

Université du Québec
INRS - Institut Armand-Frappier
Laval, Québec

**EFFETS DE NANOPARTICULES SUR LA PROLIFÉRATION
INTERLEUKINE-2 DÉPENDANTE CHEZ LES LYMPHOCYTES T CD4**

Par
Guillaume Côté-Maurais

Mémoire présenté pour
l'obtention du grade de *Magister Scientiae* (M.Sc.)
en sciences expérimentales de la santé

Jury d'évaluation

Examineur externe	Dr Caroline Gilbert Université Laval
Examineur interne	Dr Denis Girard INRS - Institut Armand-Frappier
Directeur de recherche	Dr Jacques Bernier INRS - Institut Armand-Frappier

Résumé

Le but du projet était de comparer la toxicité de trois types de nanoparticules (NPs) et d'évaluer si ces NPs pouvaient influencer la réponse des lymphocytes T à l'interleukine 2 (IL-2). Pour ce faire, nous avons utilisé une lignée de cellules T CD4 lymphoblastoïde IL-2-dépendante, la lignée WE17/10. Les trois types de NPs utilisés étaient celles d'argent (Ag), de fullerène (C₆₀) et de ferrite de zinc (ZnFe₂O₄). Parmi les trois, seulement les NPs d'Ag étaient cytotoxiques à la concentration testée la plus élevée. La caractérisation a permis de déterminer que les NPs de C₆₀ et ZnFe₂O₄ formaient de gros agrégats, alors que celles d'Ag étaient relativement bien dispersées et plus stables. Cela se traduisait par une entrée plus importante des NPs d'Ag à l'intérieur des cellules, tel qu'évalué par cytométrie en flux en mesurant le changement de granularité en fonction de la concentration de NPs. La mesure de la prolifération cellulaire a montré que les NPs d'Ag avaient davantage d'effet en réduisant considérablement la prolifération à des concentrations n'affectant pas la viabilité cellulaire. Les NPs de C₆₀ et ZnFe₂O₄ augmentaient légèrement la prolifération. Certaines protéines impliquées dans les voies de signalisation déclenchées par le récepteur à l'IL-2 furent analysées. Aucun effet significatif ne fut mesuré au niveau de l'activation du facteur de transcription Stat5 et des MAPK ERK1/2 et JNK, à l'exception de ERK1/2 à la suite d'une courte exposition aux NPs d'Ag. Une analyse plus approfondie fut effectuée par réseaux d'anticorps à la suite de l'exposition aux NPs de ZnFe₂O₄. Cela a permis d'identifier plusieurs tyrosine kinases dont le niveau d'activation était modifié. La phosphorylation des protéines Fer et ABL1 étaient notamment fortement augmentée, deux protéines connues pour être activées à la suite d'un stress cellulaire et pouvant stimuler la prolifération. Une étude plus approfondie sera nécessaire pour établir par quel mécanisme ces NPs agissent. Les résultats que nous avons obtenus montrent que les NPs d'Ag présentent une toxicité plus grande, mais ne permettent pas d'établir si les NPs étudiées interfèrent ou non dans la réponse des lymphocytes T CD4 à l'IL-2.

Mots clés : nanoparticules, lymphocytes T, interleukine-2, Ag, C₆₀ et ZnFe₂O₄



Guillaume Côté-Maurais
Étudiant



Dr Jacques Bernier
Directeur de recherche

Abstract

The aim of this project was to compare the toxicity of three different types of nanoparticles (NPs) and evaluate if these NPs could influence the CD4 T lymphocytes response to interleukin-2 (IL-2). To do so, we used a lymphoblastoid IL-2 dependant T CD4 cell line (WE17/10). The three types of NPs used were of silver (Ag), fullerene (C₆₀) and zinc ferrite (ZnFe₂O₄). Among the three, only the Ag NPs were cytotoxic at the highest concentration tested. NPs suspensions characterization shown that C₆₀ et ZnFe₂O₄ NPs were forming large aggregates, while Ag NPs were relatively well dispersed and more stable. This translated to much larger uptake of Ag NPs into cells, as evaluated by flow cytometry by measuring granularity change when NPs concentration increase. Cell proliferation measurement shown that Ag NPs had more effect by considerably reducing proliferation at concentrations that were not affecting cell viability. C₆₀ and ZnFe₂O₄ slightly increased proliferation. Some proteins involved in signaling pathways triggered following IL-2 receptor activation have been analyzed. No significant effect have been measured on the level of activation of the transcription factor Stat5 and on MAPK ERK1/2 and JNK, except for ERK1/2 following a short term exposition to Ag NPs. Further analysis was carried out by antibody array following an exposition ZnFe₂O₄ NPs. It has identified several tyrosine kinase whose activation level was changed. Phosphorylation levels of Fer and ABL1 kinases were strongly increased. These proteins are activated following a cellular stress and can stimulate cell proliferation. Further study will be needed to establish the mechanism by which these NPs act. Results obtained show that Ag NPs have greater toxicity, but does not establish whether or not NPs studied interfere in the CD4 T cell response to IL-2.

Key Words : nanoparticles, T lymphocytes, interleukin-2, Ag, C₆₀ and ZnFe₂O₄

Remerciements

Je voudrais d'abord remercier mon directeur de recherche, Jacques Bernier, pour l'opportunité qu'il m'a donné d'effectuer ma maîtrise dans son laboratoire, et pour la considération et la confiance qu'il m'a alloué durant la poursuite du projet. J'ai beaucoup appris durant cette maîtrise, non seulement au niveau technique, mais aussi dans la gestion du laboratoire, ce qui n'aurait peut-être pas été possible à un autre endroit.

Je veux aussi remercier mes collègues de laboratoire Bruno Johnson, Marlyse Opimba et Debbie Lim, qui ont fait en sorte qu'il y avait toujours une bonne ambiance dans le laboratoire et pour les discussions scientifiques qui ont parfois aidé à apporter une nouvelle perspective. Je tiens aussi à souligner le support de ma collègue, maintenant amie, Marlyse, sans laquelle j'aurais eu de la difficulté à mettre à terme ce projet. Merci pour tout, ton soutien, pour m'avoir poussé quand la motivation était moins présente, de m'avoir embêté, bref de toujours avoir été là.

Merci également à la Fondation Armand-Frappier pour le soutien financier et au Réseau de Recherche en Santé Environnementale (RRSE) pour le financement du projet.

Finalement, je dois bien entendu remercier ma famille, ma mère, mon père, Martin, mon frère et mes sœurs, qui ne m'a non seulement supporté durant ma maîtrise, mais tout au long de mes études. Merci pour la compréhension quant à mon manque de disponibilité.

Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract	iii
Remerciements.....	iv
Liste des Abréviations.....	vii
Liste des figures	x
Liste des tableaux.....	xi
Introduction.....	1
Chapitre 1 : Revue de la littérature	2
1.1 Système immunitaire.....	2
1.1.1 Réponse immunitaire	2
1.1.2 Lymphocytes T CD4.....	3
1.1.3 Interleukine 2 (IL-2).....	5
1.1.3.1 Production d'IL-2	5
1.1.3.2 Récepteur à l'IL-2 (IL-2R)	6
1.1.3.3 IL-2 et cellules T régulatrices	8
1.1.3.4 IL-2 comme facteur de croissance	9
1.1.3.5 IL-2 dans la régulation de la différenciation.....	9
1.1.3.6 IL-2 et induction de l'apoptose.....	10
1.1.3.7 IL-2 et cellules T mémoire.....	11
1.2 Nanotechnologie	13
1.2.1 Définitions.....	13
1.2.2 Utilisations	14
1.2.3 Types de nanomatériaux	14
1.2.3.1 Nanoparticules métalliques.....	15
1.2.3.2 Nanoparticules d'oxydes métalliques.....	16
1.2.3.3 Nanomatériaux à base de carbone.....	16
1.2.3.4 Nanoparticules magnétiques	17
1.2.3.5 Autres nanomatériaux (quantum dots, dendrimères, liposomes).....	18
1.2.4 Nanotoxicologie.....	18
1.2.4.1 Approche expérimentale	19
1.2.5 Absorption, biodistribution et élimination des nanoparticules	19
1.2.5.1 Absorption.....	20
1.2.5.1.1 Peau.....	20
1.2.5.1.2 Voies respiratoires.....	20
1.2.5.1.3 Tractus gastro-intestinal	21
1.2.5.2 Biodistribution	22
1.2.5.3 Métabolisme et Élimination	22
1.2.5.4 Comportement intracellulaire	23
1.2.6 Production d'espèces réactive d'oxygène	24
1.2.7 Cytotoxicité.....	26
1.2.8 Inflammation.....	28
1.2.9 Interférence au niveau des voies de signalisation	29
1.2.10 Nanoparticules utilisées	30
1.2.10.1 Nanoparticules d'Argent.....	31
1.2.10.2 Nanoparticules de Fullerène C ₆₀	34
1.2.10.3 Nanoparticules de Ferrite de Zinc.....	37

1.2.11 Perspectives.....	40
1.3 Objectifs et Hypothèses de recherche	42
Chapitre 2 : Silver and fullerene nanoparticles' effect on interleukin-2-dependent proliferation of CD4(+) T cells	43
2.1 Contribution à l'article.....	43
2.2 Résumé en français	43
2.3 Article soumis	45
2.3.1 Abstract	46
2.3.2 Introduction.....	47
2.3.3 Experimental methods.....	48
2.3.4 Results.....	52
2.3.5 Discussion	54
2.3.6 Acknowledgments.....	57
2.3.7 References	58
2.3.8 Figure caption	62
Chapitre 3 : Zinc iron oxide nanoparticles' effect on interleukin-2-dependent proliferation of CD4(+) T cells	72
3.1 Contribution à l'article.....	72
3.2 Résumé en français	72
3.3 Article soumis	73
3.3.1 Abstract	74
3.3.2 Introduction.....	75
3.3.3 Methods.....	77
3.3.4 Results.....	80
3.3.5 Discussion	82
3.3.6 Acknowledgments.....	84
3.3.7 Declaration of interest.....	84
3.3.8 References.....	85
3.3.9 Figure Caption.....	91
Chapitre 4 : Discussion générale et Conclusion.....	97
Références.....	103

Liste des Abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
Ag	Argent
AICD	Mort cellulaire induite par l'activation
Al	Aluminium
ARNm	Acide ribonucléique messenger
Au	Or
BAL	Lavage broncho-alvéolaire
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
C ₆₀	Fullerène formé de 60 atomes de carbone
CFSE	<i>Carboxyfluorescein succinimidyl ester</i>
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
Co	Cobalt
ConA	Concanavaline A
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
DLS	Diffusion de lumière dynamique
EGF	Facteur de croissance épidermique
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK1/2	Kinase régulée par un signal extracellulaire 1 et 2
Fe	Fer
Fe ₃ O ₄	Oxyde de fer
FSC	<i>Forward scatter</i>
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>

IFN- γ	Interféron gamma
IL	Interleukine
IL-2R	Récepteur à l'IL-2
ITAM	Motifs activateur des immuno-récepteurs associés à la tyrosine
iTreg	T régulateur inductible
JAK	Janus kinase
JNK	Kinase c-Jun N-terminal
LPS	Lipopolysaccharides
MAPK	Protéine kinase activée par des mitogènes
MIP-2	Protéine inflammatoire des macrophages 2
MRI	<i>Magnetic resonance imaging</i>
NAC	N-acétylcystéine
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NFAT	Facteur de transcription des cellules T activées
NF- κ B	Facteur nucléaire- κ B
NGF	Facteur de croissance nerveuse
NK	Cellule tueuse naturelle
NKT	Cellule T tueuse naturelle
nm	nanomètre
NM	nanomatériau
NO _x	Oxydes d'azote
NP	Nanoparticule
nTreg	T régulateur d'origine naturelle
O ₂ ^{·-}	Superoxyde
·OH	Radical hydroxyl
PBMC	Cellule mononucléaire de la circulation périphérique

PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PHA	Phytohémagglutinine
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PI	<i>Propidium iodide</i>
Pt	Platine
PVP	Polyvinylpyrrolidone
QD	<i>Quantum dot</i>
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SSC	<i>Side scatter</i>
Stat	Protéine traductrice et activatrice du signal de transcription
TCR	Récepteur des cellules T
Tfh	T helper folliculaire
Th	T helper
THF	Tetrahydrofurane
TiO ₂	Dioxyde de titane
TNF-α	Facteur tumoral de nécrose alpha
Treg	Cellules T régulatrices
UV	Ultraviolet
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
ZnFe ₂ O ₄ Zn	Ferrite de zinc
ZnO	Oxyde de zinc

