ou chimiotactisme, l'adhésion cellulaire et enfin, la flambée oxydative.

De façon général, on veut montrer l'importance de la prise en compte du sexe dans les études de toxicité liées aux NP, ceci pour une meilleure évaluation du risque. On souhaite également proposer une démarche scientifique plus adaptée au contexte actuel afin d'améliorer les mesures de prévention au sein des entreprises et ainsi faire disparaître la disparité entre les sexes. Pour cela, il était important de changer l'approche expérimentale habituelle en prenant désormais en considération le sexe comme l'un des paramètres et augmenter considérablement le nombre de donneurs ($n \geq 10$ donneurs par sexe). Les résultats obtenus ont été comparés à ceux qui étaient déjà disponibles.

Chapitre 2

REVUE DE LA LITTÉRATURE

2.1. LA NANOTECHNOLOGIE

2.1.1. Définitions et applications

La nanotechnologie est un domaine en pleine expansion et elle se définit comme étant l'ensemble des technologies et matériaux utilisés pour la production, la manipulation ainsi que l'utilisation des nanoparticules. On entend par nanoparticules, des particules dont au moins une des trois dimensions est comprise entre 1-100nm, ce qui équivaut à la distance entre deux atomes ou à la taille d'un virus (Marziyeh A. et al., 2018). Elles peuvent être d'origine naturelle (poussière volcanique, particules virales etc.) ou produite de façon artificielle comme c'est le cas dans ces travaux. Pour leur production on utilise généralement diverses méthodes d'agglutination des atomes (bottom-up) ou de dégradation des matériaux (top-down) (voir Tableau 2.1).

Tableau 2.1 Méthodes d'élaboration des structures nanométriques (d'après la CNESST)

Approches	Exemples de procédé
Ascendante (« <i>bottom-up</i> »)	<ul style="list-style-type: none">• Autoassemblage• Érosion laser• Pyrolyse laser• Synthèse chimique
Descendante (« <i>top-down</i> »)	<ul style="list-style-type: none">• Broyage• Compactage• Frittage

L'utilisation des NP se fait dans des secteurs d'activités très diversifiés allant du domaine biomédical à l'électronique, passant par la métallurgie, l'agriculture, le textile, les revêtements et même les cosmétiques (Figure 2.1). Des produits tels que les textiles insalissables recouverts d'une pellicule de NP d'argent, les verres autonettoyants sur lesquels ont été déposés des couches minces d'oxyde de titane, les nanofilms couvrant les cabines de douche, les dentifrices au nanophosphate de calcium pour combler les minuscules fissures des dents, les crèmes antisolaires au dioxyde de titane et les rouges à lèvres à l'oxyde de zinc représentent quelques exemples d'applications possibles (Elgrabli D., Lacroix G., 2009). En médecine, des NP telles que la magnétite et les dendrimères sont généralement utilisées pour délivrer les médicaments directement au site atteint. On les retrouve aussi en recherche scientifique où la population exposée se trouve être les étudiants et les professeurs (Haji et al., 2016).

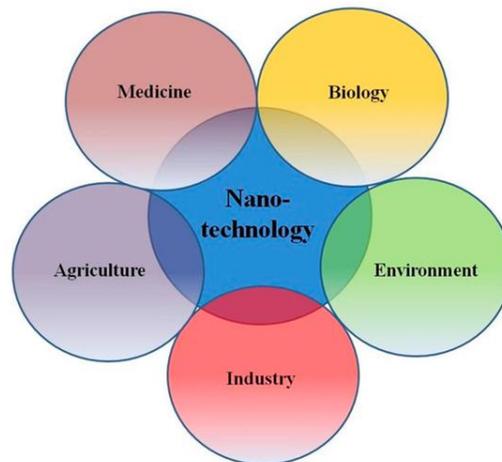


Figure 2.1 Secteurs d'activités innovateurs de la nanotechnologie dans le monde.

Tiré de Marziyeh A. et al. (2018).

En 2015, environ 2000 produits contenant des nanomatériaux étaient commercialisés annuellement, ce qui représente un marché annuel mondial de plus de trois billions de dollars à l'horizon 2020, impliquant plus de deux millions de travailleurs (Woodrow Wilson Center). On estimait à 10% le nombre d'emplois manufacturiers liés aux nanotechnologies en 2008 et depuis ce nombre n'a pas cessé de croître.

2.1.2. Au Québec en particulier

Les NP grâce à leur petite taille, peuvent acquérir des propriétés particulières et cela explique l'engouement se faisant tout autour. Au Québec particulièrement, de nombreux travailleurs œuvrent à la synthèse, à la transformation et à l'utilisation des NP. Les principaux secteurs impliqués sont les universités et les industries notamment dans la production du caoutchouc, du plastique, des équipements pour la manipulation des NM, des composites, des textiles, des peintures et des cosmétiques. On les retrouve aussi dans le secteur pharmaceutique, génomique, métallurgique pour le traitement et la transformation du métal, les microélectroniques et activités liées à différentes technologies (la filtration membranaire par exemple) (Ostiguy C. et al., 2008).

On estime à environ 250 le nombre total d'entreprises et plus de 2000 personnes œuvrant dans le domaine des nanotechnologies au Québec, principalement en milieu scolaire. Cette situation devrait cependant s'inverser au fur et à mesure que les entreprises intégreront les NP dans leur chaîne de production exposant ainsi de milliers de travailleurs québécois à ces matériaux. Par ailleurs, plus de 800 produits commercialisés au Québec contiennent des NP dont les principales sont essentiellement l'oxyde de zinc (> 10 tonnes) et le dioxyde de titane (1-10 tonnes) (selon une étude de l'IRSST faite en 2015). Enfin, il est important de relever que les activités de l'industrie nanotechnologique au Canada se répartissent autour de 40 % rien qu'à Montréal. Le Québec est la première province canadienne à avoir établi une stratégie globale pour soutenir leur développement et leur exploitation commerciale. L'IRSST poursuit également son travail de « téléguidage » sur les risques et les mesures de prévention liées à ces nouvelles technologies, leur dernier rapport étant paru en 2014.

La production des nanomatériaux fait partie de la prochaine révolution industrielle et médicale car la science ne cesse de démontrer leur utilité. Face à ces propriétés bénéfiques apparaissent également de nouveaux risques pour la santé de l'homme. On assiste à une augmentation constante de la production de nanoparticules synthétiques alors que leur impact sur la santé et l'environnement n'ont pas encore été tous évalués. Nous sommes déjà tous exposés aux NP et cela sans même le savoir. Toutefois, pour les travailleurs de ce domaine, les niveaux d'exposition naturellement plus élevés pourraient à la longue entraîner le développement de maladies professionnelles et l'augmentation du taux d'absentéisme au travail.

2.2. RISQUES ASSOCIÉS AUX NANOPARTICULES

2.2.1. Définition générale

Dans un rapport de la CNESST publié en 2008, la nanotechnologie pourrait effectivement poser de plus en plus de problème en ce qui concerne l'environnement, la santé et plus particulièrement celle du travailleur. En effet en milieu de travail, cette discipline émergente implique une exposition quotidienne de milliers de travailleurs à diverses NP et procédés de fabrication de NM pour lesquels la documentation reste encore très faible. Par ailleurs, les mesures de sécurité au sein des entreprises demeurent essentiellement préventives faute d'informations et visent uniquement à limiter le degré d'exposition des travailleurs. Jusqu'ici aucune loi ou réglementation portant spécifiquement sur les NM n'a encore vu le jour pourtant leur utilisation incombe plusieurs types de risques (Figure 2.2).

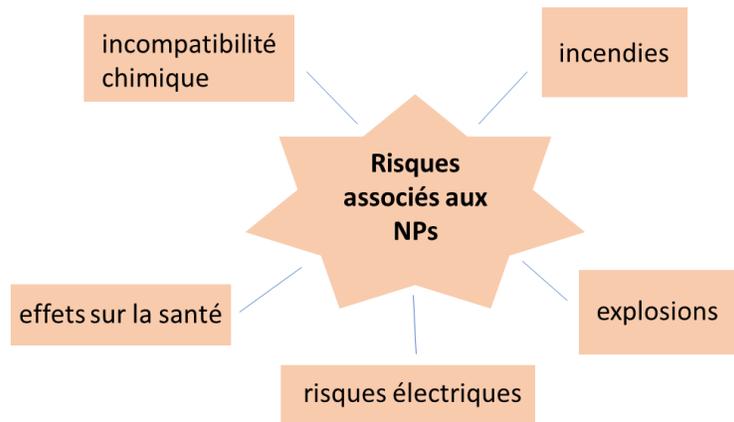


Figure 2.2 Risques associés aux NM en milieu de travail.

Informations tirées de Ostiguy C. et al. (2014).

Les NP à cause de leur surface relative par unité de masse beaucoup plus importante que les matériaux de même composition chimique de même que la prédominance des effets quantiques, peuvent entraîner lors de leur production ou manipulation des incompatibilités chimiques, des incendies, des explosions, des risques électriques ou une toxicité pour les travailleurs.

2.2.2. Effets néfastes sur la santé

Les NP peuvent avoir un impact sur la santé des travailleurs. À cette dimension, les nanoparticules pénètrent facilement dans l'organisme et génèrent des effets comme le stress oxydatif, des interactions protéiques et génétiques pouvant entraîner des effets toxiques aux niveaux pulmonaire, cardiaque, reproducteur, rénal, cutané et cellulaire. À la suite d'une exposition, il est donc possible que certaines NP insolubles se retrouvent dans le sang après avoir franchi les mécanismes de protection respiratoire, cutanée ou gastro-intestinale. De là, elles seront distribuées vers les différents organes, partout dans l'organisme, incluant le cerveau et pourront être stockées à l'intérieur même des cellules. En milieu de travail, les NP sont principalement absorbées par la voie pulmonaire et dans certaines situations, par la voie cutanée ou orale (voir Figure 2.3).

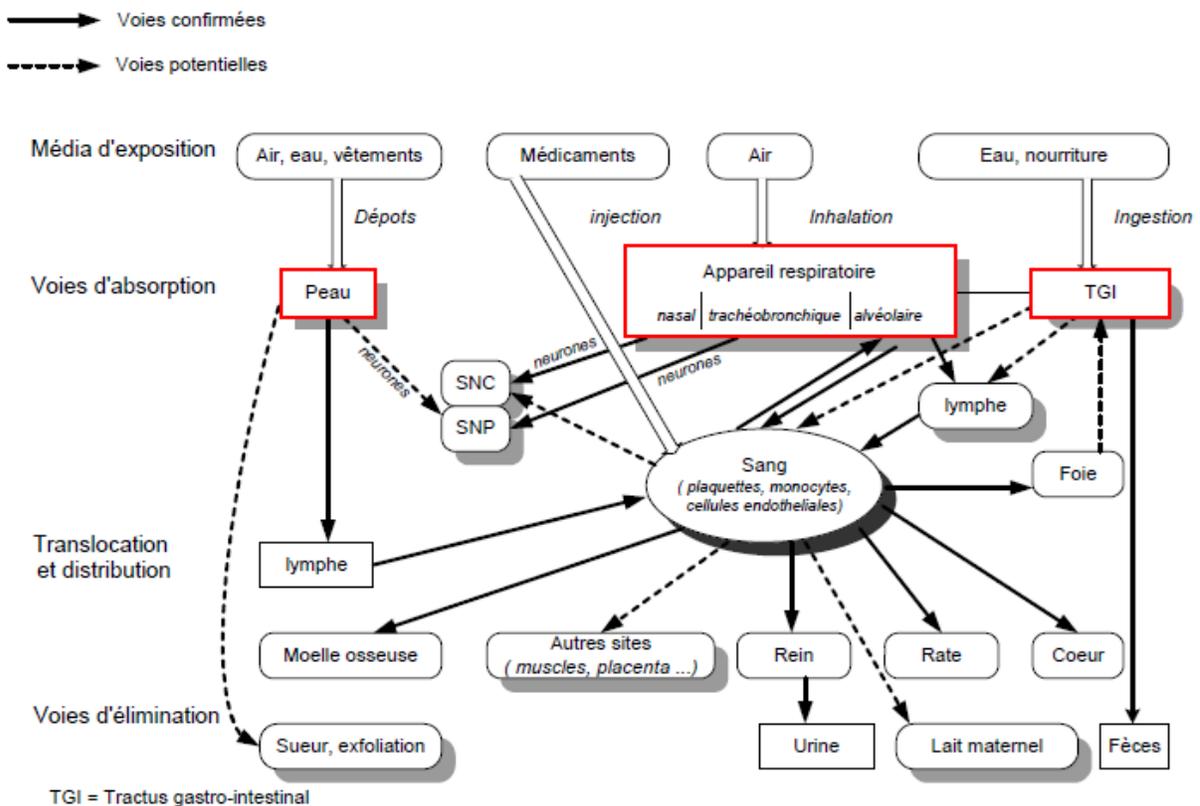


Figure 2.3 Effets potentiels des particules ultrafines inhalées et principales voies d'absorption des NP.

Adapté de Ostiguy C. et al. (2010).

De multiples recherches ont déjà démontré les effets toxiques reliés à certaines nanoparticules. Par exemple, des études sur les nanotubes de carbone (NTC) ont révélé une inflammation, des réactions fibrogènes pulmonaires, la formation de granulomes et de tumeurs mésothéliales chez l'animal, suggérant un potentiel de comportement semblable à celui de l'amiante (Poland et al., 2008). Cette comparaison pose problème lorsqu'on sait qu'en 2008, l'amiante demeurait la substance ayant causé le plus de décès reliés au travail au Québec. Les NP à base aluminium présent dans à peu près 20% des NM synthétisés sont capables de perturber la viabilité cellulaire et la fonction mitochondriale, ils augmentent également le stress oxydatif et altère l'expression des jonctions protéiques serrées au niveau de la barrière hémato-encéphalique (Chen et al., 2008). D'autres NP tels que l'argent dont l'utilisation se voit de plus en plus rependue autour de nous (antibactérien, pansement, revêtement d'instruments chirurgicaux et de prothèses) ont été détecté dans plusieurs organes comprenant les poumons, les reins, le foie et le cerveau après exposition de rats à ces NP par inhalation ou par injection sous-cutanée. Ces NP ont d'ailleurs démontré des effets toxiques plus élevés en comparaison à d'autres concernant la viabilité cellulaire, la génération de ROS et la libération de LDH (Foldbjerg et al., 2011).

Le dioxyde de titane est l'un des cinq nanomatériaux les plus utilisés dans les produits de grande consommation, dont les crèmes solaires et les aliments. En tant qu'additif alimentaire, ce produit a des propriétés blanchissantes et éclaircissantes (d'où son utilisation en confiserie, dans les sauces blanches ou les glaçages) et il contient une bonne proportion de nanoparticules (jusqu'à 36%). Cet oxyde nanométrique de même que l'oxyde de zinc, ont été largement documenté comme ayant la capacité d'endommager l'ADN et d'avoir des effets cytotoxiques pour l'organisme (Guan et al. 2012; Sharma et al. 2012; Liu et al. 2009; Bhattacharya et al. 2009). Par ailleurs, une étude récente menée chez des rats montrait que l'ingestion quotidienne de dioxyde de titane provoquait des dérèglements immunitaires ainsi que des lésions précancéreuses (Hashem et al. 2020). Il existe d'autres effets néfastes associés à l'utilisation des NP sur la santé humaine mais la plus commune jusqu'ici demeure l'inflammation.