Liste des figures

Figure 1.1: Voies de signalisation déclenchées par le récepteur à l'IL-2.....	8
Figure 1.2 : Le rôle de l'IL-2 dans la différenciation des lymphocytes T CD4	10
Figure 1.3 : Définitions des nanomatériaux et nanoparticules.....	13
Figure 2.1 Concentration effect on cellular binding and uptake into WE17/10 cells of (a) Ag-NPs and (b) C ₆₀ -NPs.....	64
Figure 2.2 WE17/10 cells proliferation in presence of (a) Ag-NPs and (b) C ₆₀ -NPs.....	65
Figure 2.3 (a) ROS production following C ₆₀ -NPs exposition (b) IL-2R α expression in WE17/10 cells in presence of Ag and C ₆₀ -NPs	66
Figure 2.4 (a) ERK and (b) JNK activation in WE17/10 cells following Ag and C ₆₀ -NPs treatment....	68
Figure 2.5 Stat5 activation in WE17/10 cells following Ag and C ₆₀ -NPs treatment.....	69
Figure 3.1 Changes in ROS generation in WE17/10 cells treated with ZnFe ₂ O ₄ NPs	92
Figure 3.2 Effect of ZnFe ₂ O ₄ NPs on WE17/10 cells proliferation.....	93
Figure 3.3 Expression of IL-2R α in WE17/10 cells following ZnFe ₂ O ₄ NPs treatment	94
Figure 3.4 Interference in ERK1/2 signal transduction by ZnFe ₂ O ₄ NPs.....	95
Figure 3.5 Interference in STAT5 signal transduction by ZnFe ₂ O ₄ NPs.....	96

Liste des tableaux

Table 2.1 Characterization of Ag and C ₆₀ NPs	60
Table 3.1 Characterization of ZnFe ₂ O ₄ NPs	86
Table 3.2 ZnFe ₂ O ₄ NPs dependant alterations in tyrosine kinase phosphorylation	87

Introduction

Les nanotechnologies présentent un intérêt énorme dû à la gamme d'utilisations pouvant potentiellement être générée par leur développement. Elles peuvent notamment améliorer la résistance des matériaux, la performance des appareils électroniques, l'efficacité des crèmes cosmétiques et permettre de nouveaux traitements médicaux. Ces innovations auront pour conséquences d'augmenter notre exposition aux nanomatériaux. En parallèle avec le développement des nanotechnologies, il doit donc y avoir des études dans le but de déterminer si une exposition aux nanomatériaux peut engendrer des problèmes de santé. La nanotoxicologie est un domaine d'étude récent qui a pour but d'évaluer la toxicité des nanomatériaux et de déterminer les facteurs physico-chimiques influençant cette toxicité. La compréhension de ces facteurs permettra ultimement d'utiliser les nanotechnologies de façon sécuritaire. Plusieurs produits contenant des nanomatériaux sont déjà disponibles sur le marché, et leur nombre est en constante augmentation. Parmi ces produits, ceux à base d'argent et de carbone sont les plus utilisés. Il y a donc nécessité de comprendre de façon approfondie les interactions entre nanomatériaux et cellules.

Notre laboratoire s'intéresse principalement aux lymphocytes T. Ceux-ci ont un rôle régulateur important dans la réponse immunitaire innée et acquise. La majorité des études en nanotoxicologie utilisent des lymphocytes quiescents, mais des résultats montrent que la réponse aux nanomatériaux est différente lorsque les cellules du système immunitaire sont activées. La réponse proliférative des lymphocytes T CD4 est possible grâce à l'action d'interleukine. L'interleukine 2 (IL-2) est une cytokine importante pour la prolifération et le maintien de l'homéostasie des populations de lymphocytes T CD4.

Le présent projet a pour but d'évaluer l'effet de trois types de nanoparticules, soit celles d'argent (Ag), de ferrite de zinc ($ZnFe_2O_4$) et de fullerène (C_{60}) sur la réponse des lymphocytes T CD4 à l'IL-2. Le premier chapitre du mémoire vise à effectuer une revue de la littérature sur le rôle des lymphocytes T CD4 et de l'IL-2, et de l'état des connaissances en nanotoxicologie. Le second chapitre contient deux articles scientifiques à soumettre présentant les résultats obtenus au cours de ma maîtrise. Le troisième chapitre est une discussion à propos des résultats présentés.

Chapitre 1 : Revue de la littérature

1.1 Système immunitaire

Les globules blancs, ou leucocytes, représentent un groupe diversifié de cellules effectuant la médiation de la réponse immunitaire dans le corps. Ils circulent dans le sang et la lymphe afin d'être recrutés dans les tissus endommagés ou infectés. Les différents sous-ensembles de leucocytes se distinguent par leurs caractéristiques fonctionnelles et physiques. Ils ont pour origine commune les cellules souches hématopoïétiques (Geissmann et al., 2010). L'immunité est généralement divisée en deux catégories, l'immunité acquise et l'immunité adaptative. L'immunité acquise représente la première ligne de défense de l'organisme et est non spécifique, alors que l'immunité adaptative nécessite un certain temps avant d'agir, mais est hautement spécifique à l'antigène cible. Les cellules immunitaires composant l'immunité innée sont les phagocytes, les cellules tueuses naturelles (NK) et les cellules T tueuses naturelles (NKT). Les cellules NK et NKT sont cytotoxiques et ont comme caractéristique importante d'être en mesure de distinguer les cellules stressées (comme les cellules tumorales et les cellules infectées) des cellules saines (Vivier et al., 2012). Elles sont donc importantes pour la défense antitumorale. Les phagocytes incluent principalement les neutrophiles, monocytes, macrophages et cellules dendritiques. Ils effectuent la phagocytose, un processus dépendant de l'actine par lequel les cellules internalisent des particules cibles, incluant des microorganismes, des cellules mortes et des débris environnementaux (Underhill & Goodridge, 2012). Les phagocytes ont également un rôle essentiel dans l'initiation de la réponse adaptative. Celle-ci est le résultat de la présence des cellules B et des cellules T, qui peuvent répondre à divers antigènes spécifiques grâce à l'expression clonale d'une diversité colossale de récepteurs des cellules B et récepteurs des cellules T, respectivement. Cette diversité est le résultat de réarrangements somatiques de l'ADN (Vivier et al., 2012).

1.1.1 Réponse immunitaire

Lors de la réponse immunitaire, les phagocytes détectent les microorganismes pathogènes à l'aide de leurs récepteurs de surface, pour ensuite les englober et les tuer (Underhill & Goodridge, 2012). Certains phagocytes vont transformer les agents pathogènes internalisés pour en faire des

antigènes pouvant être présentés par le biais des molécules de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) aux cellules B et T. La plupart vont produire des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires qui orchestreront la réponse inflammatoire locale et systémique et dirigeront le développement de la réponse adaptative (Underhill & Goodridge, 2012). L'inflammation est une réponse immunitaire qui a pour but de protéger l'homéostasie à la suite d'un traumatisme au niveau des tissus (Wong et al., 2009). Elle débute par la libération d'agents chimiotactiques, comme l'IL-1, IL-8, TNF- α et TGF- β , dans le but d'attirer les neutrophiles au site de la blessure (Witte & Barbul, 1997). Les neutrophiles sont impliqués dans l'élimination des pathogènes. Ils agissent de différentes façons, soit par phagocytose, mais aussi en déversant des protéines antibactériennes dans le milieu extracellulaire par dégranulation (Kolaczkowska & Kubes, 2013). Des protéines, comme l'azurocidine, LL37 et la cathepsine G, libérées par les granules des neutrophiles, vont aussi aider au recrutement des monocytes (Kolaczkowska & Kubes, 2013). Lorsque les monocytes migrent de la circulation périphérique vers l'endothélium, ils se différencient en macrophages ou en cellules dendritiques (Murray & Wynn, 2011). Les macrophages activés libèrent des cytokines, chimiokines et des facteurs de croissance. Ils agissent également avec les cellules dendritiques en tant que cellules présentatrices d'antigène pour activer des lymphocytes spécifiques du système immunitaire adaptatif. À la suite de la stimulation antigénique, les cellules B prolifèrent et se différencient dans les centres germinaux en plasmocytes, qui, à la suite de leur maturation, vont sécréter des anticorps de haute-affinité (Batista & Harwood, 2009). Pour les cellules T, la stimulation antigénique est déterminante pour leur prolifération et influence le phénotype vers lequel elles se différencieront (Kuhns & Badgandi, 2012).

1.1.2 Lymphocytes T CD4

Les cellules T CD4 sont impliquées dans la régulation de la réponse immunitaire adaptative. Elles aident à la production d'anticorps par les cellules B, de même qu'au changement isotypique et à la maturation de l'affinité des anticorps (Zhu & Paul, 2010). Elles recrutent et activent les cellules T CD8, macrophages, neutrophiles, éosinophiles et basophiles. Les cellules T CD4 agissent principalement via la sécrétion de cytokines (Zhu & Paul, 2010). Initialement, la régulation effectuée par les lymphocytes T était simplement vu comme un équilibre entre les cellules Th1, produisant des cytokines favorisant une réponse à médiation cellulaire (IL-2, IL-12, IFN- γ et TNF- β), et les cellules Th2, activant l'immunité humorale (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 et IL-13). Cependant, la découverte d'autres types de lymphocytes T CD4, soit les Th17 et T régulatrices (Treg), a modifié ce paradigme (Chatila et al.,

2008). Les cellules Th17 produisent plusieurs cytokines pro-inflammatoires, dont l'IL-17a, IL-17f, IL-21 et IL-22 (Harrington et al., 2005). Elles sont impliquées dans le développement de maladies auto-immunes, et jouent un rôle important dans la réponse immunitaire contre les bactéries et champignons extracellulaires (Weaver et al., 2007). Les cellules Treg ont, à l'inverse, un effet suppressif sur les cellules T et B (Sakaguchi et al., 2008). Les cellules T CD4 naïves se différencient en une des différentes lignées en fonction des cytokines présentes dans leur environnement lors de l'amorce et de l'activation des facteurs de transcription gouvernant la différenciation pour chaque lignée (Zhu & Paul, 2010). Ces facteurs de transcription sont T-bet/Stat4 pour les Th1, GATA3/Stat5 pour les Th2, ROR γ t/Stat3 pour les Th17 et Foxp3/Stat5 pour les Treg (Zhu & Paul, 2010). D'autres lignées potentielles de Th ont été proposées, incluant les cellules Th3 (produisant du TGF- β) (Weiner, 2001), les cellules Tr1 (produisant de l'IL-10) (Groux et al., 1997), les cellules Th9 (produisant de l'IL-9) (Dardalhon et al., 2008) et les cellules Tfh (pour T helper folliculaire, car elles sont situées dans les régions folliculaires des ganglions lymphatiques et de la rate) (Nurieva et al., 2008; Vogelzang et al., 2008). Puisque les cytokines produites par ces lignées de cellules T sont également produites par les cellules Th1/Th2/Th17/Treg, et qu'aucun facteur de transcription spécifique n'est associé à ces lignées, une étude plus approfondie est nécessaire avant de déterminer si ces cellules peuvent être considérées comme des lignées distinctes des quatre reconnues (Zhu & Paul, 2010).

Pour être activées, les cellules T nécessitent généralement une interaction entre leurs complexes récepteur des cellules T et CD3 (TCR-CD3) et les complexes majeurs d'histocompatibilité de classe II (CMHII) des cellules présentatrices d'antigènes (CPAs) (Qian & Weiss, 1997; Kuhns & Badgandi, 2012). À la suite d'une stimulation par un antigène spécifique, le CD3 active plusieurs voies de signalisation via les motifs activateurs des immuno-récepteurs associés à la tyrosine (ITAMs) (Kuhns & Badgandi, 2012). Les ITAMs sont phosphorylés par les kinases Lck et/ou Fyn, devenant alors des ligands pour les domaines SH2 de la kinase ZAP-70 qui est recrutée (Smith-Garvin et al., 2009). Plusieurs kinases sont subséquentement activées, dont Ras, une MAPK kinase kinase, et PKC θ , qui activent respectivement les MAPK et NF- κ B. La cellule T CD4 activée via le complexe TCR-CD3 subit alors un programme de réarrangement de son cytosquelette d'actine. Elle nécessite ensuite la co-stimulation du CD28 grâce à l'interaction avec les ligands CD80 ou CD86 situés sur les CPAs pour stimuler son métabolisme, sa prolifération et sa production de cytokines via notamment la voie phosphoinositide 3-kinase (PI3K) et Akt (Smith-Garvin et al., 2009). Lorsque l'agent infectieux est neutralisé, une phase de contraction suit durant laquelle les cellules effectrices entrent en apoptose par un processus appelé mort cellulaire induite par l'activation (AICD) (McKinstry et al., 2010). La

régulation de l'AICD est encore peu comprise, mais dépend de la stimulation antigénique au niveau du TCR. Une stimulation répétée des cellules effectrices à l'antigène favoriserait notamment le déclenchement de l'AICD (Strasser et al., 2009; McKinstry et al., 2010). Certaines cellules T CD4 activées évitent cette phase de contraction et deviennent plutôt des cellules T mémoires, qui se caractérisent par leur persistance prolongée et leur cinétique rapide lors d'une réexposition au même antigène (Dooms & Abbas, 2006).

1.1.3 Interleukine 2 (IL-2)

L'IL-2 est majoritairement produite par les lymphocytes T CD4 activés et est un médiateur essentiel à leur réponse immunitaire (Walker et al., 1988; Gaffen, 2001). Son récepteur est composé de trois chaînes, les chaînes IL-2R β (CD122) et λ c (CD132), qui sont exprimées de façon constitutives, et la chaîne IL-2R α (CD25). Celle-ci augmente l'affinité du récepteur pour l'IL-2 et est exprimée par les cellules Treg et les cellules T CD4 récemment activées (Malek & Castro, 2010). L'IL-2 est un puissant facteur de croissance pour les cellules T (Walker et al., 1988; Liao et al., 2011). Les recherches récentes effectuées à l'aide de souris knockout au niveau de leur récepteur à l'IL-2 ont montré que ces souris souffraient de maladies autoimmunes plutôt que d'une immunodéficiência (Hoyer et al., 2008). Ce résultat a dans un premier temps paru contradictoire, mais a, par la suite, mené à la découverte de l'une des fonctions importantes de l'IL-2 *in vivo*, soit la régulation de la tolérance au soi via son rôle essentiel dans le développement et le maintien de l'homéostasie des cellules Treg (Malek & Bayer, 2004; Walsh et al., 2006). D'autres études ont également montré l'implication de l'IL-2 dans l'induction de l'apoptose via la voie Fas (Lenardo, 1991; Van Parijs et al., 1997). L'IL-2 a donc des fonctions dichotomiques, puisqu'elle supprime et augmente l'immunité adaptative (Fehervari et al., 2006). Elle est également impliquée dans la différenciation vers les différents types de cellules T CD4, de même que dans le développement des cellules T mémoires.

1.1.3.1 Production d'IL-2

Les cellules T CD4 sont le principal type cellulaire produisant l'IL-2, mais celle-ci est également produite par les cellules T CD8, les cellules dendritiques activées et les cellules NK (Malek, 2008). La production d'IL-2 par les cellules T CD4 se fait rapidement et de façon transitoire à la suite de leur activation via le complexe TCR-CD3 et à une costimulation du CD28 (Malek, 2008). Une

analyse plus précise a permis d'établir que l'IL-2 commence à être sécrétée par les cellules T naïves environ 1h après une stimulation antigénique, et une quantité de production maximale est atteinte après 5-6h (Sojka et al., 2004). Celles-ci décline par la suite et devient indétectable 16h après la stimulation initiale (Sojka et al., 2004; Malek, 2008). Le gène *IL-2* est transcrit par les membres de la famille de facteur de transcription des cellules T activées (NFAT) qui forment des complexes coopératifs avec une variété de facteurs de transcription, incluant AP-1 (Smith-Garvin et al., 2009). Lorsque les complexes TCR-CD3 des cellules T CD4 sont stimulés, il y a augmentation des niveaux intracellulaires de Ca^{2+} , ce qui active les NFAT, qui sont des facteurs de transcription dépendant de la calmoduline (Smith-Garvin et al., 2009). La costimulation via CD28 joue également un rôle en déclenchant la voie PI3K/Akt, où Akt agit en prolongeant la présence de NFAT au niveau du noyau, augmentant la durée de transcription du gène *IL-2* (Smith-Garvin et al., 2009).

L'IL-2 inhibe éventuellement sa propre production via une boucle d'autorégulation (Malek, 2008). Le médiateur clé impliqué dans ce processus est le facteur de transcription Blimp-1 (Malek, 2008). Il a été montré que les cellules T n'exprimant pas Blimp-1 produisent davantage d'IL-2 (Kallies et al., 2006; Martins et al., 2006), alors que les cellules dont l'expression de Blimp-1 est augmentée *in vitro* ne produisent plus d'IL-2 même à la suite de leur activation (Gong & Malek, 2007). L'exposition prolongée des cellules T à un antigène conduit à une hausse de l'expression de Blimp-1, ce qui réduit progressivement leur capacité à sécréter de l'IL-2 (Rutishauser et al., 2009; Shin et al., 2009). Les souris possédant des cellules T knockout pour le gène Blimp-1 montrent une sévère maladie intestinale inflammatoire provoquant leur mort prématurée (Kallies et al., 2006).

1.1.3.2 Récepteur à l'IL-2 (IL-2R)

L'expression de la chaîne α de l'IL-2R est induite à la suite d'une stimulation antigénique pour augmenter l'affinité du récepteur pour l'IL-2. Elle est également fortement augmentée par l'IL-2, car la voie que celle-ci déclenche est auto-inductible (Williams et al., 2006). Lorsque la chaîne α est exprimée, elle agit en liant d'abord l'IL-2, car son affinité pour celle-ci est plus grande, puis se combine avec les sous-unités β et γ_c pour déclencher les voies de signalisation (Sakaguchi, 2004; Malek, 2008). La chaîne λ_c est exprimée par à peu près toutes les cellules hématopoïétiques, et fait partie de plusieurs récepteurs pour d'autres cytokines, soit IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 et IL-21 (Nelson & Willerford, 1998;

Leonard, 2001). La chaîne β est quant à elle une composante du récepteur pour l'IL-15 (Boyman & Sprent, 2012).

Lorsque le complexe quaternaire IL-2-IL-2R est formé, celui-ci est rapidement internalisé dans le cytoplasme où l'IL-2 et les chaînes β et γ_c sont éventuellement dégradées par les lysosomes, tandis que la chaîne α est plutôt recyclée à la surface de la cellule (Malek, 2008; Triplett et al., 2012). L'expression et le rôle de la chaîne α dans la réponse immunitaire seraient variables selon les espèces, car l'importance de cette chaîne serait plus grande dans la réponse effectrice des cellules T CD4 humaine par rapport à celles des souris. Une déficience de la chaîne α chez l'humain, contrairement aux souris, conduit à une sévère immunodépression (Aoki et al., 2006; Caudy et al., 2007). De plus, il y a présence chez l'humain, et non chez la souris, d'une population de cellules T CD4 non activées exprimant un niveau intermédiaire de IL-2R α (Lee et al., 2007).

À la suite de la liaison de l'IL-2 à son récepteur, il y a activation de la Janus kinase 1 (JAK1), via la chaîne γ_c , et de la Janus kinase 3 (JAK3), via la chaîne β . Cela mène à l'activation du facteur de transcription Stat5, de la voie des MAPK et de la voie PI3K/Akt (voir figure 1.1), ce qui conduit à la transcription de cytokines proinflammatoires, de même que de gènes impliqués dans la survie et le cycle cellulaire (Hoyer et al., 2008; Malek, 2008; Malek & Castro, 2010). Le facteur de transcription Stat5 régule les gènes importants pour la fonction effectrice et la prolifération des cellules T (Malek, 2008). Il est également impliqué dans le processus d'auto-induction qui conduit à l'augmentation du niveau d'expression de la chaîne IL-2R α via les voies de signalisation déclenchées par l'IL-2R en se liant directement au locus du gène *Cd25* (Malek, 2008). L'IL-2 favorise la survie des cellules T CD4 en induisant l'expression de certaines protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Akbar et al., 1996).

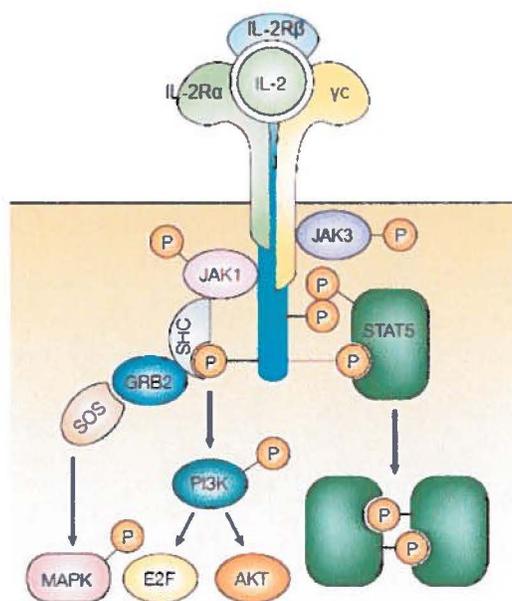


Figure 1.1: Voies de signalisation déclenchées par le récepteur à l'IL-2 (Malek & Bayer, 2004). L'IL-2R déclenche certaines voies de signalisation via les chaînes γ c et β , qui activent respectivement JAK3 et JAK1. Trois voies clés sont ensuite activées, soit la voie des MAPK, PI3K et le facteur de transcription Stat5.

1.1.3.3 IL-2 et cellules T régulatrices

Les Treg se caractérisent par l'expression du facteur de transcription FoxP3 et, dans une large proportion, d'un niveau toujours élevé d'IL-2R α . Elles se divisent en deux catégories, les Treg d'origine naturelle (nTreg) et les Treg inductibles (iTreg) que l'on retrouve toutes deux *in vivo* (Zhu & Paul, 2010). Les nTreg se développent dans le thymus, où la signalisation par l'IL-2 et le TGF- β , la co-stimulation via CD28 et la reconnaissance du soi sont importantes pour leur génération (Sakaguchi, 2004). Dans le cas des iTreg, celles-ci apparaissent si des cellules T CD4 naïves de la circulation périphérique sont stimulées au niveau de leur TCR en présence d'IL-2 et de TGF- β (Chen et al., 2003). La neutralisation de l'action de l'IL-2 *in vivo* par l'ajout d'anticorps monoclonaux contre cette cytokine conduit à une diminution du nombre de cellules Treg et de leur niveau d'expression du facteur de transcription FoxP3 (Rubtsov et al., 2010). Celui-ci joue un rôle important dans le métabolisme de l'IL-2 par les Treg, car il réprime le gène de l'IL-2 et augmente l'expression de la chaîne IL-2R α (Wu et al., 2006; Ono et al., 2007). Donc, les cellules Treg ne produisent pas d'IL-2 et ont davantage d'affinité pour cette cytokine que les autres cellules T CD4. Elles dépendent donc de la production d'IL-2 par les cellules T effectrices pour leur développement et le maintien de leur homéostasie (Boyman & Sprent, 2012). Leur affinité supérieure pour l'IL-2 jouerait un rôle important sur leur effet inhibiteur. Avant

qu'une stimulation antigénique ait lieu, la capacité des cellules T CD4 à lier l'IL-2 est relativement faible, donc les Treg possèdent un avantage dans la compétition pour l'IL-2. Elles préviennent ainsi une hausse de la régulation autocrine de la chaîne IL-2R α par les T effectrices et augmentent la quantité d'IL-2 seuil déclenchant la boucle d'auto-activation (Busse et al., 2010). Celle-ci se déclenche seulement si la quantité d'IL-2 libérée est élevée, donc si la stimulation antigénique des cellules T effectrices est forte. Cette action des Treg est effective uniquement à de courtes distances, car aucune inhibition n'est mesurée lors d'expériences *in vitro* où les deux types cellulaires sont séparés à l'aide d'une membrane perméable aux protéines sans l'être aux cellules (Scheffold et al., 2005).

1.1.3.4 IL-2 comme facteur de croissance

L'IL-2 a originellement été décrite comme un facteur de croissance important des cellules T CD4 (Mier & Gallo, 1980; Gillis et al., 1981). Elle agit en induisant l'expansion clonale des cellules T à la suite de leur activation, car les gènes codant pour les chaînes de l'IL-2R, notamment la chaîne α , sont traduits très tôt via la signalisation du complexe TCR-CD3 à la suite de sa liaison à un antigène (Malek & Bayer, 2004; Hoyer et al., 2008). La progression du cycle cellulaire induite par l'IL-2 nécessite la signalisation des voies de la PI3K et Stat5 (Brennan et al., 1997; Moriggl et al., 1999). Son action est indispensable pour la prolifération des cellules T *in vitro*, mais *in vivo*, d'autres cytokines joueraient aussi le rôle de facteurs de croissance des cellules T, notamment celles dont le récepteur possède une chaîne γ_c (Smith, 1988; He et al., 1997).