2.2.3. Effets pro-inflammatoires

L'inflammation est une réponse biologique normale du corps à diverses agressions, y compris des micro-organismes, des blessures, des poussières, des drogues et d'autres produits chimiques. Dans des circonstances normales, l'inflammation disparaîtra et se résoudra chez un individu en bonne santé grâce à une série de réponses étroitement réglementées. Cependant, lorsque la déréglementation se produit, l'inflammation peut entraîner des troubles et des maladies inflammatoires dont l'asthme et plusieurs maladies pulmonaires, inflammatoires, intestinales, la dermatite et l'arthrite.

Les NP peuvent avoir des effets pro-inflammatoires, principalement en augmentant la production de différentes cytokines pro-inflammatoires ou en exacerbant l'inflammation des voies respiratoires *in-vivo*. Plusieurs études montrent cela; l'une d'entre elles faite avec les NP d'argent donné par inhalation à des rongeurs a entraîné une légère augmentation des mucines neutres, avec une certaine nécrose hépatique et une accumulation des NP dans les poumons et le foie des animaux (Wijnhoven et al., 2009). Chez les femelles rats Wistar également, l'administration par voie nasale d'oxyde de zinc nanométrique a engendré des lésions au niveau des poumons (Cho et al., 2011). En revanche avec les NP de palladium administré par voie intraveineuse, cela a entraîné une plus forte libération de certaines cytokines pro-inflammatoires telles qu'IL-1 α , IL-6, IL-12, GM-CSF et l'INF- γ (Iavicoli et al., 2017). Les NP de palladium peuvent aussi modifier la biologie des éosinophiles humains, bon indicateur de problèmes inflammatoires car impliqués lors des allergies. Cela se produit notamment par un réarrangement de leur cytosquelette et une augmentation de leur capacité à adhérer au tissu endothélial (CChay P. et al., 2018).

Une autre composante clés de l'inflammation se trouve être le neutrophile. En effet, ce sont les premiers à arriver sur le site de l'infection; ce sont aussi les plus nombreux parmi les leucocytes humains ($\approx 70\%$). Ces cellules sont généralement affectées lorsqu'on parle d'effet pro-inflammatoire des NP et l'étude de leurs fonctions est un bon indicateur en toxicologie.

2.2.4. Impact sur le neutrophile

Pendant inflammation aiguë, les cellules neutrophiles polymorphonucléaires (PMN) sont les premiers types de leucocytes à migrer au site inflammatoire, de là ils produiront plusieurs médiateurs pro-inflammatoires, entre autres les chimiokines qui attireront d'abord d'autres PMN puis d'autres types de cellules comme les monocytes-macrophages et les lymphocytes, correspondant à une inflammation chronique (voir Figure 2.4) (Gonçalves D.M. et al., 2011). Lorsque le taux d'apoptose PMN est accéléré, il en résulte une augmentation de la sensibilité bactérienne. En revanche, lorsque l'apoptose est retardée ou supprimée, cela peut aggraver l'inflammation et entraîner des troubles auto-immunes. Après 24 h, environ 50% des PMN rentrent normalement en apoptose.

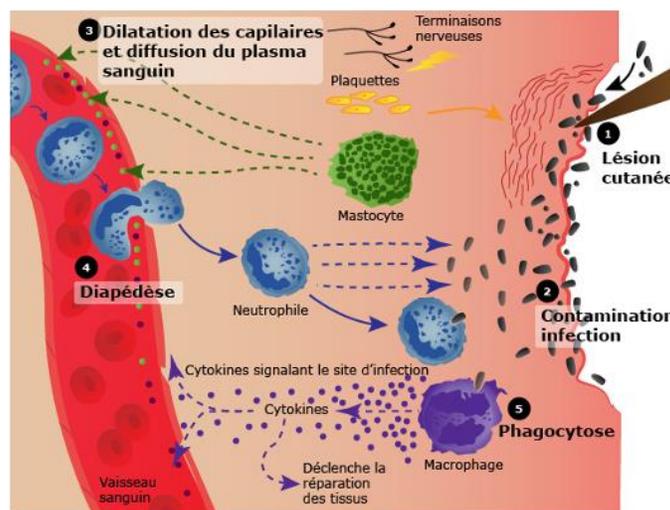


Figure 2.4 Principales étapes d'une réponse inflammatoire aiguë.

Source <http://e.maxicours.com/img/4/1/2/0/412012.jpg> (consulté le 07 juillet 2020).

Les neutrophiles présents au foyer inflammatoire ont la capacité d'éliminer l'élément étranger via deux principaux types de mécanismes : la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et la dégranulation. Cette dernière est un mécanisme indépendant de l'oxygène par lequel les neutrophiles libèrent de puissants produits de dégradation toxiques stockés dans leurs granules. Les neutrophiles peuvent également avoir recours à la phagocytose afin d'éliminer des corps étrangers tels que les bactéries et les champignons.

Ces neutrophiles polymorphonucléaires peuvent être une source importante de diverses cytokines qui vont aller léser le tissu (IL-1 α , IL-8, IL-12, TNF, TGF- β etc.), mais également de certaines chimiokines ou agents d'activation impliqués dans l'inflammation tels que l'IL-1 β , IL-8, IL-15, GM-CSF et TGF- β (Gonçalves D.M. et al., 2011). En ce qui concerne la composante pro-inflammatoire, il est important de relever que toutes ces fonctions du neutrophile ont des implications associées à l'effet des NP dans la littérature. Par exemple, dans une étude faite dans notre laboratoire avec les dendrimères sur un modèle murin, on a pu observer une augmentation rapide de l'afflux de leucocytes après 3 h seulement, la grande majorité de ces cellules étant des neutrophiles. Le même effet a ensuite été rapporté avec les NP d'or (Durocher I. et Girard D., 2016; Durocher I. et al., 2017). Des effets similaires ont également pu être notés dans nos expérimentations *in-vitro* (Lavastre V. et al., 2015). La population de neutrophiles chez une souris ne représentant qu'environ 20% des leucocytes totaux contre 65 à 70% chez l'humain, nous utilisons essentiellement des neutrophiles issus du sang humain frais de donateurs, plus adaptés pour une meilleure évaluation du risque. Chacune des fonctions que nous avons citées plus haut pourraient donc être revues à la hausse ou à la baisse moyennant l'usage de certaines NP sur ces cellules (Lavastre V. et al., 2015).

2.3. ÉVALUATION DU RISQUE CHEZ LES TRAVAILLEURS

L'évaluation du risque est une étape préliminaire essentielle afin de déterminer le niveau de contrôle à mettre en place pour limiter les émissions de NP et pour empêcher une substance toxique de porter atteinte à la santé du travailleur. Ces mesures de contrôle doivent évidemment être proportionnelles au risque documenté, estimé ou potentiel de même que des incertitudes relatives à ce risque. Toutefois en l'absence de connaissances adéquates sur la toxicité et le comportement des NP dans l'air et en l'absence de normes spécifiques, des mesures de contrôle strictes devraient être instaurées afin de minimiser, autant que possible, le risque d'absorption pulmonaire et cutanée chez les travailleurs (Ostiguy C. et al., 2014). L'évaluation des risques toxiques peut se définir comme l'estimation de la probabilité que des effets potentiels sur la santé puissent résulter d'une exposition à certaines substances chimiques toxiques. Pour qu'il existe un risque, il faut que le NM soit toxique et que le travailleur y soit exposé. Puisque la toxicité est souvent inconnue ou mal documentée, le contrôle de l'exposition demeure la meilleure alternative permettant de minimiser ce risque.

2.3.1. Facteurs de risque

De façon générale, une NP sera normalement plus toxique que le même produit chimique de plus forte dimension mais il est actuellement impossible de déterminer quel paramètre de mesure de l'exposition est le mieux corrélé aux effets toxiques observés (Ostiguy C. et al., 2014). L'évaluation de l'exposition professionnelle doit donc porter sur une série de paramètres et il se dégage au sein de la communauté scientifique un consensus sur plusieurs facteurs pouvant contribuer à la toxicité des NP (voir Figure 2.5). Il s'agit premièrement des facteurs liés à la nature et aux caractéristiques propres à un NM spécifique, qui représentent le danger notamment sur le plan de sa toxicité, de son inflammabilité, de son explosibilité ou de sa réactivité catalytique. Deuxièmement, les facteurs liés au travail de même que ceux associés aux tâches qui ne font pas partie des dangers mais plutôt du potentiel d'exposition. Ceux-ci contribuent de façon majeure aux impacts potentiels de l'exposition aux NM sur la santé du travailleur. En effet, les caractéristiques des lieux (surface, volume, ventilation, encombrement etc.), certaines opérations en phase liquide (pistolet de pulvérisation, très forte agitation), de même que la fréquence et le temps requis pour réaliser certaines tâches, peuvent présenter un risque sérieux d'exposition professionnelle susceptible d'entraîner une absorption pulmonaire, cutanée ou digestive. Troisièmement, les facteurs liés à l'absorption, qui en quelque sorte orientent les sites de dépôt des NP dans l'organisme ainsi que les organes à risque. Dans la majorité des situations rencontrées en milieu de travail, l'absorption pulmonaire serait beaucoup plus importante que l'absorption cutanée ou digestive. Enfin, les facteurs liés au travailleur lui-même comprenant entre autres son état de santé générale (asthme, maladie chronique, prise médicamenteuse) ou encore son mode de vie (tabagisme, activité physique, alcoolisme), pouvant avoir des conséquences tant sur le dépôt pulmonaire que sur la clairance des NP. Chez un travailleur sain, seulement une très faible proportion des NM réussira normalement à déjouer les mécanismes de défense naturels. Cependant chez un travailleur atteint de maladie pulmonaire, la translocation pourrait être beaucoup plus importante. L'accumulation de NM, notamment au niveau pulmonaire, pourrait alors favoriser le développement de maladies professionnelles à moyen et à long terme (Ostiguy C. et al., 2014).

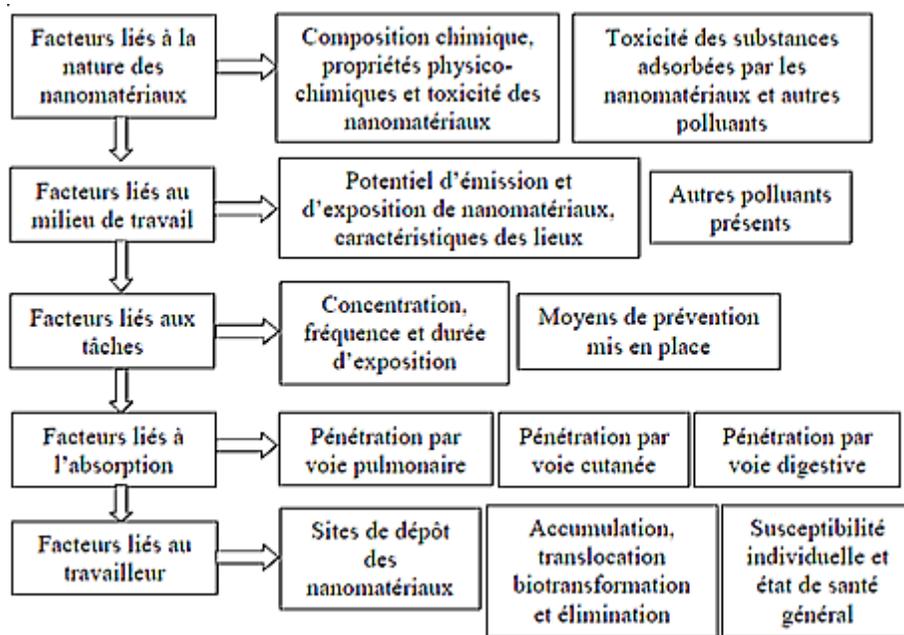


Figure 2.5 Facteurs contribuant aux effets potentiels des nanomatériaux sur la santé des travailleurs.

(IRSST, 2014)

2.3.2. Limites et inconvénients

Dans un contexte de données incomplètes pour la grande majorité des substances nanométriques, il demeure très souvent impossible de quantifier les risques auxquels s'exposent les travailleurs. En effet, la toxicité des produits, le niveau d'empoussièrement des milieux de travail et leur potentiel à causer des incendies ou des explosions demeurent peu documentés. Les données d'exposition disponibles sont également rares et il n'existe toujours pas de méthode de mesure qui fasse consensus pour caractériser l'exposition des travailleurs aux NM. Dans un tel contexte d'incertitudes, une approche de précaution doit être préconisée afin de minimiser l'exposition du travailleur. Au Québec par exemple, la responsabilité de fournir un milieu de travail sécuritaire relève des employeurs et les mesures préventives doivent être appliquées par les employés. Il importe donc, dans tous les milieux de travail où des NM sont manipulés, de développer un programme de prévention qui tienne compte des caractéristiques spécifiques des NM afin de mettre en place de bonnes pratiques de travail et d'instaurer des procédures de prévention adaptées aux risques propres à chaque situation de travail.

D'autre part, il est important d'avoir des NP de référence afin de pouvoir faire une meilleure comparaison et ainsi limiter les biais éventuels lors de l'évaluation des risques. L'élaboration de NP de référence bien caractérisées permettrait une meilleure compréhension du comportement des NP dans l'air ainsi que dans l'organisme. Certains auteurs proposent déjà des valeurs de référence pour différents NM, toutefois il n'existe aucune réglementation faite autour. Ces valeurs sont fixées à partir de leur propre modèle d'évaluation des risques et sur leurs propres expérimentations. De plus, des caractéristiques agissant possiblement sur la toxicité peuvent différer d'une étude à l'autre en fonction du mode de préparation, de la taille, des caractéristiques de surface, des polluants présents ou encore du degré d'agglomération.

L'évaluation quantitative des risques liés aux NM suppose donc une bonne connaissance de l'identité du danger, de la toxicité des produits (relation dose-réponse) et des niveaux d'exposition aux divers postes de travail. Malheureusement à l'heure actuelle, bien que l'effort de masse soit encourageant, nous faisons encore face à un déficit d'informations; L'évaluation des risques devrait alors se faire au cas par cas. Bien qu'il soit impossible de déterminer quantitativement les risques associés aux NM, les données actuelles étant insuffisantes, une évaluation qualitative ou semi-quantitative des risques ainsi que l'adoption d'une approche préventive reste possible et demeure l'option la plus préconisée.

Au Québec, la loi sur la santé et la sécurité du travail (LSST) et le Règlement sur la santé et la sécurité du travail (RSST) couvrent les aspects généraux des obligations en termes d'élaboration de programmes de prévention des établissements et de contrôle des contaminants dans le milieu de travail. Le système d'information sur les matières dangereuses utilisées en milieu de travail (SIMDUT) est également un système canadien auquel adhère le Québec et qui oblige les fournisseurs à étiqueter les substances chimiques et à produire des fiches de données de sécurité décrivant les différents produits, leurs principales caractéristiques physiques, les risques à la santé, à la sécurité et les mesures préventives à mettre en place. Plusieurs autres lois provinciales ou fédérales, tel le transport des matières dangereuses, peuvent s'appliquer aux NP tout comme elles s'appliquent aux autres substances chimiques mais aucune loi, ne porte spécifiquement sur les NP (Ostiguy C. et al. 2014).

Enfin, tel que mentionné dans la section précédente, une autre difficulté rencontrée lors des procédures d'évaluation du risque consiste à déterminer le paramètre dose-réponse qui serait le mieux corrélé avec les effets toxiques observés. Cependant, dans la série de facteurs à risque cités (Figure 2.5), il reste étonnant de voir que le sexe des individus n'est pas pris en compte. Nous nous sommes donc intéressés dans ce projet à ce paramètre pour lequel la littérature reste jusqu'ici très anémique.

2.4. LES NANOPARTICULES ET LE DIMORPHISME SEXUEL

Le dimorphisme sexuel peut se définir comme l'ensemble des différences anatomiques physiologiques et chromosomiques plus ou moins marquées entre les individus mâle et femelle d'une même espèce. Lorsqu'on parle de NP et de dimorphisme sexuel, on entend évidemment étudier l'impact que ces matériaux pourraient avoir sur la santé d'individus mâle ou femelle d'une même espèce. Chez l'humain, des études épidémiologiques et cliniques révèlent déjà une forme de disparité entre les sexes en ce qui concerne de nombreux problèmes de santé. Par exemple sur le plan mondial, les personnes souffrant de maladies pulmonaires chroniques (hypertension pulmonaire, bronchopneumopathie chronique obstructive non médiée par la cigarette, maladie pulmonaire auto-immune, bronchiectasie et asthme chez l'adulte) sont majoritairement des femmes (Forum des sociétés respiratoires internationales et de la société respiratoire européenne, 2017; Fuentes et Silveyra, 2018). D'autres maladies pulmonaires tels que le cancer des poumons et la fibrose pulmonaire, se retrouvent de façon disproportionnée chez les hommes (Fuentes et al., 2018; Sathish et Prakish, 2016). En outre, les taux de mortalité face à ces problèmes de santé sont également disproportionnés : il a été signalé que les infections des voies respiratoires (IVR) supérieures surviennent plus fréquemment chez les femmes, mais que les IVR inférieures sont plus fréquentes chez les hommes, qui démontrent également des taux de gravité et de mortalité plus élevés pour la plupart des IVR (Falagas et al., 2007). Les mécanismes, biologiques ou culturels, responsables de ces différences ne sont pas entièrement compris. Faire progresser nos connaissances sur ces différences est essentiel afin de développer des mesures de prévention sûres et adaptées en matière de nanotechnologie et de méthodes thérapeutiques en nanomédecine.

2.4.1. Chez les animaux

Chez les rongeurs plusieurs études faites avec les NP d'argent, d'or, d'oxyde d'aluminium et de titanium ont montré des différences entre les sexes dans les pathologies médiées par ces NP. Dans une étude faite par inhalation avec la NP d'argent, les rongeurs femelles avaient tendance à accumuler cette NP dans les reins de façon plus importante que les rongeurs mâles (Dong et al., 2013). Cependant, ces derniers ont montré plus de pathologies tant au niveau des reins qu'au niveau des poumons. L'inflammation pulmonaire était persistante chez les mâles tandis que les femelles avaient tous récupérées

et éliminer la NP; ceci pourrait donc expliquer le fait qu'elles se soient retrouvées en plus grande quantité au niveau de leur reins. Cette étude a également analysé les changements dans l'expression des gènes rénaux et a rapporté que les femelles présentaient une augmentation des gènes de signalisation extracellulaires liés à l'interaction des récepteurs ECM, MAPK et PPAR (Dong et al., 2013). Dans une autre étude, il y a eu une augmentation similaire de l'expression du gène hépatique des rats femelles, mais dans le foie des rats mâles, il y avait une expression accrue des gènes liés au diabète (Kim et al., 2016). Aucune différence de sexe dans l'accumulation hépatique de NP d'argent n'a été observée.

Toujours par inhalation chez les rats, les NP d'or ont entraîné plus d'inflammation pulmonaires chez les femelles; on a également noté une plus forte accumulation de ces NP dans leur rein et dans leur cerveau comparativement aux mâles (Sung et al., 2011). Avec les NP d'oxyde métallique, des effets similaires ont été relevés. Dans un modèle murin, les femelles ayant reçu les Al_2O_3 NP par inhalation ont eu plus de problèmes neurologiques (comportement dépressif) que leurs homologues mâles (Zhang et al., 2015). Par ailleurs, l'exposition respiratoire aux TiO_2 NP n'a pas produit à elle seule une réponse inflammatoire robuste autant chez les souris mâles (Hussain et al., 2011) que chez les femelles (Larsen et al., 2016). Toutefois, ces TiO_2 NP chez des souris femelles enceintes produisent une réponse inflammatoire robuste (Fedulov et al., 2008; Lamoureux et al., 2010), pouvant donc suggérer une altération hormonale de la phagocytose et de la clairance par les macrophages (Zhang et al., 2015).

2.4.2. Chez l'humain

Dans une étude humaine récente, des volontaires masculins et féminins en bonne santé ont été exposés à des ZnONP en aérosol; tous les deux les sexes ont généré des réponses inflammatoires locales et systémiques, mais aucune différence de sexe n'a été observée (Monsé et al., 2018). Cependant, l'étude était relativement petite ($n = 8$ pour chaque sexe) et n'utilisait que des individus en bonne santé, ce qui ne tient pas compte des différences de sexe potentielles chez les individus ayant des conditions préexistantes, tels les travailleurs de ce domaine. Une autre étude humaine relativement petite ($n = 6$ pour chaque sexe) n'a pas semblé observer de différences entre les sexes en réponse aux ZnONP inhalés, cependant, les résultats spécifiques au sexe n'ont jamais été rapportés (Beckett et al., 2005).

Dans l'une des premières études à examiner le rôle du sexe dans les interactions cellule-NP, une étude de 2018 a démontré que le sexe pouvait affecter l'absorption de NP dans les cellules humaines primaires (Serpooshan et al., 2018). De plus, il existe des preuves expérimentales selon lesquelles les hormones stéroïdes sexuelles seraient capables d'influencer le phénotype macrophage et la réponse aux xénobiotiques (Calippe et al., 2010, 2008; Keselman et al., 2017). Ces données suggèrent des différences à médiation hormonale dans la capacité des MA mâles et femelles à phagocyter les NP inhalés (Zhang et al., 2015). Dès lors, les événements cellulaires ultérieurs suivant l'absorption, tels que : la toxicité cellulaire, la production de cytokine, le recrutement de cellules immunitaires, la signalisation inflammatoire systémique et le transport extra-pulmonaire, pourraient contribuer aux biais sexuels dans les maladies médiées par les NP. Il y a probablement aussi une période de latence entre l'exposition et la maladie, semblable à l'amiante (Boulanger et al., 2014), et les études professionnelles ont principalement porté sur l'évaluation des niveaux d'exposition (Beard et al., 2018). Malheureusement, moins de 20% des sujets de ces études étaient de sexe féminin et les données n'ont pas été analysées par sexe.

Plus récemment encore avec la pandémie Covid-19 qui secoue le monde entier et dont le virus responsable est de l'ordre du nanomètre (SARS-CoV-2 = 60-140 nm), des études statistiques montrent que les hommes seraient plus à risque que les femmes. En Chine par exemple, à exposition égale les hommes meurent plus que les femmes (Chen et al., 2020). En l'Union Européenne également le même effet a été répertorié. En mars 2020, c'est 60% de décès attribués aux hommes en France contre 67% en Espagne et jusqu'à 71% en Italie (Roni Caryn R., 2020; Wenham et al., 2020).

Bien que des études faites chez les rongeurs affichaient une forme de dimorphisme sexuel liés à la toxicité des NP, celles-ci se sont arrêtées essentiellement à évaluer la persistance et la toxicité de ces NP au niveau du tissu. D'autre part les études chez l'humain sont quasiment inexistantes et à ce jour, aucune étude cytotoxique ou mécanistique autant chez les rongeurs que chez l'humain n'a encore été effectuée dans ce sens. Tirer des conclusions sur les différences entre les sexes à partir des résultats d'études distinctes est un exercice difficile et peu fiable, en raison de nombreux autres facteurs expérimentaux ou biologiques pouvant contribuer à la variabilité observée. La ou les variables responsables de ces résultats demeurent donc inconnue(s). Une évaluation plus complète des maladies humaines et des études mécanistiques autant chez l'humain que chez les animaux, sont nécessaires pour clarifier les biais sexuels potentiels dans les pathologies médiées par les NP. Également pour définir les caractéristiques spécifiques des NP causant ces différences.

Chapitre 3

MATÉRIELS ET MÉTHODES

3.1. CHOIX ET CARACTÉRISATION DES NANOPARTICULES

Le choix des NP a été fait sur leur utilisation courante et sur leur caractérisation plus ou moins déjà amorcée par différentes études de toxicités dans la littérature, y compris celles de notre laboratoire. Le palladium (Pd) et la platine (Pt) sont des métaux nobles principalement utilisés en automobile dans les convertisseurs catalytiques; Leur application se fait également en électronique, en ingénierie et dans les secteurs des bijouteries. TiO_2 et ZnO se retrouvent majoritairement dans les crèmes solaires ou dans certains aliments sous forme d'additifs (par exemple les yoghourt, glaces, confiseries). L'oxyde de cérium (CeO_2) quant à lui est une sorte de poudre extra fine de couleur beige, qui est un élément essentiel dans la production du verre et des miroirs. Il sert au polissage des biseaux, des bordures du verre, enlève les égratignures, les taches et assure la brillance des surfaces polies.

Nous les avons ensuite caractérisés par DLS (Dynamic Light Scattering), à l'aide de l'appareil Nanosizer (Zetasizer Nano-ZS modèle ZEN3600, Malvern) disponible dans notre laboratoire, afin de connaître leur comportement dans les différents milieux que nous utilisons. Par exemple certaines NP comme Pd et TiO_2 avaient tendance à s'agréger dans du RPMI seul mais beaucoup moins lorsqu'on rajoutait du sérum autologue dans le milieu. Ces NP proviennent tous de la même compagnie : *Sciventions Inc* (Toronto, ONT, Canada). Elles sont concentrées à 1,5 mg / ml et stabilisées dans du polyacrylate de sodium. Leur diamètre est également compris entre 1-10nm (selon le manufacturier) (voir Tableau 3.1). Par ailleurs, des tests d'interférence et de stérilité ont été effectués pour la présence d'endotoxines et la contamination bactérienne; les NP étaient toutes en dessous du seuil de détection et aucune d'entre elles n'a été contaminées.

L'effet de ces NP sur la biologie de neutrophiles ou éosinophiles humains avait déjà été étudié par notre laboratoire, cependant nous n'avons pas pris en compte le sexe des donneurs. Il a été démontré que les NP de cérium diminuaient l'apoptose des neutrophiles, favorisaient le recrutement des éosinophiles et augmentaient la libération des ROS autant chez les neutrophiles que chez les éosinophiles (Lavastre V. et al., 2015; Marion-Murphy M. et Girard D., 2017). Les PdNP ont tendance à augmenter l'apoptose des

neutrophiles et l'adhésion cellulaire des éosinophiles (réarrangement du cytosquelette d'actine) (Chhay P. et al., 2018). Par ailleurs, le titanium représente actuellement la NP la plus étudiée dans la littérature probablement à cause de son utilisation courante et de ses propriétés cancérogènes. Chez le neutrophile, cette NP entraîne une plus forte libération d'IL-8 et favorise leur recrutement; Chez les éosinophiles elle favorise en revanche l'adhésion cellulaire. Un autre NP de plus en plus étudiée c'est l'oxyde de zinc. Avec ses propriétés cytotoxiques et génotoxique pour l'organisme, cet oxyde métallique a été identifié comme un agent anti-apoptotique chez le neutrophile. Chez les éosinophiles, il représente également un promoteur de la libération des ROS ainsi que d'autres interleukines (IL-1 β et IL-8). Il permet entre autres un taux de recrutement plus fort des PBMCs. Enfin, pour les NP de platinium, il n'existe pas encore de données sur leurs effets potentiels sur le neutrophile. Toutefois nous avons déjà pu démontrer que ces NP pouvaient augmenter l'apoptose chez les éosinophiles (Lavastre V. et al., 2015; Marion-Murphy M. et Girard D., 2017). En résumé, nous nous sommes servis de ces informations comme une base afin de poursuivre notre étude et porter plus d'attention sur l'impact du « sexe » dans l'ensemble de nos résultats.

Tableau 3.1 Caractérisation des NP par diffusion dynamique de la lumière.

NPs (Sciventions Inc)	<i>CeO₂ cristallin</i>	<i>Pd</i>	<i>Pt</i>	<i>TiO₂ (cristaux d'anatase)</i>	<i>ZnO cristallin</i>
	Suspension aqueuse	Solution aqueuse	Solution aqueuse	Suspension aqueuse	Suspension aqueuse
RPMI-1640	87,38 nm (100%) ^a -14,5 ± 1,4 mV ^b	643,4 nm (94,4%) -19,2 ± 1.8 mV	14,53 nm (85%) -14,6 ± 1.4 mV	745,7 nm (100%) -19,6 ± 1.8 mV	2,26 nm (100%) -8.56 ± 0.8 mV
RPMI-1640 +10% sérum	71,0 nm (91,3%) -9,64 ± 0.9 mV	98,97 nm (91,5%) -7,91 ± 0,7 mV	63,12 nm (86,7%) -8,46 ± 0,8 mV	80,67 nm (92,8%) -8,42 ± 0,8 mV	63,34 nm (100%) -9,33 ± 0,8 mV

^a Les résultats correspondent au diamètre moyen (en nm) à partir de trois lectures différentes, d'un pourcentage défini de NP dans la solution de base. Les NP sont suspendus à 100 μ g/ml dans le tampon indiqué et les mesures ont été faite à 37°C.

^b Les résultats correspondent au potentiel zêta moyen \pm SD (en mV) à partir de trois lectures différentes de la solution de base.

3.2. SELECTION DES DONNEURS

Les neutrophiles ont été isolés à partir d'échantillons sanguins frais provenant d'une banque de donneurs assez importante sur notre campus universitaire. Les personnes informées et consentantes ont été sélectionnées selon certains critères d'exclusion : non-fumeur, aucune prise de médicaments (incluant acétaminophène, Ibuprofène, sirop médicamenté, vitamines, etc.) dans les 10 derniers jours; ne pas présenter des symptômes de rhume/grippe quelques jours avant ou lors de la journée de la prise de sang; ne pas avoir une maladie connue/déclarée (diabète, arthrite, cancer, etc.); ne pas avoir donné du sang pour un autre projet ou chez Héma-Québec dans le dernier mois. Notons ici que l'âge n'est pas un facteur important pour observer les différences au niveau fonctionnel des neutrophiles; il n'y a aucune différence majeure entre les générations de 20 à 60 ans et 60 ans et plus (Corberand MD J. et al., 1981). Dans notre cas nous avons utilisé des donneurs de 20 à 60 ans. Par ailleurs pour nos analyses et pour chacune des fonctions étudiées, nous utilisons des groupes de 10-15 donneurs minimum par sexe.

3.3. ISOLEMENT DES NEUTROPHILES

Comme méthode d'isolement nous avons utilisé le dextran pour faciliter la sédimentation des globules rouges suivie d'une centrifugation sur Ficoll-Hypaque pour obtenir des neutrophiles et des éosinophiles tel que décrit dans nos précédentes études (Lavastre V. et al., 2005). Nos échantillons de neutrophiles étaient purs à 95% minimalement c'est-à-dire moins de 5% d'éosinophiles et de tout autres cellules sanguines (GR, monocytes et macrophages). Cela a pu être vérifié dans nos préparations par cytologie après cyto-centrifugation et coloration Hema-3 kit (Sciences Biochimiques Inc., Swedesboro, NJ). La viabilité cellulaire était également vérifiée par exclusion au bleu de trypan.