1.1.3.5 IL-2 dans la régulation de la différenciation

Il a été démontré que le nombre de cellules Th1 et Th2 pleinement différenciées est plus faible lorsque les cellules T CD4 ne reçoivent pas le signal de l'IL-2 lors de l'amorce de la réponse (Van Parijs et al., 1997; Jelley-Gibbs et al., 2000; Dooms et al., 2004). Des études plus récentes ont permis de déterminer par quel mécanisme l'IL-2 agit pour influencer sur la différenciation des différentes lignées de cellules T CD4 (voir figure 1.2). Dans le cas des cellules Th1, l'IL-2 induit l'expression de la chaîne IL-12R β_2 , permettant aux cellules de répondre davantage à l'IL-12, dont le signal conduit à l'activation du facteur de transcription Stat4, qui lui induit l'expression du facteur de transcription spécifique aux Th1, T-bet (Zhu et al., 2010; Liao et al., 2011). Dans le cas des cellules Th2, l'IL-2 augmente le niveau d'expression de la chaîne IL-4R α et maintient l'accessibilité du locus du gène *Il4*, ce qui favorise

l'amorce de la différenciation des cellules T en Th2 (Cote-Sierra et al., 2004; Liao et al., 2011). L'IL-2 inhibe aussi la différenciation des cellules Th17 en réprimant l'expression de l'IL-6R α et IL-6R β (ou gp130), ce qui réduit la réponse à l'IL-6, donc l'activation de Stat3, nécessaire au développement des cellules Th17 (Liao et al., 2011). L'IL-2 inhibe aussi directement la liaison de Stat3 sur le locus du gène *Il17* via son activation de Stat5, car les deux facteurs de transcription sont alors en compétition pour les mêmes sites de liaison (Yang et al., 2011). En absence des signaux de l'IL-2, le nombre de cellules Treg diminue considérablement, alors que celui des Th17 augmente, ce qui mène à une susceptibilité accrue aux maladies autoimmunes et aux désordres inflammatoires (Littman & Rudensky, 2010).

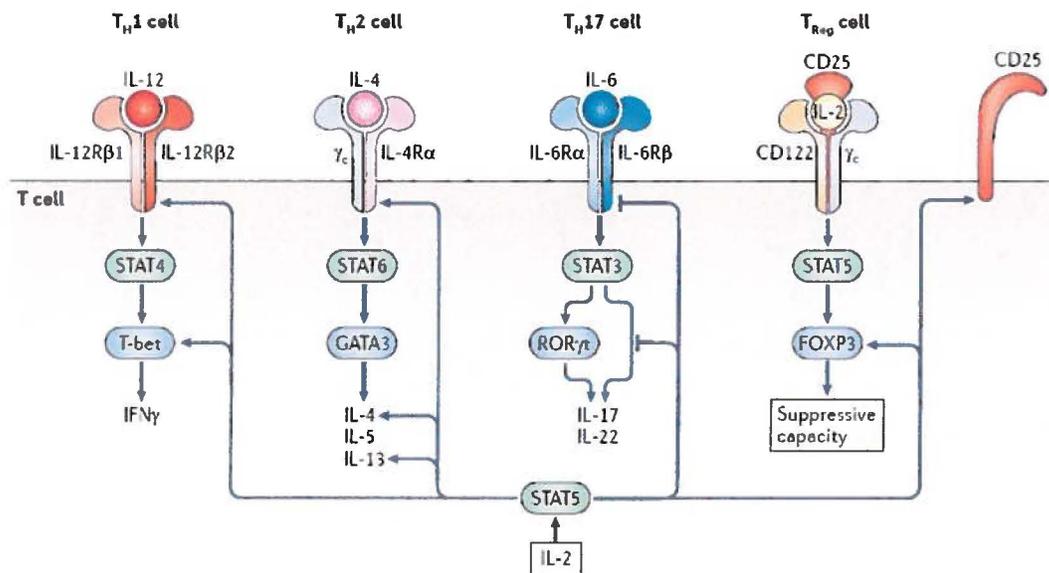


Figure 1.2 : Le rôle de l'IL-2 dans la différenciation des lymphocytes T CD4 (Boyman & Sprent, 2012). L'IL-2 agit en augmentant l'expression de la chaîne IL-12R β 2 et IL-4R α , ce qui favorise l'activation des facteurs de transcription T-bet et GATA3, respectivement spécifiques aux cellules Th1 et Th2. L'IL-2 inhibe aussi la différenciation des cellules Th17 en réprimant l'expression de l'IL-6R α et IL-6R β , ce qui réduit la réponse à l'IL-6, donc l'activation de Stat3, nécessaire au développement des cellules Th17. L'IL-2 agit également sur la différenciation des cellules Treg en activant directement l'expression du facteur de transcription FOXP3.

1.1.3.6 IL-2 et induction de l'apoptose

La mort par apoptose des lymphocytes est un mécanisme homéostatique important permettant de maintenir une tolérance périphérique aux antigènes du soi (Refaeli et al., 1998). Chez les cellules T CD4, l'AICD résulte de la coexpression du récepteur de mort Fas et FasL (Brunner et al., 1995). Ce processus serait potentialisé par l'IL-2, ce qui est contradictoire avec son rôle de cytokine pro-survie agissant comme facteur de croissance (Lenardo, 1991; Refaeli et al., 1998). Les cellules T de souris

déficiente en IL-2, ou n'exprimant pas IL-2R α sont résistante à l'AICD (Kneitz et al., 1995; Van Parijs et al., 1997). De plus, ces souris développent une lymphoprolifération sévère et des maladies autoimmunes (Sadlack et al., 1993; Willerford et al., 1995). L'IL-2 agirait en augmentant la transcription et l'expression à la surface du FasL, et supprimerait la transcription de FLIP, un inhibiteur de l'apoptose médiée par Fas (Refaeli et al., 1998).

1.1.3.7 IL-2 et cellules T mémoire

Les cellules T mémoires survivent à la période de contraction pour former un pool de répondeurs supérieurs disponibles lors d'une seconde exposition à une infection (Dooms & Abbas, 2006). Elles ont la capacité d'initier rapidement la division cellulaire et la sécrétion de cytokines en réponse à la stimulation antigénique, parce qu'elles dépendent moins de la costimulation pour être activées (London et al., 2000). La réception des signaux déclenchés par l'IL-2 à la suite de l'amorce de l'activation jouerait un rôle crucial dans le développement des cellules T CD4 mémoires (Dooms & Abbas, 2006). Ces signaux seraient nécessaires uniquement tôt dans la réponse, alors que dans les stages tardifs, l'IL-7 serait la cytokine clé (Dooms & Abbas, 2006). Le potentiel de survie à long terme étant critique pour l'établissement des cellules mémoire, l'IL-2 agirait en favorisant la survie des cellules T (Dooms et al., 2004). Plusieurs mécanismes sont envisagés pour expliquer ce phénomène. D'abord, en augmentant le nombre de cellules effectrices, le nombre de précurseurs des cellules mémoire augmente également. Ensuite, en induisant une expression stable des protéines anti-apoptotiques. Puis, en améliorant l'expression des récepteurs pour facteur de croissance, ce qui donne un avantage de survie aux cellules T lors de la compétition avec les autres lymphocytes présents (Dooms & Abbas, 2006). La signalisation de l'IL-2 tôt à la suite de l'activation des cellules serait essentielle pour la réexpression tardive de la chaîne IL-7R α (Dooms et al., 2007).

Une étude récente effectuée à l'aide de cellules mononucléaires de la circulation périphérique (PBMCs) humaines a montré que la majorité des cellules T CD4 mémoires exprime des niveaux intermédiaires d'IL-2R α chez des individus en santé (Triplett et al., 2012). Il a été observé que, chez l'humain, il existe une proportion plus grande de cellules T restantes CD4⁺FoxP3⁻ exprimant des niveaux intermédiaires d'IL-2R α qu'on ne le pensait, et que la majorité de cette population cellulaire exprime le CD95, un marqueur des cellules T mémoires. Cette expression du IL-2R α n'est pas transitoire, puisque les cellules isolées et cultivées durant quelques jours *in vitro* en absence de

stimulation maintiennent ce même niveau d'expression. De plus, elles répondent *in vitro* à des concentrations beaucoup plus faibles d'IL-2 que les cellules n'exprimant pas l'IL-2R α ou CD95. Cette expression d'un niveau intermédiaire d'IL-2R α aurait un effet sur la grande efficacité dans les fonctions effectrices et l'activation en absence de costimulation des cellules T CD4 mémoires.

1.2 Nanotechnologie

1.2.1 Définitions

La nanotechnologie implique la manipulation et l'application de particules ou de systèmes conçus possédant au moins une dimension à l'échelle du nanomètre, soit entre 1 et 100 nanomètres (nm) (Arora et al., 2012). On nomme les matériaux générés par cette technologie des nanomatériaux (NMs), alors que le terme nanoparticule (NP) réfère quant à lui uniquement aux particules dont les trois dimensions sont à l'échelle du nm (voir figure 1.3). Le terme NP est également uniquement réservé aux particules volontairement conçues, donc ne réfère pas aux particules à l'échelle du nm qui sont produites naturellement, comme les sous-produits de combustion (Arora et al., 2012). L'avènement de la nanotechnologie est relativement récent, et résulte du perfectionnement des techniques de synthèse, de l'avancé rapide dans la chimie et la physique à l'échelle atomique et de l'amélioration de la compréhension des structures intracellulaires au niveau moléculaire (Hubbs et al., 2011). Les NMs possèdent des propriétés magnétiques, catalytiques, optiques, électriques et mécaniques supérieures par rapport à un matériel de même composition, mais de plus grande dimension, car ces propriétés physicochimiques nouvelles que possèdent les NMs sont attribuables à leur petite taille (Ferrari, 2005; Arora et al., 2012). Celle-ci leur confère une aire de surface extrêmement élevée par rapport au volume qu'ils occupent. Ce faisant, les NMs possèdent une très grande réactivité, car proportionnellement, une plus grande quantité d'atomes sont situés à leur surface, donc disponibles pour réagir (Oberdorster et al., 2005b; Chen & Schluesener, 2008; Goesmann & Feldmann, 2010; Arora et al., 2012). En fait les NMs sont dans une zone de transition entre les atomes ou molécules individuels et le matériel de masse correspondant (Nel et al., 2006).

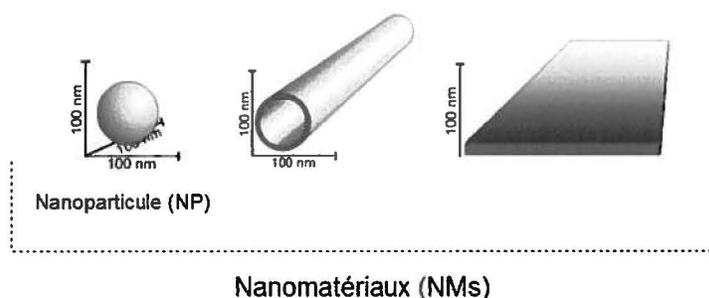


Figure 1.3 : Définitions des nanomatériaux et nanoparticules (Krug & Wick, 2011). Pour être considéré comme des nanomatériau (NM), un matériau doit posséder au moins une dimension à l'échelle du nanomètre, soit entre 1 et 100 nanomètres (nm). Les nanoparticules (NPs) ont leur trois dimensions à l'échelle du nanomètre.

1.2.2 Utilisations

Le développement des nanotechnologies est encore en cours, et certains défis restent à être relevés pour plusieurs NMs avant de pouvoir les utiliser à grande échelle. Notamment, à cause de leur instabilité intrinsèque sur de longues périodes dû au fait que les NMs ont tendance à former des agglomérats/agrégats pour réduire l'énergie associée à leur grande aire de surface (Lu et al., 2007). La différence entre les agglomérats et les agrégats est la force avec laquelle les NPs interagissent entre-elles pour former de plus grosses particules. Les NPs sous forme d'agrégats peuvent facilement se disperser à nouveau par une force mécanique. Avec le temps, les agrégats peuvent former des agglomérats, dans lesquels la force d'interaction avec les particules est beaucoup plus grande (Schramm, 2008).

Les applications potentielles des nanotechnologies sont nombreuses, et les gouvernements et industries investissent des sommes colossales pour leur développement. Parmi ces applications, il y a le développement de nouveaux matériaux plus légers et plus résistants, de batteries et capteurs solaires plus efficaces, de nouveaux semiconducteurs et catalyseurs, d'instruments pour la filtration de l'eau, et plusieurs autres (Nel et al., 2006; Maynard, 2007). Le domaine de recherche qui suscite probablement le plus d'enthousiasme et qui se développe de plus en plus est l'utilisation des nanotechnologies à des fins médicales, un domaine que l'on nomme la nanomédecine. Les NMs pourront éventuellement permettre de cibler l'action de médicaments, d'effectuer de l'imagerie médicale ou de cibler spécifiquement des cellules cancéreuses (Ferrari, 2005; Riehemann et al., 2009; Arora et al., 2012). Cela résulte du fait que des protéines, des anticorps monoclonaux ou des molécules d'ADN peuvent être fixés aux NMs pour cibler leurs déplacements vers un type cellulaire spécifique (Lewinski et al., 2008). Malgré les difficultés associées à leur développement, on retrouve déjà des NMs dans divers produits commercialisés, soit notamment les puces d'ordinateurs, produits cosmétiques, vêtements et articles de sport (Maynard, 2007).