3.4. ÉVALUATION DE L'APOPTOSE PAR CYTOLOGIE

Une méthode que nous utilisons couramment au sein du laboratoire et qui a déjà fait ses preuves pour étudier l'apoptose, c'est l'observation microscopique. Les neutrophiles apoptotiques se définissent comme des cellules contenant un ou plusieurs noyaux pycnotiques de couleur foncée et sont aisément

différentiables des neutrophiles vivants au noyau polylobé. Pour l'examen cytologique, les cellules ont été incubées en présence des agonistes (NP et contrôles) dans des plaques 96 puits et pour une période allant de 20 à 24 h à 37 ° C dans 5% de CO₂. La concentration cellulaire était de 1x10⁶ /100µL pour refléter les conditions inflammatoires et nous avons utilisé comme milieu de culture du RPMI – 1640 + antibiotiques (pénicilline/streptomycine) + 10% de sérum de veau foetal provenant tous de la compagnie Sigma-Aldrich (Saint-Louis, Missouri, USA). De plus les NP ont été testées à 100µg/ml qui est une concentration de référence pour les analyses dans le laboratoire. Le HBSS a été utilisé comme tampon/contrôle négatif (Ctrl) et de la lectine végétale pro-apoptotique VAA-I (1 µg / ml) provenant également de la compagnie Sigma, comme contrôle positif. Après l'incubation, les cellules ont été cytocentrifugées sur lames de microscope, colorées avec le kit de coloration Hema 3 selon les instructions du fabricant puis examinées à la lumière du microscope à un grossissement final X 400. Les résultats ont été exprimés en pourcentage de cellules en apoptose.

3.5. QUANTIFICATION DE LA LIBÉRATION DES CYTOKINES

L'étude de la quantification des cytokines a été limitée à quatre d'entre elles principalement impliquées dans la réaction pro-inflammatoire soient IL-1β, IL-6, IL-8 et TNF. Les tests ont été effectués par ELISA à l'aide de trousse disponibles commercialement (BD biosciences, Mississauga, ON) et en utilisant les surnageants des neutrophiles traités 20-24h avec les différents agonistes et conservés à -80°C avant leur utilisation. Notez que pour ces tests ELISA on a utilisé comme contrôles positifs une cytokine anti-apoptotique GM-CSF à 65 ng/ml de chez Peprotech Inc. (Rocky Hill, NJ, USA) ainsi que du LPS à 100 µg/ml de la compagnie Sigma-Aldrich (Saint-Louis, Missouri, USA).

3.6. ÉTUDE DE LA MIGRATION CELLULAIRE

Le test de migration ou chimiotaxie a été réalisé *in-vitro* dans une micro-chambre de 48 puits encore appelée chambre de Boyden (Neuro Probe Inc., Gaithersburg, MD, USA) et telle que décrit précédemment (Ratthe C. et al, 2002). Cette chambre est constituée de deux compartiments, un compartiment inférieur où les différents agonistes ont été placés à l'intérieur des puits (volume final = 27 µl) et un compartiment supérieur où les neutrophiles (50 µl d'une suspension RPMI de 1 × 10⁶ cellules /ml)

ont été rajoutés. Les deux compartiments ont été séparés par une membrane microporeuse en polycarbonate de 3 µm d'épaisseur. La chambre a été incubée ensuite à 37 ° C pendant 60 min dans un incubateur humidifié en présence de 5% de CO₂. Lors de la période d'incubation, le haut de la chambre a été retiré et le côté supérieur de la membrane a été soigneusement essuyé avec le grattoir en caoutchouc fourni par le fabricant. La membrane en polycarbonate a été fixée dans du méthanol, colorée avec un kit de coloration Hema 3, montée sur une lame de verre et examinée au microscope optique sous un grossissement 400x. Le nombre de cellules dans cinq champs aléatoires a été compté, et les résultats ont été exprimés en nombre de cellules ayant migrées. Le chimioattractant CXCL8 / IL-8 (200 ng/ml) a été utilisé ici comme témoin positif.

3.7. ÉTUDE DE L'ADHÉSION CELLULAIRE AVEC LA LIGNÉE EA.HY296

Les neutrophiles ont été stimulés 30 min dans les mêmes conditions que précédemment avec du HBSS (Ctrl), 100 µg/ml de NP ou 10 ng/ml de TNF (témoin positif). On les a ensuite marqué pendant 30 min avec 5 µM de calcéine-AM (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, États-Unis) et à l'abri de la lumière. Des cellules EA.hy926 (American Type Culture Collection [ATCC]), ont été préparées à l'avance et déposées sur des coverslips (18 mm) à l'intérieur d'une plaque de 12 puits. Ces cellules endothéliales humaines, ont été utilisées uniquement après avoir obtenu une monocouche confluite à 95% minimum. À la fin du marquage, la suspension de neutrophiles a été rajoutée sur les coverslips préalablement asséchés puis incubé de nouveau 30min à 37°C (sans lumière). Après trois lavages au PBS 1X, les lamelles ont été observées directement au microscope à fluorescence (photomicroscope Leica DMRE). Le nombre de cellules adhérentes a été calculé en comptant le nombre de cellules fluorescentes de cinq champs hautes puissances (x 400) sélectionnées au hasard. Les images ont été prises avec un Cooke Sencicam, caméra haute performance couplée au logiciel Image Proplus[®] (version 4.0).

3.8. QUANTIFICATION DES ROS LIBÉRÉS

La production de dérivés réactives de l'oxygène ou ROS (espèce réactive de l'oxygène) peut être mesurée par différentes techniques. Ici, la mesure des ROS totaux intracellulaire a été faite au

spectromètre (SpectraMax M5, Molecular devices, San Jose, CA) à l'aide d'une sonde H₂DCFDA (10µM). Les neutrophiles ont tout d'abord été incubés 30 min avec la sonde fluorescente puis stimulés tels que décrit précédemment avec les différents agonistes pour des cinétiques allant de 5 à 60 min. Une dilution 1 :10 de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à partir d'une bouteille à 30% de la compagnie Sigma-Aldrich a été utilisée comme contrôle positif. La lecture au spectromètre a été faite à 485 nm (Ex), 538 nm (Em) et 530 NM (cut off). Les résultats ont été présentés en fluorescence.

3.9. ANALYSES STATISTIQUES

Les résultats ont été exprimés par une moyenne ± erreur type de la moyenne (n≥10). Une analyse de la variance a aussi été effectuée (ANOVA à un facteur) et les différences de chacun des groupes par rapport au groupe témoin ont été examinées à l'aide du test de Dunnett utilisant GraphPad Prism (version 6.00 pour Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, États-Unis). Les données ont été considérées significatives avec une valeur de p < 0,05. Le résumé des techniques utilisées dans ces travaux est représenté à la Figure 3.1.

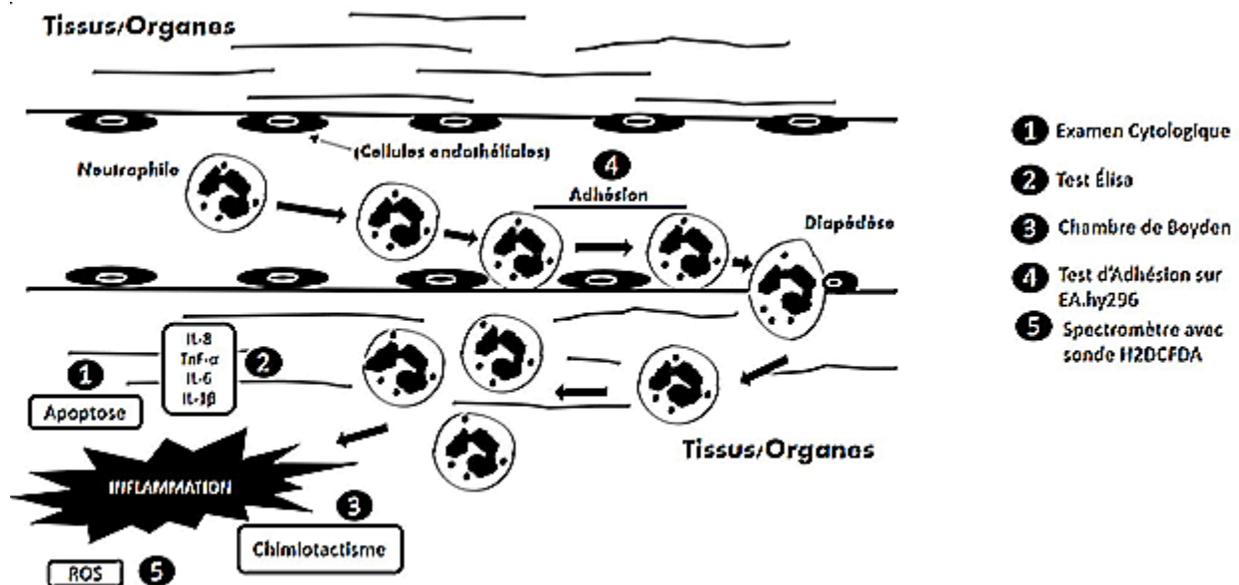


Figure 3.1 Étude de la réaction inflammatoire chez le neutrophile.

Inspiré de Vanharen M. et Girard D. (2019)

Chapitre 4

RÉSULTATS ET DISCUSSION

4.1. LES NANOPARTICULES RETARDENT L'APOPTOSE

4.1.1. Effet prédominant chez les femmes

Le premier résultat obtenu est sur la fonction apoptotique des neutrophiles. La différence dans la forme de leur noyau lorsqu'ils sont en apoptose (noyau pycnotique) comparativement à lorsqu'ils sont vivants (noyau polylobé), permet de les distinguer clairement au microscope optique (Figure 4.1).

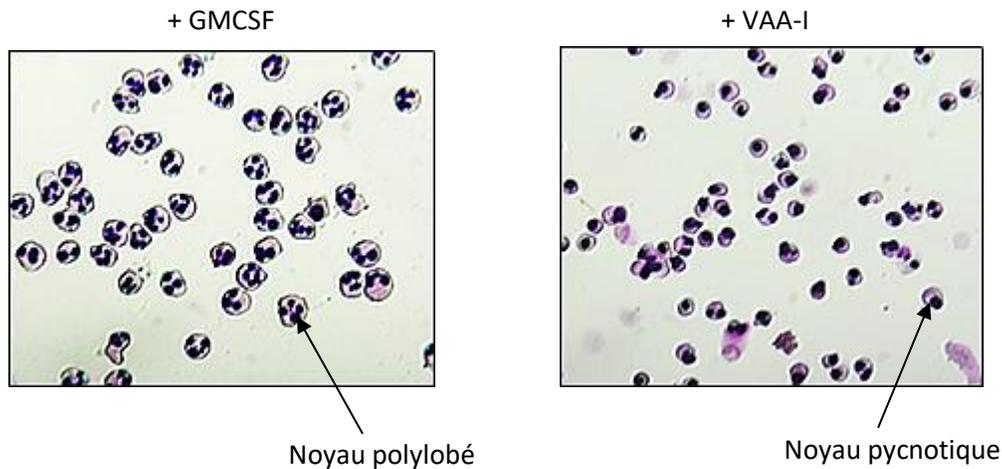


Figure 4.1 Différence entre des neutrophiles vivants et des neutrophiles en apoptose au microscope optique.

Le GMCSF représente une cytokine anti-apoptotique et VAA-I un agent pro-apoptotique. Ces derniers ont été utilisés comme témoin négatif et positif de l'apoptose respectivement. Les photos ont été prises avec une caméra Cooke Sencam après une incubation de 24 h à 37°C des neutrophiles, avec chacun de ces deux témoins.

Les résultats d'apoptose ont été obtenus après avoir fait le décompte au microscope optique du nombre de cellules en apoptose versus le nombre de cellules total (c'est-à-dire vivantes et en apoptose) de plusieurs champs représentatifs pour un minimal de 200 cellules décomptés en général. Quinze donneurs minimalement par sexe et par NP ont été pris en considération pour réaliser les analyses statistiques et un histogramme tel que présenté à la Figure 4.2. Ces résultats montrent que les NPs testées à l'exception de Pt retardent toutes l'apoptose des neutrophiles; l'effet observé n'est cependant pas le même d'une NP à l'autre et varie en fonction du sexe des donneurs. Les NP de ZnO ont eu un effet très significatif sur le retard apoptotique des neutrophiles, ce qui concorde avec ce qui avait déjà été démontré (Goncalves D.M. et Girard D., 2014). Toutefois, on distingue en plus de cela et à travers les résultats présentés, que l'effet de ZnONP chez les femmes est significativement plus important comparativement aux hommes. Les NP de TiO₂ et CeO₂ ont eu un effet significatif uniquement chez les femmes. Avec TiO₂NP des études précédentes avaient déjà montrées que cette NP entraînait une diminution de l'apoptose mais la différence entre les sexes n'avait pas été prise en compte (Goncalves D.M. et al., 2010). On se rend compte au travers des résultats obtenus dans ce projet, qu'en fait, l'effet en vue serait significatif uniquement chez les femmes. On peut donc soupçonner que par le passé, la faible proportion de donneurs déjà impliqués (n=3 à 5 donneurs au total), devait être majoritairement (ou même totalement) de sexe féminin; les informations à ce sujet n'ont pas été fournies. Il est important aussi de dire qu'en général le sexe des donneurs n'est pas spécifié dans les études de toxicité chez l'humain. Avec la NP de CeO₂ aussi, contrairement à la littérature qui faisait état d'un léger effet anti-apoptotique de cette NP sur les neutrophiles humains (Lavastre V. et al., 2015), on a pu démontrer que cet effet était plutôt significatif chez la femme mais pas chez l'homme. Cette différence dans les résultats pourrait de nouveau s'expliquer par la non-considération du sexe lors des expérimentations *in-vitro* et par un mixage des deux lors des analyses statistiques. Dès lors, l'effet significatif retrouvé ici se verrait atténué par les données de la gent masculine.

Les biais sexuels rencontrés pourraient être aussi bien d'ordre qualitatif (CeO₂ et TiO₂) que quantitatif (ZnO) et cela varie d'une NP à l'autre. Avec PdNP, aucune différence n'a été observée entre les deux sexes; cela suppose que l'étude mécanistique de cette fonction pourrait donc se poursuivre sans tenir compte de cette variable. Toutefois, les résultats obtenus avec cette NP étaient contraires à ceux qui avaient déjà été publiés par le passé (Lavastre V. et al., 2015) : On a observé un effet anti-apoptotique et non pro-apoptotique. Il s'agit là d'une différence drastique et même troublante; une étude plus détaillée des voies mécanistiques régissant ces effets devrait nous aider à répondre à ces interrogations.

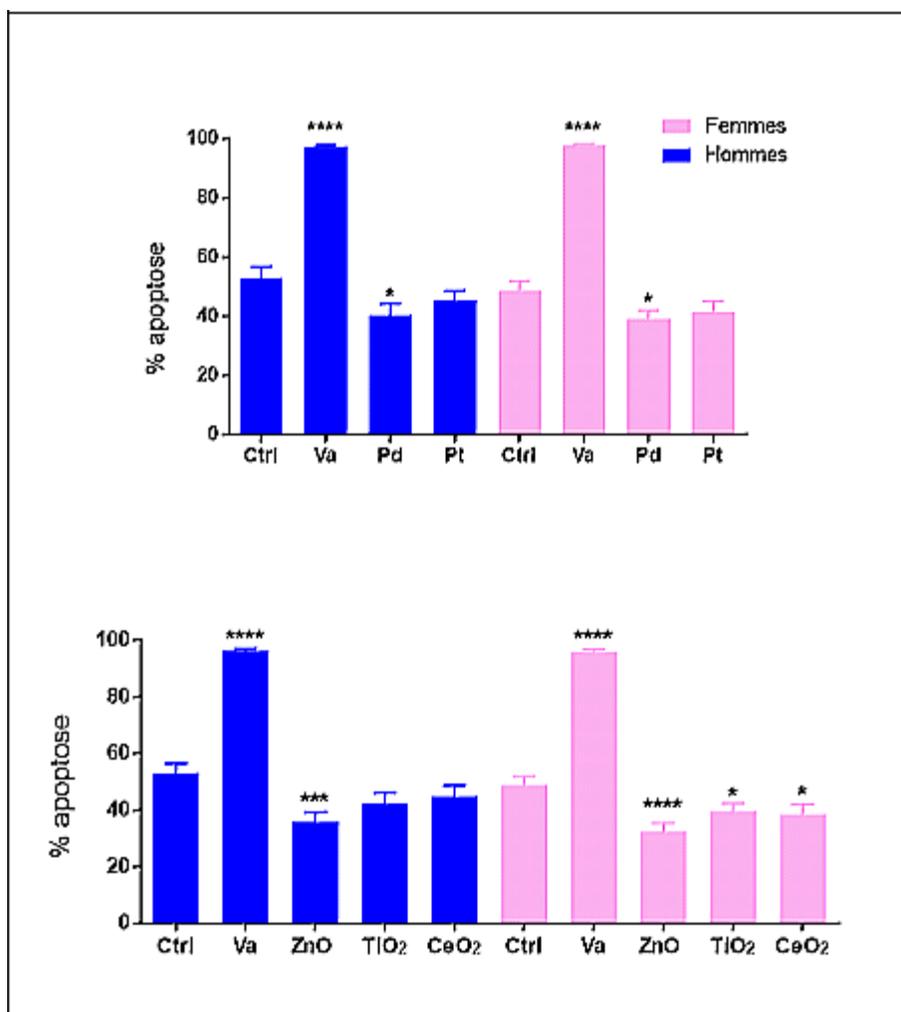


Figure 4.2 Effet anti-apoptotique des NP et variabilité en fonction du sexe chez l'humain.

Les neutrophiles fraîchement isolés à partir de donneurs femmes ou hommes, ont été incubés en présence du tampon (Ctrl) ou des NP indiquées à 100 µg/ml pour une période de 24 h, tels que décrits dans la section « Matériels et méthodes ». Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules en apoptose et représentent les moyennes ± SEM (n≥15 par sexe). L'agent pro-apoptotique VAA-I (Va) a été utilisé comme témoin positif de l'apoptose.

4.1.2. Retard apoptotique indépendant de la libération des ROS

Afin d'évaluer l'effet de chaque NP testée sur la libération des ROS en fonction du sexe, une cinétique allant de 5 à 60 minutes du niveau de fluorescence émise par une sonde H₂DCFDA au contact

des neutrophiles sous différentes conditions a été réalisée. Les résultats statistiques obtenus avec un minimum de quinze donneurs par sexe et par NP sont présentés à la Figure 4.3 pour des périodes d'incubation de 5, 15, 30 et 60 minutes. Comme le montre ces résultats, un effet significatif n'est obtenu qu'en présence du témoin positif (H_2O_2) et pour les deux sexes. Cet effet augmente graduellement avec le temps et atteint le niveau de saturation au bout d'une heure. Aucune libération des ROS n'a donc été observé pour les NP testées dans ce projet, aussi bien chez l'homme que chez la femme (voir Figure 4.3).

De façon général, l'effet anti-apoptotique des NP à l'instar de ZnO, n'est pas associé à une flambée oxydative (Goncalves D.M. et Girard D., 2014) et cela concorde bien avec nos résultats. Cependant, les résultats obtenus avec CeO_2 NP et TiO_2 NP étaient contraires à ceux déjà publiés dans la littérature (Lavastre V. et al., 2015), aucune augmentation des ROS n'a été observé. Les taux basaux sont sensiblement les mêmes et ils ont tendance à s'équilibrer entre les deux sexes avec le temps. Par ailleurs, les femmes ont montré une sensibilité ainsi qu'une fluorescence supérieure à celle des hommes en réponse au témoin positif, ici le peroxyde d'hydrogène.

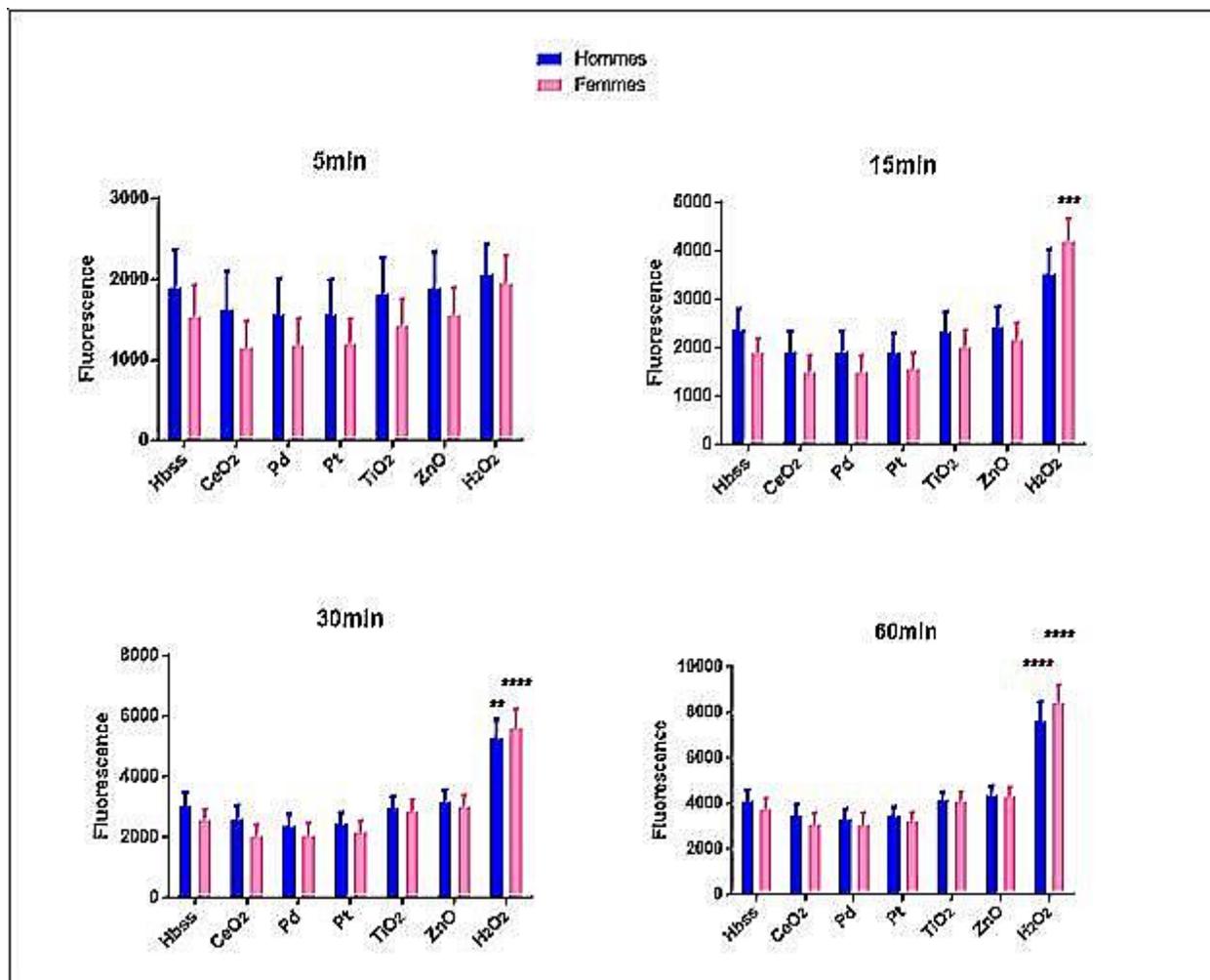


Figure 4.3 Effets des NP sur la production des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS).

Les neutrophiles hommes ou femmes ont été incubés en présence de 100 µg/ml des NP indiquées pour une période allant de 5 à 60 minutes. La production de ROS a été déterminée au spectromètre grâce à l'intensité de la fluorescence émise par la sonde H₂DCFDA. Les résultats sont exprimés en fluorescence (n≥15 par sexe). Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) a été utilisé comme témoin positif de la libération des ROS.

4.2. QUANTIFICATION DES CYTOKINES: LA RÉPONSE INFLAMMATOIRE SERAIT PLUS ÉLEVÉE CHEZ LES FEMMES

Le taux de cytokines libérées par les neutrophiles en présence des NP est différent chez l'homme et chez la femme (Figure 4.4). L'IL-8 et IL-1 β semblent plus fortement exprimés chez les femmes tandis que les deux autres cytokines testées, à savoir TNF et IL-6, seraient présents surtout chez les hommes. Le taux de cytokines libérées par les neutrophiles en présence des NP varie aussi en fonction la NP. Avec ZnO particulièrement, on a observé une tendance à augmenter la libération d'IL-8 chez les deux sexes mais de façon plus importante chez les femmes tandis qu'avec CeO₂ on a noté une forte libération d'IL-1 β chez les femmes uniquement. De façon générale, la quantification des cytokines libérées en réponse au témoin positif (GMCSF ou LPS) chez les femmes, s'est révélée toujours plus importante que celle observée chez les hommes (à l'exception de l'IL-1 β). Les femmes pourraient donc être plus sensibles que leur homologue homme dans leur réponse inflammatoire. Il se pourrait aussi que leur régulation se fasse différemment, c'est-à-dire avec par exemple un lot de cytokines différent pour chacun des sexes comme c'est le cas ici (voir Figure 4.4). Contrairement à la littérature on n'a pas noté une libération significative d'IL-8 avec la NP de TiO₂ (Goncalves D.M. et al., 2010). Toutefois, les NP testées précédemment dans la littérature ne provenaient pas de la même compagnie que celles qu'on a eu à utiliser dans cette étude. Certaines caractéristiques physico-chimiques différentes pourraient donc expliquer cette divergence.

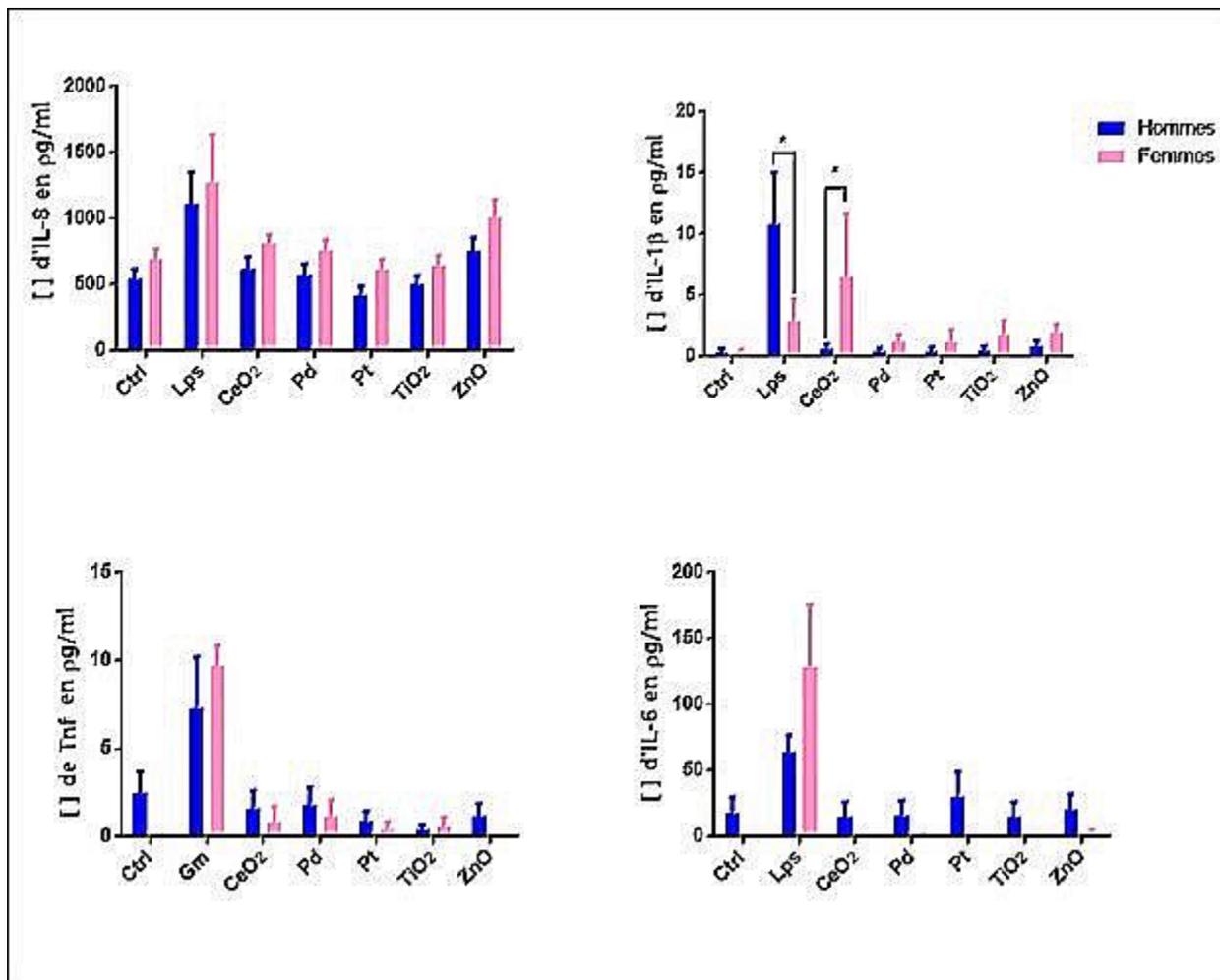


Figure 4.4 Effet variable des NP sur la production des cytokines et en fonction du sexe chez l'humain.

Après 24h d'incubation à 37°C, les surnageants de neutrophiles stimulés ont été récupérés et utilisés par la suite pour faire des tests ELISA afin de quantifier quatre cytokines pro-inflammatoires soient IL-8, IL-6, TNF et IL-1 β . Les données sont présentées sous forme de moyennes \pm SEM (n \geq 12 par sexe). Les témoins positifs sont GMCSF (Gm) une cytokine anti-apoptotique et LPS une molécule pro-inflammatoire présente chez les bactéries.

4.3. MIGRATION ET ADHÉSION DU NEUTROPHILE AU FOYER INFLAMMATOIRE

4.3.1. Les NP induisent la migration des neutrophiles humains de façon variable selon le sexe

Le tactisme (ou taxie) est le déplacement orienté d'un organisme ou d'une cellule vivante lié à un stimulus extérieur. On parle de chimiotactisme lorsque ce stimulus est une espèce chimique présente dans l'environnement. Dans cette étude, nous étions les premiers à tester la capacité des NP de ZnO, CeO₂, Pd, Pt et TiO₂ à attirer les neutrophiles humains. Les résultats présentés à la Figure 4.5 nous montrent que toutes ces NP à l'exception de Pt ont pu augmenter significativement le flot migratoire des neutrophiles. Bien que ce phénomène se soit manifesté autant chez les hommes que chez les femmes, l'intensité n'était pas la même entre les deux. Pour les NP de Pd et TiO₂ le chimiotactisme était plus important chez les hommes et chez les femmes respectivement. Il n'y a pas vraiment d'explication logique à cela mais dans une autre étude faite avec les NP d'or, le même phénomène avait été observé sans que le sexe des donneurs ne soit pour autant spécifié (Durocher I et al., 2017). Par ailleurs, la platine (Pt) est la seule parmi les NP testées à n'avoir pas présenté d'effet chimioattractant sur les neutrophiles; c'est également la seule à ne pas retarder leur entrée en apoptose (voir Figure 4.1). Cela nous laisse penser que les deux phénomènes pourraient être liés de sorte que les neutrophiles vivants produiraient davantage de chimiokines pour attirer davantage de neutrophiles au site inflammatoire.