1.2.3 Types de nanomatériaux

On peut regrouper les différents types de NMs en catégories en fonction de leur composition. Il y a les NMs métalliques (argent, or, cuivre), oxydes métalliques (dioxyde de titane, oxyde de zinc, oxyde de cérium), à base de carbone (nanotubes de carbone à simple ou multiparois, fullerènes, noir de

carbone), magnétiques (fer, cobalt, spinelles ferromagnétique), les quantum dots, les dendrimères et les liposomes (Walker & Bucher, 2009).

1.2.3.1 Nanoparticules métalliques

Les principales NPs constituées de métaux pures sont les NPs d'argent (Ag) et d'or (Au). Les NPs d'Or sont utilisées dans certains produits de consommation, incluant les cosmétiques, emballages alimentaires, breuvages, pâtes à dent, automobiles et dans les appareils pour le traitement de l'air (Sung et al., 2011). Ces NPs absorbent fortement la lumière visible, et cette énergie lumineuse excite les électrons libres à leur surface à une oscillation collective, appelée plasmon de surface (Sonnichsen et al., 2002). Cette propriété conduit à des applications biologiques, notamment comme senseurs et pour le marquage et la visualisation cellulaire (Sperling et al., 2008). Dans le cas des NMs à base d'Ag, ils constituent les NMs les plus commercialisés jusqu'à maintenant (Wijnhoven et al., 2009). Le nombre de produits disponibles sur le marché contenant des NMs d'Ag est passé de 30 en 2006 à plus de 300 au début de l'année 2011 (Stensberg et al., 2011). Leur utilisation est principalement associée à leur effet antimicrobien, donc elles sont utilisées actuellement dans certains dispositifs médicaux, comme les instruments chirurgicaux, prothèses osseuses et pansements, de même que dans les systèmes pour purifier l'eau (Jain & Pradeep, 2005; Li et al., 2008; Arora et al., 2009). Cette propriété antimicrobienne de l'Ag est connue depuis longtemps, puisque les Romains utilisaient déjà les ions d'Ag pour désinfecter leur eau potable. En fait, les ions d'Ag étaient l'agent antibactérien le plus utilisé jusqu'au développement des antibiotiques et désinfectants synthétiques au milieu du 20^e siècle (Stensberg et al., 2011; You et al., 2012). Par contre, il y a maintenant un intérêt renouvelé pour l'Ag, car sous forme de nanomatériaux manufacturés, les propriétés physicochimiques et biologiques sont renforcées en comparaison aux matériaux en vrac (You et al., 2012). Les NPs d'Ag ont une toxicité significativement plus élevée que les ions d'Ag sur les cellules procaryotes, car leur effet bactéricide est observé dans les concentrations nanomolaires, alors que dans le cas des ions, la toxicité s'observe dans les niveaux micromolaires (Lok et al., 2007; Choi & Hu, 2009; Cumberland & Lead, 2009). L'Ag agit en se liant à l'ADN microbien, empêchant ainsi la réplication des bactéries, et aux groupements sulfhydryles des enzymes impliquées notamment dans la chaîne respiratoire, causant leur inactivation (Slawson et al., 1990; Dunn & Edwards-Jones, 2004). Dans le cas des cellules eucaryotes, la présence d'un noyau proéminent, d'un mécanisme complexe de réparation de l'ADN et d'un cycle cellulaire permettant de contrôler la survie cellulaire permet de réduire leur sensibilité à l'Ag (AshaRani et al., 2009). L'Ag

possède aussi un état d'oxydation, ce qui en fait un excellent catalyseur, donc les NPs d'Ag sont utilisées à cet effet (Zhai et al., 2006).

1.2.3.2 Nanoparticules d'oxydes métalliques

Les NPs de dioxyde de titane (TiO_2) et d'oxyde de zinc (ZnO) sont les principales NPs de cette catégorie utilisées sur le marché. Elles sont notamment ajoutées aux crèmes solaires pour leur capacité à absorber les rayons ultraviolets (UV) (Hagens et al., 2007). Elles entrent également dans la fabrication de plusieurs produits industriels, comme les colorants, peintures, pigments, caoutchoucs, céramiques, produits électroniques et cosmétiques (Fan & Lu, 2005; Djuriscic & Leung, 2006). Ces applications diverses résultent des caractéristiques uniques qu'elles possèdent, soit leur capacité semiconductrice, électrique, optique, catalytique, magnétique et antimicrobienne (Fan & Lu, 2005; Baek et al., 2012). Elles permettent de développer des peintures rendant la surface auto-nettoyante et anti-fongique. Leur propriété catalytique est mise à contribution pour la purification de l'air, car elle permet de dégrader certains polluants comme les oxydes d'azote (NO_x) et les composés organiques volatiles (Christensen et al., 2011).

1.2.3.3 Nanomatériaux à base de carbone

Les nanotubes de carbone sont soit à simple ou à multiparois, donc constitués d'une ou plusieurs feuilles de graphite enroulée(s) pour former un tube possédant un diamètre à l'échelle nanométrique et une longueur de 1 μm et plus (Tsuji et al., 2006). Ils possèdent des propriétés mécaniques, électriques, thermiques et optiques remarquables (Kunzmann et al., 2011). Plusieurs applications sont associées à leur développement, notamment la conception de structures exceptionnellement fortes et très légères, de systèmes hautement efficace de purification d'air et de mémoires d'ordinateur (Tsuji et al., 2006). Les fullerènes sont également uniquement formés d'atomes de carbone, et possèdent une structure semblable à un ballon de soccer qui est constituée d'un nombre variable d'atomes selon les types de fullerènes (ex. C_{60} , C_{70} , C_{80} , C_{94}) (Aschberger et al., 2010). Ils entrent dans la fabrication de super conducteurs, d'aimants, de catalyseurs et de dispositifs pour la production d'énergie (Morimoto et al., 2010). Le fullerène C_{60} est un composé remarquablement stable qui possède 30 doubles liaisons auxquelles des radicaux libres peuvent se lier (Aschberger et al., 2010). On l'a même pour cela qualifié d'éponge à radicaux (Xiao et al., 2006). Cette propriété a conduit à leur utilisation dans les produits

cosmétiques où leur fonction antioxydante est mise à contribution dans les crèmes solaires et anti-âge (Aschberger et al., 2010; Krug & Wick, 2011). Elle pourrait éventuellement servir à des fins médicales pour le traitement de maladies résultant d'une formation de radicaux libres, comme les désordres neurodégénératifs et certains cancers (Dugan et al., 2001; Markovic & Trajkovic, 2008). Pour être utilisés, les fullerènes C₆₀ doivent souvent subir des modifications à leur surface pour les rendre plus solubles, soit par l'ajout de fonctions hydroxyles (fullerenol : C₆₀(OH)_n) pour les applications dans le domaine pharmaceutique, ou en les enroulant dans la polyvinylpyrrolidone pour le domaine cosmétique (Aschberger et al., 2010).

1.2.3.4 Nanoparticules magnétiques

Les NPs magnétiques sont constituées de fer (Fe) ou de cobalt (Co), et incluent les oxydes de fer (Fe₃O₄), les métaux purs, Fe et Co, les spinelles ferromagnétiques, MFe₂O₄ (M : Mn, Ni, Cu, Zn) et les alliages de platine (Pt), comme le CoPt₃ et FePt (Lu et al., 2007). La constante du moment magnétique de ce type de NP est très élevée, ce qui signifie qu'un aimant exerce une très grande force sur ces NPs (Lu et al., 2007). De plus, leur réponse à un champ magnétique appliqué est très rapide, et ce, sans qu'il y ait de magnétisme résiduel (Lu et al., 2007). Ces NPs étant hautement réactives, elles peuvent réagir au contact de l'air, ce qui conduit généralement à une perte de magnétisme et de dispersibilité. Pour palier à ce problème, elles sont souvent enrobées, soit avec de la dextrane, de l'amidon ou du polyéthylène glycol pour les stabiliser chimiquement et éviter leur agglomération ou oxydation (Lu et al., 2007). Les études montrent jusqu'à maintenant que ces NPs possèdent une excellente biocompatibilité (Kunzmann et al., 2011). Ces NPs pourront éventuellement être utilisées dans le domaine biomédical grâce à leurs propriétés car, à la suite de leur fonctionnalisation, elles pourront être guidées à l'aide d'un champ magnétique externe (Kunzmann et al., 2011). Cela permettra par exemple d'amener de grandes quantités d'un médicament au site d'action désiré pour ainsi obtenir une concentration locale élevée, tout en évitant la toxicité et les autres effets secondaires associés à de telles concentrations dans les autres parties de l'organisme (Lu et al., 2007). Pour que l'utilisation des NPs magnétiques deviennent pratique courante, certains aspects restent encore à améliorer, soit la synthèse contrôlée quant à la taille et la stabilité des particules obtenues, la liaison des médicaments aux particules et des tests de biocompatibilité doivent encore être effectués, notamment en fonction de la composition des couches les recouvrant.

1.2.3.5 Autres nanomatériaux (quantum dots, dendrimères, liposomes)

D'autres types de NMs plus complexes furent développés pour diverses applications. Les quantum dots (QDs) sont des nanocristaux semiconducteurs possédant des propriétés électriques et optiques uniques (Hagens et al., 2007). Ils possèdent un noyau métallique entouré d'une capsule qui le protège et pouvant être fonctionnalisée (Hagens et al., 2007). Les QDs émettent une fluorescence forte et photostable, et sont pour cela utilisés pour les études d'imageries biomédicales *in vivo* (Desai et al., 2010; Jain, 2010). Les dendrimères sont, quant à eux, des macromolécules dont la structure est constituée de plusieurs branches, et pourraient être utilisés dans le développement de nouveaux systèmes pour cibler l'action de médicaments et délivrer des gènes (Kunzmann et al., 2011). Leur intérêt résulte du niveau de contrôle élevé sur leur architecture pouvant être obtenu lors de leur synthèse, soit particulièrement sur leur taille, la densité des branches et la fonctionnalité de surface (Kunzmann et al., 2011). Finalement, les liposomes sont des vésicules à base de lipides formées de une ou plusieurs bicouches lipidiques composées d'un mélange de phosphatidylcholines à longues ou courtes chaînes (Desai et al., 2010). Ils possèdent une grande diversité morphologique en fonction de leur composition, de l'hydratation et de la température (Barbosa-Barros et al., 2009). Comme ils sont à base de lipides, ils traversent facilement la peau et peuvent ainsi être utilisés pour administrer des médicaments transdermiques (Desai et al., 2010).

1.2.4 Nanotoxicologie

Le potentiel des nanotechnologies est exceptionnel, mais avant que leur utilisation devienne pratique courante, l'évaluation de la sécurité des NMs doit être une priorité, car leur réactivité élevée pourrait potentiellement mener à des effets toxiques à la suite des interactions néfastes avec les systèmes biologiques (Oberdorster et al., 2005b). Un nouveau sous-domaine d'étude en toxicologie a été créé, soit la nanotoxicologie, ce qui se justifie par le fait que les spécialistes s'entendent pour dire que l'étude de la toxicité des NMs est différente de celle effectuée pour les autres composés chimiques (Walker & Bucher, 2009). La petite taille des NMs signifie qu'il pourrait y avoir des nouvelles voies d'exposition (Walker & Bucher, 2009). Une fois internalisés, les propriétés de surface peuvent avoir des impacts sur la cinétique et la biodistribution des NMs (Walker & Bucher, 2009). Les nouvelles propriétés qui expliquent l'intérêt pour les nanotechnologies pourraient aussi engendrer des nouvelles interactions biologiques menant à une toxicité non anticipée (Linse et al., 2007). La dose lors d'une

exposition aux NMs va être influencée par la taille et l'aire de surface des NMs, donc se baser uniquement sur la masse pour mesurer la dose peut conduire à une évaluation erronée du risque d'exposition (Oberdorster et al., 2007). Lorsque l'on évalue la toxicité d'un NM, le processus d'analyse pour le caractériser est beaucoup plus complexe qu'une simple caractérisation chimique (Walker & Bucher, 2009). Il faut prendre en considération les différentes propriétés physicochimiques, qui incluent leur taille, forme, niveau de dispersion, de même que l'aire et la chimie de surface (Eom & Choi, 2010; Stensberg et al., 2011). La caractérisation chimique est un aspect clé dans l'évaluation de la toxicité des NMs, et les recherches en nanotoxicologie doivent chercher à comprendre comment les propriétés physicochimiques des NMs engendrent des réponses biologiques néfastes pour ultimement établir des normes d'exposition et d'utilisation pour chaque type de NM (Hagens et al., 2007; Warheit, 2008; Clift et al., 2010; Fadeel & Garcia-Bennett, 2010).