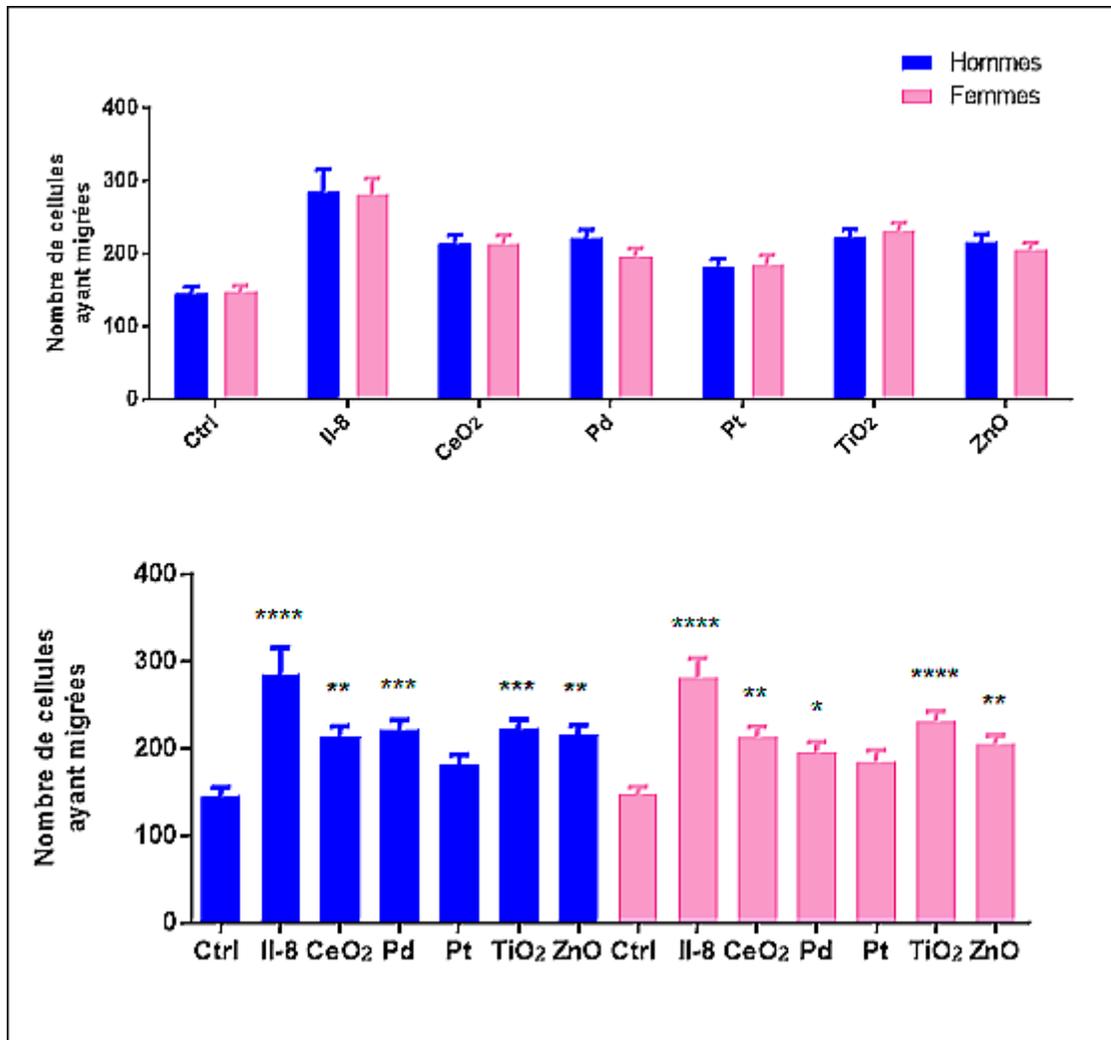


Figure 4.5 Attraction des neutrophiles par certaines NP en fonction du sexe chez l'humain.

Des neutrophiles fraîchement isolés de donneurs homme ou femme ont été incubés à 37° C avec 200 ng/ml d'IL-8 et 100 µg/ml des NP indiquées pendant 60 min. La chimiotaxie a été déterminée tel que décrit dans la section « Matériels et méthodes ». Les résultats sont exprimés en nombre de cellules ayant migrées de cinq champs représentatifs au microscope optique. Ce sont des moyennes ± SEM (n≥15 par sexe).

4.3.2. Les NP induisent l'adhésion des neutrophiles humains de façon variable selon le sexe

L'adhésion des neutrophiles sur des cellules endothéliales lors d'une réponse inflammatoire médiée par les NP est une fonction qui n'a jamais été étudiée chez l'humain. Nous étions donc les premiers à le faire. Cette étude a été faite sur une lignée de cellules endothéliales, la lignée EA.hy926 et les neutrophiles colorées à la calcéine AM sont facilement visibles et dénombrables au microscope à fluorescence (Figure 4.6).

Chez les éosinophiles cependant, cette fonction a déjà été bien caractérisée et ce pour la totalité des NP testées. Le sexe des donneurs n'ayant toujours pas été pris en compte, les NP étaient capable augmenter l'adhésion cellulaire des éosinophiles humains (Marion-Murphy M. et Girard D., 2017). En prenant en considération le sexe dans le présent projet, l'on a pu constater que chez le neutrophile aussi et pour trois des NP testées soient Pt, TiO₂ et ZnO, il y'a une certaine tendance à faire augmenter l'adhésion cellulaire dans l'un comme l'autre des deux sexes. On note cette tendance avec PdNP particulièrement chez les hommes. À noter que la réponse au témoin positif (ici TNF), reste toujours plus importante pour le sexe féminin (voir Figure 4.7). Bien qu'il n'y ait pas encore eu d'études pour l'effet des NP sur cette fonction du neutrophiles, les résultats obtenus demeurent très semblables à ceux qui avaient déjà été observés avec les éosinophiles.

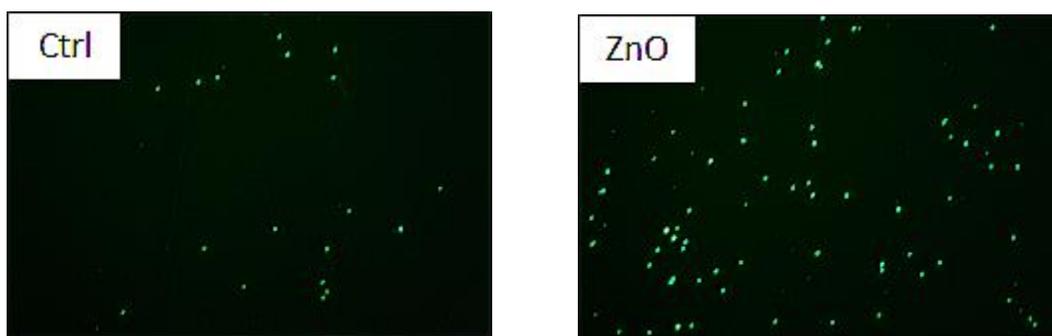


Figure 4.6 Photos de neutrophiles marqués à la calcéine-AM et visibles au microscope à fluorescence.

Les neutrophiles ont été incubés 30 min en présence du tampon (Ctrl) ou d'une des NP testées (ici ZnO). Les neutrophiles ont ensuite été marqués à la calcéine-AM tel que décrit précédemment. Les images illustrent le type de résultats observables sous le microscope à fluorescence où chacun des points verts représente une cellule neutrophile adhérente aux cellules EA.hy926 (non visibles en fluorescence). Les NP de ZnO induisent donc l'adhésion neutrophiles sur les cellules endothéliales EA.hy926.

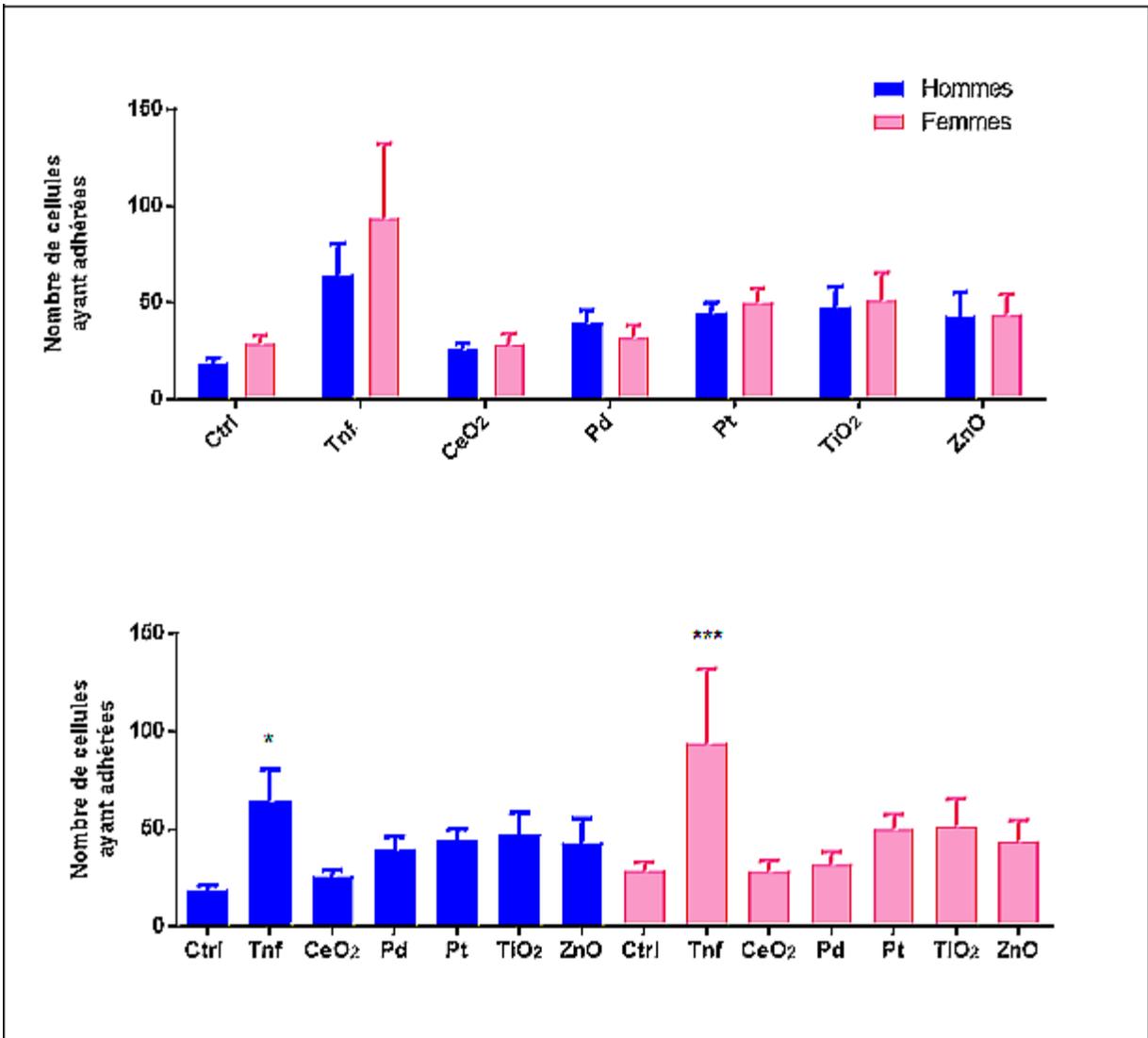


Figure 4.7 Certaines NP augmentent l'adhésion des neutrophiles de façon variable et selon le sexe des donneurs.

Les neutrophiles fraîchement isolés, ont été incubés en présence du tampon (Ctrl), des cytokines TNF (témoin positif) ou des NP indiquées pour une période de 30 minutes. Par la suite, les cellules ont été marquées avec la calcéine-AM et leur capacité à adhérer aux cellules EA.hy926 a été déterminée au microscope à fluorescence. Les résultats sont exprimés en nombres de cellules ayant adhéré et représentent les moyennes \pm SEM ($n \geq 10$ par sexe).

4.4. DES BIAIS SEXUELS PEUVENT INTERVENIR DANS LA RÉPONSE INFLAMMATOIRE DES NEUTROPHILES CHEZ L'HUMAIN

D'après les résultats qu'on a obtenus précédemment, il se pourrait bel et bien qu'il existe un biais sexuel dans chacune des fonctions du neutrophiles étudiées à savoir : l'apoptose, la libération des cytokines, le chimiotactisme, l'adhésion cellulaire et la libération des ROS. Ces dernières constituent des étapes importantes dans la réaction inflammatoire de l'organisme tout entier et cela pourrait impacter significativement la santé des personnes exposées aux NM. Bien que le dimorphisme sexuel demeure encore un sujet très négligé, quelques données en littérature viennent corroborées avec les résultats obtenus dans ce projet (voir Tableau 4.1).

Tableau 4.1 Effets des NP sur différentes fonctions du neutrophile en fonction du sexe des donneurs

NP \ Fonction	CeO ₂		Pd		Pt		TiO ₂		ZnO	
Apoptose	↓	×	↓	↓	×	×	↓	×	↓	↓
Libération de cytokines	IL-8, IL-1β					IL-6, TNF				
Chimiotactisme	↑	↑	↑	↑	×	×	↑	↑	↑	↑
Adhésion cellulaire	×	×	×	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Libération des ROS	×									

* La longueur proportionnelle à l'intensité

Femmes
 Hommes
 ↓ Baisse
 ↓ Forte baisse
 ↑ Augmentation
 ↑ Forte augmentation
 × Aucun effet
 ✓ Faible augmentation non significative
 ✓ Forte augmentation non significative

4.4.1. Rôles des hormones sexuelles sur l'activité neutrophilique

Les neutrophiles tout comme plusieurs autres cellules du système immunitaire, sont capables d'exprimer les récepteurs de l'œstrogène (ER) et de l'androgène (AR) chez l'humain. Par ailleurs, des différences selon le sexe, dans leur nombre ainsi que leurs fonctions ont été signalées. Dans une étude faite avec vingt-six (26) hommes et vingt-six (26) femmes, les chercheurs démontrent que les neutrophiles isolés des donneurs féminins rentrent en apoptose au bout de 24 h, mais significativement moins que ceux provenant des donneurs masculins (Molloy EJ et al., 2003). Dans cette étude, les chercheurs montrent aussi que le nombre de neutrophiles augmente pendant la grossesse et la phase lutéale du cycle menstruel. Ce qui suggère que des niveaux plus élevés de progestérone ou d'œstrogène favoriseraient leur augmentation en nombre. En effet, l'œstradiol et la progestérone contribuent au retard apoptotique des neutrophiles en diminuant l'expression d'une protéine pro-apoptotique, la caspase 3. Dès lors, lorsque ces hormones sont rajoutées *in-vitro* aux neutrophiles, elles ont tendance à égaliser le degré d'apoptose entre les sexes.

Notons que dans les résultats que nous avons obtenus, CeO₂NP et de TiO₂NP ont provoqué un retard apoptotique des neutrophiles uniquement chez les femmes et avec ZnONP, l'effet anti-apoptotique était nettement supérieure chez ces dernières. Ces résultats s'accordent parfaitement avec le fait que les neutrophiles provenant de donneurs féminins en bonne santé montrent *in-vitro* une survie améliorée comparativement à ceux de leurs semblables masculins.

D'autres études ont montré que les hormones sexuelles pouvaient moduler la fonction des neutrophiles *in-vitro* chez l'humain et *in-vivo* chez la souris. Cela comprend la chimiotaxie, la production d'oxyde nitrique et de superoxyde. Ces hormones régulent également l'homéostasie et des souris déficientes en récepteur de l'androgène présentent un nombre extrêmement réduit de neutrophiles et de précurseurs de neutrophiles dans moelle osseuse. L'AR serait essentiel pour l'activation de l'ERK induite par GM-CSF afin de permettre une prolifération granulocytaire ultérieure (Chuang KH. et al., 2009). L'œstradiol chez des souris ovariectomisées permet également d'augmenter le taux de chimiokines libérées par les neutrophiles (Dionne P. et al., 2014).

Par ailleurs, plusieurs cytokines pro-inflammatoires ont la capacité d'être régulé par les hormones sexuelles mais cette régulation demeure très complexe. L'œstrogène régule à l'inverse la production d'IL-12, d'IL-6 et d'IL-1 β , ce qui signifie que ces cytokines auront tendance à augmenter dans le milieu lorsque le niveau d'œstrogène environnant diminue et à diminuer lorsque celui-ci augmente. La testostérone

quant à elle diminue aussi la production de certaines cytokines pro-inflammatoires soit l'IFN- γ et TNF, mais à l'inverse augmente la production de l'IL-10 qui est une cytokine anti-inflammatoire. Il a été aussi démontré que l'œstrogène pouvait agir comme un promoteur de l'IL-10 en phase 2 de l'inflammation (Ray J.L. et al., 2019).

En ce qui concerne la régulation des ROS par les hormones sexuelles, les données semblent parfois contradictoires et varient d'un tissu à l'autre. L'œstrogène par exemple, est largement connu pour ses propriétés antioxydantes au niveau des lipoprotéines de basse densité (LDL). Celle-ci intervient également chez les neutrophiles où avec d'autres hormones sexuelles à savoir le cortisol, la progestérone ainsi que la testostérone, elles seraient capables de diminuer la production d'anion super oxydes dans les cellules (Békési G. et al., 2000). Les schémas d'expression des récepteurs peuvent également être à l'origine des effets des hormones sexuelles sur le nombre et la réponse fonctionnelle des cellules immunitaires innées. Certaines cellules innées matures n'expriment apparemment pas des niveaux significatifs de ces récepteurs, peuvent toujours fonctionner différemment entre les sexes en raison de l'empreinte épigénétique des précurseurs du développement ou parce que leurs réponses sont influencées indirectement par le biais d'autres types de cellules répondant aux hormones sexuelles (monocytes, macrophage, cellules NK). La manipulation expérimentale des niveaux ou des récepteurs des hormones sexuelles a révélé que l'activité des récepteurs des hormones sexuelles sous-tend souvent les différences sexuelles dans le nombre de cellules immunitaires et / ou leurs réponses fonctionnelles dans les voies respiratoires (Kadel S. et Kovats S., 2018). Malheureusement, peu d'études sur les cellules immunitaires dans les tissus ont mis en corrélation les niveaux tissulaires d'hormones sexuelles avec la fonction immunitaire.

4.4.2. L'exemple de certains virus respiratoires

Les neutrophiles sont le type de cellule innée infiltrant prédominant lors d'une infection virale respiratoire chez l'homme et la souris. Les neutrophiles interviennent dans la défense antivirale via leur production de cytokines pro-inflammatoires et d'espèces réactives de l'oxygène. Leur rôle dans l'infection virale respiratoire reste incertain, car ils provoquent une pathologie et une sensibilité aux infections secondaires chez la souris. Conformément à la régulation du nombre de neutrophiles par la signalisation AR, la sensibilité accrue des souris mâles à l'infection par le SARSr-CoV (virus causant les syndromes respiratoires aigus sévère), a été associée à une accumulation accrue de neutrophiles dans les poumons

(Kadel S. et Kovats S., 2018). Le nombre de neutrophiles et la formation de pièges extracellulaires de neutrophiles (NET) sont directement en corrélation avec la gravité de l'infection par le VRS (virus respiratoire syncytial). Par ailleurs, le traitement à l'œstradiol des femelles ovariectomisées a élevé le niveau de chimioattracteurs des neutrophiles et le recrutement de neutrophiles dans les poumons, augmentant ainsi la protection contre l'infection à l'IAV (virus de la grippe A) (Dionne P. et al., 2014).

Les différences selon le sexe dans l'incidence et la gravité des infections respiratoires notamment par les virus sont largement documentées chez l'homme et les modèles murins et sont en corrélation avec des biais sexuels en nombre et / ou en réponses fonctionnelles des cellules immunitaires innées, aussi bien dans l'homéostasie que dans l'infection pulmonaire. Il existe des différences entre les sexes dans les réponses immunitaires innées pendant les phases effectrice et réparatrice de l'infection par le virus respiratoire. Dans ces deux phases, on note des différences en termes de cytokines pro-inflammatoires, cytokines régulatrices et chimiokines libérées. Les femmes, en effet, ont généralement une phase effectrice et réparatrice plus efficace que celle des hommes. Une réponse immunitaire équilibrée de type 1 implique différentes cellules immunitaires innées nécessaires au début de la post-infection pulmonaire pour la clairance virale. Ensuite aux stades ultérieurs de l'infection, les réponses immunitaires régulatrices médiées par les macrophages alvéolaires et les cellules lymphoïdes innées sont importantes pour la réparation des tissus endommagés et le renouvellement de l'intégrité de la barrière. Une réponse inflammatoire forte et efficace devrait donc permettre d'éliminer le virus et de réparer le tissu lésé (Kadel S. et Kovats S., 2018).

L'une des différences les plus frappantes entre les sexes en ce qui concerne les conséquences des virus respiratoires est leur taux de mortalité. Encore récemment avec la pandémie COVID-19, des études statistiques révèlent que les hommes meurent deux fois plus que les femmes. Ce même phénomène est observé aussi bien aux États-Unis, qu'en Europe, en Chine et partout ailleurs (Jian-Min Jin et al., 2020). Ces statistiques sont en accord avec plusieurs observations montrant que les femmes développent une bien meilleure réponse immunitaire que les hommes face à la plupart des agents infectieux, par exemple contre les virus du VIH et des hépatites B et C. Les études montrent que les cellules immunitaires des femmes répondent plus rapidement et plus fortement aux attaques virales, notamment en produisant de plus grandes quantités d'interférons (une classe de protéines qui empêchent les virus de se reproduire dans nos cellules) et plus d'anticorps neutralisant les agents infectieux. La production d'hormones sexuelles féminines (œstrogènes) augmente aussi la production de molécules antivirales par les cellules immunitaires et contribuent ainsi à optimiser leur réponse face aux agents infectieux. À l'opposé, chez les hommes, la testostérone masculine possède une action anti-inflammatoire qui atténue encore davantage

l'activité du système immunitaire et les rend plus vulnérables. Le seul point sombre de cette supériorité immunitaire des femmes est de les rendre les plus susceptibles à développer des maladies inflammatoires ou auto-immunes telles que la sclérose en plaques, l'arthrite rhumatoïde ou encore le lupus (paru dans *Journal de Montréal* le 11 Avril 2020). Le taux plus élevé de mortalité des hommes dans l'épidémie de la COVID-19 actuelle n'est pas une anomalie, mais reflète plutôt une réalité biologique implacable : en termes de survie biologique et de complications graves, les hommes et les femmes ne sont pas tous égaux. Dans le passé déjà, le syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS) et le syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS), eux aussi causés par des coronavirus, avaient également affecté de manière disproportionnée les hommes. Maintenant le dimorphisme sexuel se voit de plus en plus flagrant autour de nous et demande plus d'attention de notre part. Les facteurs sociaux-économiques, culturels et autres ne peuvent pas tout expliquer et une composante biologique semble vraisemblablement y être rattachée.

Chapitre 5

CONCLUSION

Les différences notées entre les sexes sont généralement associées aux profils hormonaux endogènes mais pourraient également être liés à des différences anatomiques et même chromosomiques. La présence de deux chromosomes X chez les femmes améliorerait leur réponse immunitaire car de nombreux gènes qui régulent le système immunitaire sont codés par ceux-ci. Il serait donc possible que certains gènes impliqués dans la réponse immunitaire soient plus actifs chez les femmes comparativement aux hommes. D'autre part, la plasticité ou le volume des organes pourraient également jouer un rôle dans cette disparité sexuelle, notamment en ce qui concerne les poumons lors des affections respiratoires. La taille des poumons et des voies respiratoires ne sont pas directement proportionnelles et on ne peut pas supposer que des poumons plus gros équivalent à diamètre des voies aériennes plus grand. Par conséquent, bien que la taille absolue des voies respiratoires féminines soit plus petite, elles sont proportionnellement plus grandes que celles des hommes (Sathish et Prakash, 2016). Quoi qu'il en soit, le développement proportionnel des poumons féminins entraîne une diminution de la résistance des voies aériennes et une augmentation des débits expiratoires, ce qui les rend naturellement adapté pour une meilleure fonction pulmonaire que ceux des hommes.

Tel que mentionné à la section précédente, lorsque les données sont suffisantes, il est possible de déterminer quantitativement les risques. En revanche, lorsque les données sont moins certaines ou incomplètes, il est préférable de faire une évaluation qualitative ou semi-quantitative des risques et d'adopter une approche préventive. La gestion graduée des risques (Control Banding ou CB) représente actuellement l'approche la plus souvent préconisée pour l'évaluation des risques liés aux NM (Ostiguy C. et al., 2014). Cet outil, dont l'application requiert une expertise en évaluation et en gestion des risques chimiques, permet de hiérarchiser les risques par poste de travail et de prioriser les actions minimales de prévention à mettre en place. Parmi les paramètres normalement considérés sont la dimension, la morphologie, la composition chimique, la solubilité, la toxicité et la quantité de nanomatériaux mise en œuvre, de même que le potentiel d'empoussièrement ou d'aérosolisation d'un NM pulvérulent, le nombre de travailleurs concernés et la durée des opérations. Les connaissances sur les dangers et les niveaux d'exposition étant en constante évolution, il est important de réactualiser régulièrement les informations disponibles, réévaluer le niveau de risque et améliorer continuellement le programme et la démarche de prévention sur la base de nouvelles données. La diminution graduelle du niveau d'incertitude avec

l'acquisition de nouvelles données permettra de tendre vers une évaluation de plus en plus quantitative des risques. Dans les études de toxicité associées aux NPs, nous pensons qu'il serait important de prendre désormais en considération d'autres facteurs tels que le sexe et l'âge. En effet, il est difficile de dissocier les effets du sexe de ceux de l'âge car le niveau d'hormone change considérablement avec l'âge. Ensuite le nombre d'échantillons : un plus grand nombre d'échantillons devrait être utilisé lors des études de toxicologie. Les variations humaines, le mode de vie, l'alimentation ou même encore la prise de contraceptif oraux pourraient être de nombreux biais dans les petits échantillons. Ici nous nous sommes fixés comme base n=15 donneurs minimalement par sexe. Enfin, nous préconisons l'utilisation de neutrophiles humains fraîchement isolés tel que nous l'avons fait dans ce projet et qui s'avère être un bon modèle d'étude pour le dimorphisme sexuel.

Les études épidémiologiques sur l'homme et des modèles expérimentaux avec des rongeurs montrent qu'il est difficile d'arriver à un paradigme universel concernant les effets du sexe ou des hormones sexuelles sur les réponses immunitaires aux virus respiratoires. L'hypothèse émise serait que les différences entre les sexes dans les résultats de l'infection peuvent être fonction de la force de la réponse immunitaire mais aussi des dommages qui en résultent sur les tissus hôtes. Dans ce modèle, un biais de risque masculin se produit lorsque de faibles réponses immunitaires sous-tendent des dommages importants à l'hôte, tandis qu'un biais de risque féminin se produit lorsque de fortes réponses immunitaires favorisent des dommages à l'hôte. Selon le rôle de l'hormone sexuelle dans la promotion ou l'inhibition de l'inflammation ou de l'immunité, des différences sexuelles peuvent survenir en raison de la prédominance ou de l'absence d'œstrogène ou d'androgène dans un sexe. Par conséquent, toutes les conclusions des études de toxicité chez l'humain devraient être faites avec prudence. Nous avons montré à travers nos résultats et ceux retrouvés dans la littérature qu'il existait un biais sexuel associés à différentes fonctions du neutrophile. Toutefois, il serait intéressant de vérifier dans un futur proche la réponse inflammatoire liée au sexe dans un organisme vivant entier, par exemple le modèle de la poche d'air chez les souris (Girard D., 2014). Des études mécanistiques pour mieux comprendre l'implication des hormones dans la toxicité des NP seraient également requises. En effet, on envisage que des fluctuations hormonales pendant le cycle de reproduction des femelles pourraient éventuellement contribuer à des écarts dans les données que nous avons obtenus. De plus notre échantillon de donneurs bien que très grand reste limité au Centre de recherche dans lequel nous nous situons. Les résultats peuvent extrêmement varier d'une entreprise à l'autre, en fonction des NM utilisés, du degré d'exposition des travailleurs et d'une multitude d'autres facteurs. Il est donc important que les entreprises prennent conscience de ce risque et qu'une sensibilisation générale devienne effective. Essayer de comparer les

différences de sexe entre des études distinctes est difficile en raison des nombreux facteurs expérimentaux et biologiques que nous avons cité précédemment. Une évaluation plus complète des maladies humaines et des études mécanistes sur les animaux sont nécessaires pour clarifier les biais sexuels potentiels dans les pathologies médiées par les NP. Par ailleurs, l'évaluation des risques est un élément majeur du programme de prévention et l'ensemble des mesures de prévention à implanter découlera directement de cette évaluation des risques. Ce projet apporte donc des informations et des recommandations supplémentaires pour la prise en charge et la maîtrise des facteurs de risque, le but étant de prévenir la survenue d'accidents ou le développement de maladies professionnelles liées aux NP dans certains métiers à risque. Ces connaissances pourraient également servir au niveau des législations quand on sait que certains NPs telles que TiO_2 déjà bannit en France pour ses effets néfastes sur la santé reste encore utilisée au Québec. On espère finalement améliorer les formulaires d'évaluation et de sensibilisation à envoyer aux entreprises afin de promouvoir les dons de sang pour la recherche scientifique. La suite consistera à étudier d'autres fonctions du neutrophile et à étudier l'effet des NP sur les éosinophiles. Nous envisageons aussi tester plus en détail les mécanismes cellulaires pouvant être impliqués dans ces effets toxiques comme par exemple la synthèse de novo et la voie des MAPK.

LISTES DE RÉFÉRENCES

Beard J. D., Erdely A., Dahm M. M., de Perio M. A., Birch M. E., Evans D. E., Schubauer-Berigan M. K. (2018). Carbon nanotube and nanofiber exposure and sputum and blood biomarkers of early effect among U.S. workers. *Environment International*; 116: 214–228.