1.2.4.1 Approche expérimentale

La méthodologie à employer pour évaluer la toxicité des NMs est encore sujet à discussion dans le domaine des nanotechnologies. Par contre, les experts s'entendent généralement sur le fait que les approches *in vitro* et *in vivo* ont leurs avantages et inconvénients, donc que les deux doivent être employées pour ainsi se compléter. Les modèles *in vitro* sont un moyen rapide et efficace pour les études de toxicité et permettent une analyse plus raffinée des interactions entre NPs et cellules. Cela permet d'établir des courbes dose-réponse, étudier les mécanismes d'action et comprendre la relation entre l'activité et la structure des NMs (Sayes et al., 2005; Arora et al., 2012). Ces modèles permettent d'évaluer l'effet primaire sur les cellules cibles sans qu'il y ait d'effet secondaire, comme l'inflammation et des facteurs de compensation physiologiques, ce qui complique l'interprétation lors d'études *in vivo* (Arora et al., 2012). Par contre, les recherches effectuées *in vitro* doivent ensuite être suivies d'études *in vivo*, car l'absorption, la toxico-cinétique et les réponses coordonnées des tissus peuvent être analysées uniquement *in vivo* (Donaldson et al., 2009). Ainsi, les études tant *in vitro* qu'*in vivo* sont essentielles en nanotoxicologie, et les deux seront donc citées dans cette revue de la littérature.

1.2.5 Absorption, biodistribution et élimination des nanoparticules

Pour connaître les organes accumulant davantage les NPs, la dose et la durée d'exposition à laquelle un organisme est soumis lorsqu'il est exposé aux NPs, et pour utiliser les NPs à des fins

médicales, il faut connaître la relation entre leurs propriétés physicochimiques et les processus d'absorption, de distribution, du métabolisme et d'élimination (Li & Huang, 2008; Liang et al., 2008; Aschberger et al., 2010).

1.2.5.1 Absorption

Dans le cas des applications médicales, cela implique souvent l'injection directe des NPs dans la circulation, donc l'absorption se fait immédiatement. Par contre, pour les autres utilisations, l'exposition aux NPs ne résulte pas nécessairement en une absorption. Celle-ci dépend de la capacité des NPs à traverser soit la peau, les voies respiratoires ou le tractus gastro-intestinal (Arora et al., 2012).

1.2.5.1.1 Peau

La peau est exposée aux NPs notamment lors de l'application topique intentionnelle de cosmétiques et crèmes solaires contenant des NPs, lors de l'utilisation de vêtements ou pansements dans lesquels des NPs d'Ag sont incorporés, ou lorsque des travailleurs sont exposés à des poussières contenant des NPs (Lee et al., 2003; Oberdorster et al., 2005b; Hagens et al., 2007). Dû à leur présence dans les crèmes solaire, l'absorption par la peau des NPs de TiO₂ et ZnO a été davantage étudiée. Les résultats montrent que ces NPs ne pénètrent pas l'épiderme intact (Lademann et al., 1999; Schulz et al., 2002; Sadrieh et al., 2010). Par contre, d'autres études ont observé une absorption au niveau des follicules pileux (Bennat & Muller-Goymann, 2000; Toll et al., 2004). Au niveau des articulations, où la peau subit des mouvements de flexion, l'absorption serait favorisée, tel que mesuré pour des microparticules de béryllium et des NPs de fullerène (Tinkle et al., 2003; Rouse et al., 2007). D'autres facteurs comme la charge et la forme des NPs et le solvant dans lequel les NPs sont dispersées auraient une influence sur l'efficacité d'absorption (Lansdown & Taylor, 1997; Kohli & Alpar, 2004; Ryman-Rasmussen et al., 2006; Xia et al., 2010). Dans le cas des crèmes antiseptiques ou des pansements contenant des NPs, ils sont de par leur fonction appliqués sur des blessures, donc l'entrée des NPs dans la circulation est facilitée. Une étude clinique effectuée chez des patients brûlés dont les blessures étaient couvertes de pansements contenant des NPs d'Ag a mesuré des niveaux anormalement élevés d'Ag dans le sang (Van de Voorde et al., 2005; Trop, 2006).

1.2.5.1.2 Voies respiratoires

L'exposition des voies respiratoires aux NPs et surtout problématique pour les travailleurs d'industries produisant ou travaillant avec des NMs (Hagens et al., 2007). L'analyse du comportement des NPs lorsqu'elles sont inhalées représente un certain défi, car il faut réussir à générer par aérosol des NPs, ce qui est complexe dû à leur tendance à s'agglomérer. La pertinence de ce genre de procédé de dispersion est discutable, puisque les travailleurs seront certainement exposés à des particules agglomérées, donc peut-être à très peu de NPs. Par exemple, la production de nanotubes de carbone résulte en une concentration très faible de NPs dans l'air, car ils s'agrègent pour former de grosses particules non respirables (Maynard et al., 2004). Donc un autre défi est de déterminer le niveau d'exposition aux NPs qu'implique la production de NMs, car cela nécessite une instrumentation coûteuse et mesurer la distribution de la taille des particules est un procédé complexe (Zimmer & Maynard, 2002).

Deux facteurs sont à considérer lors de l'absorption au niveau des poumons, soit la distribution systémique des particules inhalées, mais aussi leur rétention pulmonaire (Takenaka et al., 2001). Les voies respiratoires peuvent être divisées en trois sections, le nasopharynx, la région trachéo-bronchique et la région alvéolaire, et la taille des NPs affecte de façon importante la section où les particules se déposent (Oberdorster et al., 2005b). Contrairement aux particules de plus grandes dimensions, les NPs une fois au niveau des voies respiratoires traverseraient facilement vers la circulation pour atteindre les autres organes, tel que montré à la suite de l'instillation ou l'inhalation par des rats de NPs d'Ag de 15 nm (Takenaka et al., 2001), de NPs d'Au de 4-5 nm (Sung et al., 2011) et par des souris de NPs de TiO₂ de 40 nm (Rossi et al., 2010a). L'ampleur de la translocation extrapulmonaire des NPs est par contre variable, et dépend de la taille des NPs, de leurs caractéristiques de surface et de leur composition chimique (Nel et al., 2006).

1.2.5.1.3 Tractus gastro-intestinal

Les NPs inhalées peuvent être avalées à la suite de la clairance mucociliaire (Aschberger et al., 2010). L'utilisation à grande échelle des NPs pourrait signifier leur présence dans l'eau ou sur les aliments, conduisant à leur ingestion. Pour l'instant, peu d'études ont cherché à évaluer l'absorption des NPs via le tractus gastro-intestinal, mais parmi celles-ci, la plupart montrent que les NPs peuvent être absorbées par cette voie (Yamago et al., 1995; Oberdorster et al., 2005b; Baek et al., 2012). La charge serait une propriété déterminante dans l'efficacité d'absorption, car des études ont montré que les NPs chargés positivement étaient absorbés plus efficacement via le tractus gastro-intestinal que celles

chargées négativement ou neutre (Florence, 1997; Hussain et al., 2001; Janes et al., 2001; Florence, 2004). Jani et al. ont montré que la taille des NPs a aussi une influence, car les NPs de 50 et 100 nm avaient respectivement une efficacité d'absorption de 34% et 26% (Jani et al., 1990). Chung et al. ont rapporté trois cas d'argyrie systémique à la suite de l'ingestion de NMs colloïdaux à base d'Ag (Chung et al., 2010). L'argyrie est une décoloration de la peau résultant de l'accumulation de l'Ag dans le corps pour une période prolongée (Van de Voorde et al., 2005). Cela suggère une absorption des NMs au niveau du tractus intestinal chez l'humain.

1.2.5.2 Biodistribution

À la suite de leur absorption, les NPs sont distribuées via la circulation sanguine. De façon générale, le foie est le principal site où se retrouvent les NPs, suivi par la rate (Oberdorster et al., 2005b; Nikolic et al., 2009; Baek et al., 2012). Par contre les résultats montrent que cette distribution est influencée par la taille des NPs (Hagens et al., 2007). De Jong et al. ont montré que les petites NPs d'or (10 nm) étaient distribuées de façon très répandue chez les rats à la suite d'une injection par intraveineuse, puisqu'on en détectait dans plusieurs organes (foie, rate, reins, testicules, thymus, coeur, poumons et cerveau), alors que les NPs de 50 et 100 nm étaient uniquement détectées dans le foie et la rate (De Jong et al., 2008). Hillyer et Albrecht ont évalué chez des souris la distribution des NPs d'Au à la suite d'une administration orale, et également observé une distribution plus répandue des NPs plus petites (Hillyer & Albrecht, 2001). Une autre étude a comparé la distribution selon la taille (20 et 70 nm) de NPs de ZnO chez des rats à la suite d'une administration orale et mesuré une distribution au niveau du foie, des reins et des poumons similaire pour les deux tailles de particules (Baek et al., 2012). Lorsque les NPs sont absorbées par inhalation, Takenaka et al. ont observé une distribution au niveau des poumons, du foie et du cerveau chez les rats exposés à des NPs d'Ag (Takenaka et al., 2001). D'autres études ont aussi montré une distribution à d'autres organes, soit le coeur, les reins et la rate, mais à la suite d'une exposition à des NPs ou des particules ultrafines à base de carbone (Oberdorster et al., 2002; BeruBe et al., 2007). Ces résultats montrent une biodistribution différente selon les caractéristiques physico-chimiques des NPs et le type d'administration.

1.2.5.3 Métabolisme et Élimination

Les études sur le métabolisme et l'élimination des NPs permettent d'établir la demi-vie *in vivo* des NPs en fonction de leurs propriétés. Peu d'études ont cherché à déterminer si les NMs pouvaient être métabolisés. Kagan et al. ont montré *in vitro* que les nanotubes de carbone peuvent être biodégradés par les neutrophiles à l'aide notamment des enzymes myéloperoxydase et NADPH oxydase (Kagan et al., 2010). Cela suggère une métabolisation possible des différents types de NMs. Les NPs d'oxydes de métaux seraient-elles liées par des métallothionéines au niveau du foie avant d'être excrétées (Hagens et al., 2007). La clairance rénale serait une voie d'élimination possible des NPs. Une étude effectuée à l'aide de nanotubes de carbone injectés à des souris par intraveineuse a montré une élimination rapide par excrétion rénale des nanotubes sans que ceux-ci n'aient subi de modification ou n'aient été retenus par un organe (Singh et al., 2006). L'élimination des NPs de ZnO à la suite de leur administration orale chez des rats était relativement rapide, soit d'environ 72h, et s'effectuait un peu via l'urine, mais principalement via les fèces (Baek et al., 2012). Cette étude comparait le comportement de NPs de 20 et 70 nm, et la seule différence observée fut l'élimination légèrement plus rapide des NPs de 20 nm. Deux autres études effectuées chez des rats exposés par voie orale ou par injection à des NPs de fullerène ont montré une élimination relativement lente des NPs via les fèces, probablement à cause de leur hydrophobicité élevée (Yamago et al., 1995; Mori et al., 2006).

1.2.5.4 Comportement intracellulaire

Les NPs, une fois distribués, risquent de se retrouver à l'intérieur des cellules, mais cette entrée dépend du type cellulaire exposé. Greulich et al. ont par exemple exposé durant 24h aux NPs d'Ag des PBMCs, et ont observé la présence de NPs dans le cytoplasme des monocytes, mais non dans celui des lymphocytes (Greulich et al., 2011). Les cellules phagocytaires seraient donc davantage portées à internaliser les NPs par un processus de phagocytose avec la médiation des récepteurs, tel que démontré à l'aide de macrophages murins (Singh & Ramarao, 2012). AshaRani et al. ont, quant à eux, observé, à l'aide de cellules d'un glioblastome humain et de fibroblastes humains, que l'entrée des NPs d'Ag à l'intérieur des cellules était réduite si celles-ci étaient incubées à une température plus faible, ce qui indique que le passage de ces NPs se ferait principalement par endocytose (AshaRani et al., 2009). L'entrée des NPs pourrait s'effectuer par d'autres mécanismes, car Rothen-Rutishauser et al. ont observé la présence de NPs d'Au et de TiO₂ dans des érythrocytes exposés à ces NPs, et ce malgré le fait que ceux-ci ne possèdent pas de récepteurs pour la phagocytose (Geiser et al., 2005; Rothen-Rutishauser et al., 2006). Les NPs peuvent donc entrer par d'autres mécanisme, soit par diffusion ou en traversant via

les canaux transmembranaires (Hagens et al., 2007). Le comportement intracellulaire des NPs reste peu compris (AshaRani et al., 2009). Il a été montré, à l'aide de NPs de différentes tailles et compositions chimiques, que leur mobilisation s'effectuerait principalement vers la mitochondrie, ce qui affecterait son fonctionnement (Foley et al., 2002; Li et al., 2003; Savic et al., 2003). Les NPs très petites, tel qu'observé à l'aide de NPs d'Au de 3,7 nm, seraient en mesure de pénétrer dans le noyau des cellules (Gu et al., 2009).

1.2.6 Production d'espèces réactive d'oxygène

Les espèces réactive d'oxygène (ROS) sont des molécules ou des ions formés à la suite de la réduction incomplète par un électron de l'oxygène (Pan et al., 2009). Elles incluent les radicaux libres, tel l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyl ($\cdot OH$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Elles sont constamment générées en conditions normales et résulte d'un métabolisme anaérobique de la cellule (Arora et al., 2012). Les cellules possèdent une défense d'antioxydants formée du glutathion réduit, un tripeptide, et de certaines enzymes. L'accumulation de ROS peut conduire à une condition de stress oxydatif, qui résulte d'un déséquilibre à l'avantage de la génération de ROS par rapport aux fonctions de défense de la cellule (You et al., 2012). En situation de stress oxydatif, les ROS peuvent réagir avec l'ADN, les protéines, les hydrates de carbone et les lipides et ainsi causer des dommages pouvant éventuellement provoquer la mort cellulaire par apoptose ou nécrose (Arora et al., 2012). La mitochondrie est un site majeur de production de ROS à l'intérieur de la cellule. Lors de la phosphorylation oxydative, l'oxygène est réduit en eau par l'ajout d'électrons au cours de la chaîne respiratoire (AshaRani et al., 2009). Parmi ces électrons, certains sortent de la chaîne et réagissent avec des molécules d'oxygène pour former l'anion superoxyde, qui est ensuite convertit en peroxyde d'hydrogène, qui lui va éventuellement être totalement réduit en eau (Boonstra & Post, 2004). Les agents toxiques peuvent augmenter le taux de production d'anion superoxyde, soit en bloquant le transport des électrons, ou en acceptant un électron d'une protéine de la chaîne pour le transférer à une molécule d'oxygène (Turrens, 2003).

Plusieurs NPs de compositions chimiques variées augmenteraient le niveau de stress oxydatif. Cet effet fut démontré pour différents type de NMs, incluant les NPs de ZnO, SiO₂, TiO₂ et les nanotubes de carbone (Nel, 2005; Park et al., 2008; Yang et al., 2009) et dans plusieurs types cellulaires, dont les cellules épithéliales pulmonaires, macrophages, fibroblastes et lymphocytes T

(Kang et al., 2008; Park et al., 2008; Yang et al., 2009; Sohaebuddin et al., 2010). Certains mécanismes sont considérés pour expliquer comment les NPs augmentent le niveau de stress oxydatif. La génération de ROS peut provenir de la surface des particules dû à leurs propriétés semiconductrice et électronique, résulter d'une perturbation du transfert des électrons au niveau de la mitochondrie ou d'une dysfonction des enzymes antioxydantes induite par les NPs (Xia et al., 2008b). Des études ont démontré une augmentation des ROS dans des systèmes *in vitro* en absence de cellules, ce qui suggère une dérivation des radicaux à leur surface (Dunford et al., 1997; Wamer et al., 1997; Hirakawa et al., 2004). Par contre ces études étaient effectuées en exposant des NPs de TiO₂ aux rayons UV, et c'est l'absorption de la lumière UV par ces NPs qui catalyserait la formation de radicaux hydroxyles à leur surface (Dunford et al., 1997). En absence de lumière, ces effets sont beaucoup moins concluants (Donaldson et al., 2002; Dick et al., 2003). De façon générale, le potentiel de la membrane mitochondriale est mesuré pour évaluer si les NPs agissent au niveau de la mitochondrie. Des études ont démontré une altération de l'intégrité de la membrane mitochondriale à la suite de l'exposition à plusieurs catégories de NPs et sur plusieurs types cellulaires (Hussain et al., 2005; Kang et al., 2009; Sohaebuddin et al., 2010). Plusieurs études ont mesuré une diminution de l'activité des enzymes antioxydantes, notamment de la catalase et de la superoxyde dismutase, de même qu'une réduction du glutathion réduit à la suite d'une exposition à différents types de NPs, ce qui aggraverait les dommages oxydatifs induits par les NPs (Arora et al., 2008; Carlson et al., 2008; Srinivas et al., 2012).

Lorsque l'on compare la génération de ROS par les différents types de NPs, des variations importantes sont mesurées. Certaines études ont testé la toxicité de plusieurs types de NPs en parallèle avec le même système *in vitro*, permettant ainsi d'établir une comparaison entre les différents types testés. Les résultats de ces études varient considérablement. Par contre, de façon générale, les NPs d'oxydes de métaux, notamment celles de ZnO et TiO₂, augmentent de façon plus importante le niveau de stress oxydatif en comparaison aux NPs de métaux pur et celles à base de carbone, à l'exception des NPs d'Ag qui génèrent généralement une quantité importante de ROS (Hussain et al., 2005; Xia et al., 2008b; Yang et al., 2009; Sohaebuddin et al., 2010; Comfort et al., 2011a). D'autres NPs ont plutôt un effet antioxydant, soit les NPs de CeO₂ et les fullerenols (Xia et al., 2008b; Yin et al., 2009). La taille a aussi une influence sur la production de ROS, car les NPs de plus petites dimensions génèrent généralement davantage de stress oxydatif (Sohaebuddin et al., 2010).

1.2.7 Cytotoxicité

L'induction de la production de ROS par les NPs et les dommages oxydatifs qui en résulte représentent maintenant le paradigme établi quant au mécanisme de toxicité de plusieurs NPs (Donaldson et al., 2004; Nel et al., 2006; Xia et al., 2008b). Une accumulation des ROS affecte les pores de transition membranaire de la mitochondrie, perturbant ainsi le transport des électrons et induisant une libération de facteurs apoptogènes, comme le cytochrome C, ce qui conduit subséquemment à l'apoptose, la mort cellulaire programmée (Gloire et al., 2006; Chen & Schluesener, 2008). Les études *in vitro* montrent en effet qu'à certaines concentrations, les NPs peuvent induire la mort cellulaire par apoptose, et la diminution du potentiel de la membrane mitochondriale serait responsable de cette induction (Sohaebuddin et al., 2010). Les concentrations induisant une mort cellulaire diffèrent selon le type de NPs, mais sont généralement très élevées. Hussain et al. ont traité une lignée d'hépatocytes de rat (BRL 3A) à plusieurs types de NPs, et mesuré une diminution de 50% de la viabilité à la suite d'une exposition aux NPs d'aluminium (Al) et de Fe₃O₄ à une concentration de 250 µg/ml, soit une concentration relativement extrême, alors que pour les NPs d'Ag, la concentration pour obtenir le même effet était d'environ 25 µg/ml (Hussain et al., 2005). Cette toxicité plus grande des NPs d'Ag a également été mesurée à la suite de l'exposition de macrophages alvéolaires murins (RAW 267.9) en comparaison avec huit autres types de NMs (Soto et al., 2005).

Pour démontrer l'importance des ROS dans l'induction de l'apoptose, certaines études ont utilisé des antioxydants dans le but de déterminer si cela permet de contrer la toxicité des NPs. Shi et al. ont observé une diminution de l'apoptose induite par les NPs de TiO₂ sur une lignée de cellules épithéliales des bronches (BEAS-2B) lorsque les cellules étaient pré-incubées avec la N-acétylcystéine (NAC) (Shi et al., 2010). Posgai et al. ont quant à eux exposé des drosophiles aux NPs d'Ag en co-traitant ou non avec l'acide ascorbique et constaté que celle-ci permet de renverser partiellement ou totalement les effets toxiques mesurés (Posgai et al., 2011). De la même façon, Sayes et al. ont pu contrer la peroxydation des lipides résultant d'une exposition aux NPs de C₆₀ (Sayes et al., 2004).

Une augmentation du stress oxydatif peut causer des dommages à l'ADN chez les cellules de mammifères qui vont, s'ils sont importants, induire l'apoptose (Fulda et al., 2010). Des dommages à l'ADN importants induisant l'apoptose ont été mesurés à la suite de l'exposition de différents types cellulaires à des NPs de Pt, de lymphocytes T de culture primaire à des NPs de TiO₂, et de cellules épidermiques humaines (A431) à des NPs de ZnO (Kang et al., 2008; Sharma et al., 2009; Asharani et

al., 2010). Karlsson et al. ont comparé les dommages causés à l'ADN par huit types de NMs différents sur des cellules épithéliales du poumon (A549), et mesuré des dommages par cinq des huit NMs, dont les NPs de TiO₂, ZnO et les nanotubes de carbone, alors que les NPs de Fe₃O₄ ne causaient pas de génotoxicité (Karlsson et al., 2008). La composition des NPs aurait donc une influence sur les dommages à l'ADN qu'elles engendrent.

La taille des NPs a une importante influence sur les niveaux de toxicité. Yen et al. ont comparé la cytotoxicité de NPs d'Ag et Au de trois dimensions différentes (2-4 nm, 5-7 nm et 20-40 nm) sur une lignée de macrophages murins (J774 A1) et mesuré une diminution de la viabilité plus importante à la suite d'une exposition aux plus petites NPs tant pour les NPs d'Ag que d'Au (Yen et al., 2009). Sohaebuddin et al. ont également comparé la cytotoxicité de nanotubes de carbone à parois multiples de plusieurs tailles (< 8 nm, 20-30 nm et > 50 nm), et mesuré une cytotoxicité plus grande dans le cas des plus petits nanotubes sur les cellules épithéliales bronchiolaires, mais une relation inverse avait lieu lorsque des macrophages (RAW 264.7) étaient exposés (Sohaebuddin et al., 2010). Ce résultat pourrait s'expliquer par la différence quant au comportement intracellulaire des NPs selon le type cellulaire avec lequel celles-ci interagissent. Xia et al. ont observé à l'aide de macrophages (RAW 264.7) et de cellules épithéliales bronchiolaires (BEAS-2B), par microscopie électronique et par études confocales, en marquant les NPs avec un composé fluorescent, que l'entrée et le comportement intracellulaire de NPs d'oxyde métallique étaient distincts pour les deux types cellulaires (Xia et al., 2008b).

La génération de ROS est le facteur clé dans l'initiation de la toxicité des NPs. Par contre, l'établissement du mécanisme complet par lequel les NPs agissent est complexe dû à l'inconsistance des études publiées. Par exemple, pour les études portant sur les NPs de TiO₂, certaines observent une peroxydation des lipides, des dommages à l'ADN, suivi d'une activation des caspases et finalement de la mort cellulaire par apoptose (Gurr et al., 2005; Kang et al., 2008; Park et al., 2008). D'autres études rapportent plutôt des dommages à la membrane plasmique et une diminution de la fonction mitochondriale (Hussain et al., 2005; Sayes et al., 2006; Thevenot et al., 2008). Puis certaines n'observent pas de dommages à la membrane, d'induction des caspases ou de mort cellulaire (Thibodeau et al., 2003; Singh et al., 2007). Ces différences résultent des variations dans les procédures expérimentales, soit notamment la taille des NPs, les types cellulaires exposés et le niveau de dispersion/agglomération des NPs (Sohaebuddin et al., 2010).