Beckett W. S., Chalupa D. F., Pauly-Brown A., Speers D. M., Stewart J. C., Frampton M. W., Oberdörster G. et al. (2005). Comparing inhaled ultrafine versus fine zinc oxide particles in healthy adults. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*; 171(10): 1129–1135.

Békési, G., Kakucs, R., Várbíró, S., Rácz, K., Sprintz, D., Fehér, J., & Székács, B. (2000). In vitro effects of different steroid hormones on superoxide anion production of human neutrophil granulocytes. *Steroids*; 65(12): 889–894. doi:10.1016/s0039-128x(00)00183-5.

Bhattacharya K., Davoren M., Boertz J., Schins R.P., Hoffmann E., Dopp E. (2009) Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress and DNA-adduct formation but not DNA-breakage in human lung cells. *Part Fibre Toxicol*; 6:192-204.

Boulanger G., Andujar P., Pairon J.-C., Billon-Galland M.-A., Dion C., Dumortier P., Jaurand M.-C. et al. (2014). Quantification of short and long asbestos fibers to assess asbestos exposure: A review of fiber size toxicity. *Environmental Health*; 13, 59.

Braydich-Stolle L., Hussain S., Schlager J.J. et Hofmann M.C. (2005) In Vitro Cytotoxicity of Nanoparticles in Mammalian Germline Stem Cells. *Toxicol Sci*; 88(2): 412–419.

Calippe B., Douin-Echinard V., Delpy L., Laffargue M., Lélou K., Krust A., Gourdy P. et al. (2010). 17 β -estradiol promotes TLR4-triggered Proinflammatory mediator production through direct estrogen receptor α signaling in macrophages *in vivo*. *The Journal of Immunology*; 185(2): 1169–1176.

Calippe B., Douin-Echinard V., Laffargue M., Laurell H., Rana-Poussine V., Pipy B., Gourdy P. (2008). Chronic estradiol administration *in vivo* promotes the Proinflammatory response of macrophages to TLR4 activation: Involvement of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *The Journal of Immunology*; 180(12): 7980–7988.

Chen L., Yokel R.A., Hennig B., Toborek M. (2008) Manufactured aluminum oxide nanoparticles decrease expression of tight junction proteins in brain vasculature. *Journal of neuroimmuno pharmacology*; 3(4):286–295.

Chen, Zhou, Dong et Qu (2020) Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *The Lancet*; 395 (10223): 507–513.

Chhay P., Murphy-Marion M., Samson Y., Girard D. (2018). Activation of human eosinophils with palladium nanoparticles (Pd NPs): importance of the actin cytoskeleton in Pd NPs-induced cellular adhesion. *Environmental Toxicology and Pharmacology*; 57: 95-103.

Cho W.S., Duffin R., Howie S.E., Scotton C.J., Wallace W.A., Macnee W., Bradley M., et al. (2011) Progressive severe lung injury by zinc oxide nanoparticles: the role of Zn²⁺ + dissolution inside lysosomes. *Part Fibre Toxicol*; 8:27.

Chuang KH., Altuwajiri S., Li G., Lai J.J., Chu CY., Lai KP., Lin HY., Hsu JW., Keng P., Wu M.C. et Chang C. (2009) Neutropenia with impaired host defense against microbial infection in mice lacking androgen receptor. *J Exp Med*; 206(5): 1181–1199.

Corberand MD J., Ngyen F., Laharrague MD P., Fontanilles A.M., Gleyzes B., Gyrard E., Senegas C. (1981) Polymorphonuclear Functions and Aging in Humans. *Journal of American Geriatrics Society*. 29 (9): 391-397.

Dionne P. Robinson, Olivia J. Hall, Tricia L. Nilles, Jay H. Bream et Sabra L. Klein. (2014) 17 β -Estradiol Protects Females against Influenza by Recruiting Neutrophils and Increasing Virus-Specific CD8 T Cell Responses in the Lungs. *Pathogenesis and Immunity*. DOI: 10.1128/JVI.02081-13.

Dong M. S., Choi J.-Y., Sung J. H., Kim J. S., Song K. S., Ryu H. R., Yu I. J. et al. (2013). Gene expression profiling of kidneys from Sprague–Dawley rats following 12-week inhalation exposure to silver nanoparticles. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 23(6), 437–448.

Durocher I, Girard D. (2016) In vivo proinflammatory activity of generations 0-3 (G0-G3) polyamidoamine (PAMAM) nanoparticles. *Inflamm Res*;65(9):745-55.

Durocher I., Noël C., Lavastre V., Girard D. (2017) Evaluation of the *in vitro* and *in vivo* proinflammatory activities of gold (+) and gold (-) nanoparticles. *Inflamm Res*; 66: 981-992.

Elgrabli D., Lacroix G. (2009) Toxicité des nanoparticules : cas des nanotubes de carbone. *Congrès International pluridisciplinaire QUALITA 2009, Besançon, France*. pp.NC. ineris00973334.

Falagas M. E., Mourtzoukou E. G. et Vardakas K. Z. (2007). Sex differences in the incidence and severity of respiratory tract infections. *Respiratory Medicine*; 101(9), 1845–1863.

Fedulov A. V., Leme A., Yang Z., Dahl M., Lim R., Mariani T. J. et Kobzik L. (2008). Pulmonary exposure to particles during pregnancy causes increased neonatal asthma susceptibility. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*; 38(1), 57–67.

Foldbjerg R., Dang D.A., Autrup H. (2011) Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. *Archives of toxicology*; 85(7):743–750.

Fuentes N., et Silveyra P. (2018). Endocrine regulation of lung disease and inflammation. *Experimental Biology and Medicine*; 243(17–18): 1313–1322.

Fuentes N., Roy A., Mishra V., Cabello N. et Silveyra P. (2018). Sex-Specific microRNA Expression Networks in an Acute Mouse Model of Ozone-Induced Lung Inflammation. *Biology of Sex Differences*; 9, 9. doi: 10.1186/s13293-018-0177-7.

Marion-Murphy M. et Girard D., (2017) Activation des éosinophiles humains par des nanoparticules. *IRSST, Prévention des risques chimiques et biologiques, Études et recherches, Rapport scientifique R-990*; pp 38.

Girard D. (2014) Using the air pouch model for assessing *in vivo* inflammatory activity of nanoparticles. *Int J. Nanomedicine*; 9: 1105-1109.

Goncalves D.M. et Girard D. (2014) Zinc oxide nanoparticles delay human neutrophil apoptosis by a de novo protein synthesis-dependent and reactive oxygen species-independent mechanism. *Toxicol in vitro*; 28(5): 926-931.

Gonçalves D.M., Liz R., Girard D. (2011). Activation of neutrophils by nanoparticles. *The Scientific World Journal*; 11: 1877-1885.

Guan R., Kang T., Lu F., Zhang Z., Shen H., Liu M. (2012) Cytotoxicity, oxidative stress, and genotoxicity in human hepatocyte and embryonic kidney cells exposed to ZnO nanoparticles. *Nanoscale research letters*;7(1):602–607.

Haji Bahadar, Faheem Maqbool, Kamal Niaz et Mohammad Abdollahi (2016) Toxicity of Nanoparticles and an Overview of Current Experimental Models. *Iran Biomed J*; 20(1): 1–11.

Hashem M.M., Abo-El-Sooud K., Abd-Elhakim Y.M., Badr Y.A., El-Metwally A.E., Bahy-El-Dien A. (2020). The long-term oral exposure to titanium dioxide impaired immune functions and triggered cytotoxic and genotoxic impacts in rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*; 60.

Hussain S., Vanoirbeek J. A. J., Luyts K., Vooght V. D., Verbeken E., Thomassen L. C. J., Hoet P. H. M. et al. (2011). Lung exposure to nanoparticles modulates an asthmatic response in a mouse model. *European Respiratory Journal*; 37(2), 299–309.

Iavicoli I., Leso V., Beezhold D.H., Shvedova A.A. (2017) Nanotechnology in agriculture: Opportunities, toxicological implications, and occupational risks. *Toxicology and Applied Pharmacology*; 329 (15): 96-111.

Jian-Min Jin, Peng Bai, Wei He, Fei Wu, Xiao-Fang Liu, De-Min Han, Shi Liu et Jin-Kui Yang (2020) Gender Differences in Patients With COVID-19: Focus on Severity and Mortality. *Front. Public Health*; doi:10.3389/fpubh.2020.00152.

Kadel S. and Kovats S. (2018). Sex Hormones Regulate Innate Immune Cells and Promote Sex Differences in Respiratory Virus Infection. *Front. Immunol.* doi: 10.3389/fimmu.2018.01653.

Keselman A., Fang X., White P. B. et Heller N. M. (2017). Estrogen signaling contributes to sex differences in macrophage polarization during asthma. *The Journal of Immunology*; 199(5), 1573–1583.

Kim J. S., Sung J. H., Ks S., Ms D., Lee J. H., Nw S., Ij Y. et al. (2016). Toxicogenomic analysis for livers from Sprague-Daley rats following 12-week inhalation exposure to silver nanoparticles. *Journal of Nano Research*; 3(3).

Lamoureux D. P., Kobzik L. et Fedulov, A. V. (2010). Customized PCR-array analysis informed by gene-chip microarray and biological hypothesis reveals pathways involved in lung inflammatory response to titanium dioxide in pregnancy. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*; 73(9), 596–606.

Larsen S. T., Jackson P., Poulsen S. S., Levin M., Jensen K. A., Wallin H., Koponen I. K. et al. (2016). Airway irritation, inflammation, and toxicity in mice following inhalation of metal oxide nanoparticles. *Nanotoxicology*; 10(9), 1254–1262.

Lavastre, V., Chiasson, S., Cavalli, H. et Girard, D. Viscum album agglutinin-I (VAA-I) induces apoptosis and degradation of cytoskeletal proteins in human leukemia PLB-985 and X-CGD cells via caspases: Lamin B-1 is a novel target of VAA-I. *Leukemia Research*; 29: 1443-1453.

Lavastre V., Gonçalves D.M., Girard D. (2015) "Procédures et évaluation du potentiel pro-inflammatoire des nanoparticules." *IRSST, Prévention des risques chimiques et biologiques, Études et recherches, Rapport scientifique R-886*; pp 32.

Liu R., Yin L., Pu Y., Liang G., Zhang J., Su Y., Xiao Z., Ye B. (2009) Pulmonary toxicity induced by three forms of titanium dioxide nanoparticles via intra-tracheal instillation in rats. *Progress in natural science*; 19(5):573–579.

Marziyeh A., Mohammad A.M., Marveh R., Mojtaba F., Mohammad M., Ali M., Saranaz J., Reza M. et Varma R.S. (2018) Health Concerns of Various Nanoparticles: A Review of Their in Vitro and in Vivo Toxicity. *Nanomaterials*; 8(9), 634; doi:10.3390/nano8090634.

Molloy E.J., O'Neill A.J., Grantham J.J., Sheridan-Pereira M., Fitzpatrick J.M., Webb D. W., Watson R.W.G. (2003) Sex-specific alterations in neutrophil apoptosis: the role of estradiol and progesterone. *Blood*; 102 (7): 2653–2659.

Monsé C., Hagemeyer O., Raulf M., Jettkant B., van Kampen V., Kendzia B., Merget R. et al. (2018). Concentration-dependent systemic response after inhalation of nano-sized zinc oxide particles in human volunteers. *Particle and Fibre Toxicology*; 15, 15.

Ostiguy C., Debia M., Roberge B. et Dufresne A. (2014) Nanomatériaux, Guide de bonnes pratiques favorisant la gestion des risques en milieu de travail 2e édition, IRSST.

Ostiguy C., Roberge B., Woods C. et Soucy B. (2010) Les nanoparticules de synthèse Connaissances actuelles sur les risques et les mesures de prévention en SST 2e édition, IRSST.

Ostiguy C., Soucy B., Lapointe G., Woods C., Ménard L. et Trottier M. (2008). Les effets à la santé reliés aux nanoparticules. *Études et recherches / Rapport. Montréal: IRSST. R-558, 2 e éd.*

Oukarroum A., Barhoumi L., Pirastru L., Dewez D. (2013) Silver nanoparticle toxicity effect on growth and cellular viability of the aquatic plant *Lemna gibba*. *Environmental Toxicology*; 32(4): 902-907.

Poland C.A., Duffin R., Kinloch I., Maynard A., Wallace W.A.H., Seaton A., Stone V., Brown S., Macnee W., Donaldson K. (2008) Carbon Nanotubes Introduced Into the Abdominal Cavity of Mice Show Asbestos-Like Pathogenicity in a Pilot Study. *Nat Nanotechnol*; 3(7):423-8.

Prasad A. S. (2009) Zinc: role in immunity, oxidative stress and chronic inflammation. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*; 12:646–652.

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

Ray J.L., Fletcher P., Burmeister R. and Holian A. (2019). The role of sex in particle-induced inflammation and injury, *Nanomed Nanobiotechnol. Wires Nanomedicine and nanobiotechnology*; 12 (2); e1589.

Roni Caryn R. (2020) In Italy, Coronavirus Takes a Higher Toll on Men. *The New York Times*, (consulté le 7 avril 2020).

Sathish V., & Prakash Y. S. (2016). Sex differences in pulmonary anatomy and physiology: Implications for health and disease. In G. N. Neigh et M. M. Mitzelfelt (Eds.). *Sex differences in physiology*. Amsterdam: Elsevier/Academic Press.

Serpooshan V., Sheibani S., Pushparaj P., Wojcik M., Jang A. Y., Santos, M. R., Mahmoudi M. et al. (2018). Effect of cell sex on uptake of nanoparticles: The overlooked factor at the nanobio interface. *ACS Nano*; 12(3), 2253–2266.

Sharma V., Singh P., Pandey A.K., Dhawan A. (2012) Induction of oxidative stress, DNA damage and apoptosis in mouse liver after sub-acute oral exposure to zinc oxide nanoparticles. *Mutation research/genetic toxicology and environmental mutagenesis*;745(1-2):84–91.

Shvedova A. A., Kisin E., Murray A. R., Johnson V. J., Gorelik O., Arepalli S., Hubbs A. F., Mercer R. R., Keohavong P., Sussman N., Jin J., Yin J., Stone S., Chen B. T., Deye G., Maynard A., Castranova V., Baron P. A. et Kagan V. E. (2008) Inhalation vs. aspiration of single-walled carbon nanotubes in C57BL/6 mice: inflammation, fibrosis, oxidative stress, and mutagenesis. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*; 295 (4): 552-565.

Sung J., Ji J., Park J., Song M., Song K., Ryu H., Yu I. et al. (2011). Subchronic inhalation toxicity of gold nanoparticles. *Particle and Fibre Toxicology*; 8(1), 16.

Vanharen M. et D. Girard (2020). Activation of Human Eosinophils with Nanoparticles: a New Area of Research. *Inflammation*; 43(1): 8-16.

Wenham, Smith et Morgan (2020) COVID-19: the gendered impacts of the outbreak. *The Lancet*; 395 (10227): 846–848.

Wijnhoven S.W.P., Peijnenburg W.J.G.M., Herberts C.A., Hagens W.I., Oomen A.G., Heugens E.H.W., Roszek B., Bisschops J., Gosens I., Van De Meent D., et al. (2009) Nano-silver a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. *Nanotoxicology*; 3:109-138.

Zhang Y., Mikhaylova L., Kobzik L. et Fedulov A. V. (2015). Estrogen-mediated impairment of macrophageal uptake of environmental TiO₂ particles to explain inflammatory effect of TiO₂ on airways during pregnancy. *Journal of Immunotoxicology*, 12(1), 81–91.