1.2.8 Inflammation

La méthodologie des études *in vivo* portant sur l'effet inflammatoire des NPs consiste le plus souvent à instiller les NPs à des souris ou des rats pour ensuite évaluer la réponse inflammatoire. Pour ce faire, un lavage broncho-alvéolaire (BAL) est effectué après un certain nombre d'heures ou de jours et le liquide récolté est analysé. La quantité de neutrophiles est évaluée, car une augmentation de leur nombre dans le fluide du BAL est un indicateur sensible d'une inflammation induite au niveau des poumons (Henderson, 2005). La production de certaines cytokines peut aussi être quantifiée, soit principalement le TNF- α , l'IL-8 et MIP-2. Le TNF- α est une cytokine pro-inflammatoire rapidement et principalement libérée par les macrophages résidents, et qui favorise l'influx des neutrophiles (Ban et al., 2012). *In vitro*, les études montrent que la production de TNF- α par les macrophages alvéolaires est induite par plusieurs types de NPs (Dick et al., 2003; Xia et al., 2008b). De plus, ces recherches ont montré que les ROS auraient un rôle prépondérant à jouer dans le processus d'induction, car la production est bloquée en présence de l'antioxydant NAC (Dick et al., 2003). L'IL-8 est quant à lui un agent chimiotactique des neutrophiles important au niveau des poumons (Kunkel et al., 1991). Singh et al. ont évalué *in vitro* l'effet de NPs de TiO₂ (20-80 nm) et de particules fines de TiO₂ (40-300 nm) sur la libération d'IL-8 par des cellules épithéliales de poumons humaines (lignée A549) (Singh et al., 2007). Ils ont mesuré une augmentation de la production uniquement à la suite d'une exposition aux NPs, alors que les particules fines n'avaient aucun effet. Ces résultats corrélaient également avec la production de ROS mesurée, car l'exposition aux NPs générait une augmentation du stress oxydatif beaucoup plus importante qu'une exposition aux particules fines. La protéine MIP-2 est également un important agent chimiotactique des neutrophiles (El-Achkar et al., 2011). La quantité de MIP-2 dans le fluide du BAL de rats ayant subi une instillation de NPs de noir de carbone et de Co est augmentée seulement 4h après l'instillation (Dick et al., 2003). Cette augmentation est également accompagnée d'un influx de neutrophiles. Aucune infiltration de neutrophiles ne fut mesurée lorsque des NPs de TiO₂ étaient instillées pour cette même étude. Ce résultat est en contradiction avec celui d'une autre équipe qui a observé que l'instillation intratrachéale de NPs de TiO₂ fines (250 nm) et ultrafines (20 nm) chez des rats et des souris engendrait une infiltration des neutrophiles pour les deux dimensions de particules (Oberdorster, 2000). L'infiltration était beaucoup plus importante dans le cas des NPs ultrafines, mais lorsque les doses instillées étaient exprimées par l'aire de surface, la réponse des neutrophiles était la même pour les deux dimensions. Ce qui montre que pour des particules de tailles différentes, mais de même composition, l'aire de surface est une meilleure mesure de la dose que la masse ou le nombre de particules (Oberdorster, 2000). Lorsque les expositions par instillation aux NPs sont répétées, une

tolérance est induite, car l'infiltration des neutrophiles mesurée redevient similaire au contrôle sans NPs (Wesselkamper et al., 2001; Rossi et al., 2010b; Ban et al., 2012). Des études ciblant d'autres aspects de la réponse immunitaire ont aussi été réalisées et permettent d'effectuer une analyse plus complète de l'effet des NPs sur chaque type cellulaire formant le système immunitaire. Elles seront détaillées plus loin pour chacune des NPs avec lesquelles les travaux ont été réalisés.

1.2.9 Interférence au niveau des voies de signalisation

Encore peu d'études en nanotoxicologie ont cherché à établir l'effet des NPs au niveau moléculaire, c'est-à-dire sur l'expression des gènes et protéines. Des niveaux intermédiaires de ROS peuvent agir comme second messenger dans la transduction de signaux et dans la régulation des gènes d'une grande variété de types cellulaires et dans plusieurs conditions biologiques (Lander, 1997; Hensley et al., 2000). Le H₂O₂ est la principale ROS impliquée dans la signalisation cellulaire, car il inhibe les tyrosine phosphatases en oxydant les résidus cystéine au niveau du site catalytique, ce qui a pour effet de favoriser l'activité des tyrosine kinases et les cascades signalétiques en aval (Aslan & Ozben, 2003; Tonks, 2005). La présence de ROS peut aussi déclencher une réponse inflammatoire via l'activation de la voie de signalisation NF- κ B et des protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK) (Schreck et al., 1991; Xiao et al., 2003). Le facteur de transcription NF- κ B joue un rôle important dans plusieurs processus cellulaires, tel l'inflammation, l'immunité, la prolifération et l'apoptose (Hayden & Ghosh, 2004). En état de repos, NF- κ B est séquestré dans le cytoplasme par les protéines inhibitrices I κ B, qui, à la suite de l'activation des cellules, sont rapidement phosphorylées et dégradées par le protéasome, libérant NF- κ B qui entre alors dans le noyau pour réguler l'expression de plusieurs gènes (Hayden & Ghosh, 2004). La famille des MAPK est composée de trois principales kinases, soit les kinases régulées par un signal extracellulaire 1 et 2 (ERK1/2), les kinases c-Jun N-terminal (JNK) et p38 (Kang et al., 2009). JNK et p38 sont des régulateurs importants dans la transmission de signaux pro-apoptotiques (Reddy et al., 2003).

L'action des NPs au niveau du stress oxydatif suggère qu'elles pourraient agir sur certaines voies de signalisation. Des études ont confirmé que certains types de NPs pouvaient modifier le niveau d'activation de protéines influencées par le stress oxydatif. Kang et al. ont évalué l'effet de NPs de TiO₂ sur l'activation des MAPK ERK1/2, p38 et JNK suite au traitement de lymphocyte T et mesuré une augmentation de l'activation de p38 et JNK (Kang et al., 2009). L'effet des NPs sur les voies de

signalisation est fréquemment associé à leur effet toxique. Lors de la même étude, en traitant avec des inhibiteurs contre p38 et JNK, une diminution de la quantité de cellules apoptotiques était mesurée, suggérant un rôle important de p38 et JNK dans l'apoptose induite par les NPs de TiO₂ (Kang et al., 2009). Rallo et al. ont effectué un criblage à haut débit de l'effet de sept NPs métalliques et d'oxyde métalliques de 8 à 20 nm sur dix importantes voies de signalisation à la suite de l'exposition de macrophages murins (RAW 264.7) pour des durées de 3 à 24h (Rallo et al., 2011). Pour les voies de signalisation associées à l'inflammation, soit NF-κB, MAPK/JNK et MAPK/ERK1/2, une régulation à la hausse fut mesurée à la suite de l'exposition aux NPs d'Ag, Fe₃O₄ et SiO₂, alors que les NPs de Pt et ZnO engendraient une diminution. Ces dernières augmentaient de façon significative les voies p53 et c-Myc, deux voies associées à des dommages à l'ADN et à l'induction de l'apoptose, ce qui est en accord avec deux études citées plus haut qui mesuraient des dommages à l'ADN par ces deux types de NPs (Sharma et al., 2009; Asharani et al., 2010). Asharani et al. avaient eux aussi observé une augmentation de la phosphorylation de la protéine p53 à la suite de l'exposition aux NPs de Pt (Asharani et al., 2010). Les NPs de TiO₂ activeraient aussi la protéine p53 à la suite de l'induction de dommages à l'ADN, tel qu'observé avec des lymphocytes T de culture primaire (Kang et al., 2008). Il a été montré que les NPs agiraient au niveau de l'activation du facteur de transcription NF-κB pour augmenter la synthèse d'IL-8 par les cellules épithéliales pulmonaires, car une augmentation du niveau de dégradation de IκB combinée à une augmentation de la production d'IL-8 fut mesurée à la suite de l'exposition de cellules A549 à des NPs de quartz et TiO₂ (Schins et al., 2000). Romoser et al. ont comparé le niveau d'activation du facteur de transcription NF-κB et des protéines ERK1/2 à la suite d'une exposition de fibroblastes dermiques humains à quatre différents types de NPs, soit des NPs d'Ag, fullerenol, quantum dots et TiO₂ (Romoser et al., 2012). Ils ont mesuré, pour chacune des NPs, une augmentation rapide de la phosphorylation des protéines IκB et ERK1/2 dans les minutes suivant l'exposition. Ce niveau de phosphorylation diminuait à des niveaux normaux après une heure. Toutefois, les NPs d'Ag induisaient une augmentation constante jusqu'à trois heures après le début de l'exposition. Malgré le fait que les NPs de TiO₂ et d'Ag étaient celles qui généraient le plus de stress oxydatif, tel que mesuré par le niveau de glutathion oxydé, les NPs d'Ag déclenchaient une réponse de NF-κB et ERK1/2 beaucoup plus élevée que celles de TiO₂. Ces résultats montrent que la production des ROS n'est pas le seul facteur responsable de l'activation des voies de signalisation par les NPs.

1.2.10 Nanoparticules utilisées

Au cours de nos travaux, trois types différents de NPs ont été utilisés, soit des NPs d'Ag, C₆₀ et ZnFe₂O₄. Ces trois NPs présentent des propriétés très différentes, ce qui permet d'établir des comparaisons claires entre leur niveau de réactivité, soit l'élément majeur influençant les interactions avec les cellules. Les NPs d'Ag et de C₆₀ sont parmi les plus utilisées sur le marché actuellement, d'où l'intérêt de bien comprendre leurs effets toxique. Les NPs de ZnFe₂O₄ présentent une utilisation moins importante aujourd'hui et, ce faisant, très peu d'études en nanotoxicologie publiées à ce jour ont porté sur ces NPs.

1.2.10.1 Nanoparticules d'Argent

La toxicité des NPs d'Ag sur les microorganismes pourrait aussi être observée chez les cellules humaines (AshaRani et al., 2009). À de fortes concentrations, les NPs d'Ag peuvent induire l'apoptose des cellules humaines, et ce via des dommages à la mitochondrie (You et al., 2012). Le stress oxydatif a été rapporté comme étant le mécanisme de toxicité le plus important associé à une exposition aux NPs d'Ag (Eom & Choi, 2010; Posgai et al., 2011). Ces NPs pourraient augmenter le stress oxydatif par leur interaction avec les protéines et enzymes possédant des groupements thiol, de la même manière qu'ils agissent sur les bactéries (Chen & Schluesener, 2008). Ces protéines et enzymes sont souvent des composants clés de la défense antioxydante cellulaire, comme le glutathion, la superoxyde dismutase et la thioredoxine peroxydase, et les NPs d'Ag, en diminuant ces mécanismes de défense, engendre une accumulation des ROS (Chen & Schluesener, 2008). Les protéines possédant des groupements thiol sont abondantes dans la membrane cellulaire également, ainsi les NPs d'Ag causeraient aussi des dommages à la membrane (Chen & Schluesener, 2008). Un second mécanisme d'action implique une interaction de surface des NPs d'Ag au niveau de la mitochondrie où il y aurait réduction univalente de l'oxygène en superoxyde à partir des électrons circulant dans la chaîne de transport, plus particulièrement au niveau de la flavoprotéine (Costa et al., 2010; You et al., 2012). Les NPs d'Ag libéreraient des ions d'Ag, et ceux-ci contribueraient également à leur toxicité en se liant aux protéines et acides nucléiques, interférant ainsi dans leurs fonctions (You et al., 2012).

Des études ont cherché à identifier les voies de signalisation impliquées dans le processus d'apoptose induit par les NPs d'Ag. La voie de JNK activée par les ROS a été identifiée comme une voie clé dans cette induction lors de l'exposition de fibroblastes NIH3T3 et IMR-90 et de cellules d'un glioblastome (U251) (Hsin et al., 2008; Asharani et al., 2012). À l'aide de cellules T Jurkat, une

augmentation de la phosphorylation de p38 et de la translocation dans le noyau de NF- κ B furent mesurées, alors que les niveaux de phosphorylation de JNK et ERK1/2 restaient constants (Eom & Choi, 2010). Le stress oxydatif généré par les NPs d'Ag peut aussi causer des dommages à l'ADN (Hsin et al., 2008; Eom & Choi, 2010; Asharani et al., 2012). Ces dommages résultent de la production de ROS, car un traitement avec le NAC permet de les réduire considérablement (Foldbjerg et al., 2011). Cette génotoxicité des NPs d'Ag induit la phosphorylation de la protéine p53 chez les cellules de glioblastome (U251) (Asharani et al., 2012). La génotoxicité peut être provoquée par une action directe des particules, mais peut aussi résulter d'un effet indirect dû à l'activation de cellules inflammatoires, notamment des macrophages, ce qui génère des ROS (Martin et al., 1997; Kirsch-Volders et al., 2003). Les dommages à l'ADN peuvent induire la libération de cytokines inflammatoires, tel que démontré en exposant des cellules épithéliales aux rayons UV (Nishigori et al., 1996; O'Connor et al., 1996).

L'effet des NPs d'Ag sur la production de certaines cytokines a été évalué chez plusieurs types cellulaires dans le but de déterminer si ces NPs ont un effet pro ou anti-inflammatoire. Greulich et al. ont mesuré par ELISA la production d'IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8 et TNF- α à la suite de l'exposition aux NPs d'Ag des (Algood et al., 2005) cellules T stimulées avec la concanavaline A (ConA) (Greulich et al., 2011). Ces cytokines servent de marqueurs pour déterminer le niveau d'activation des cellules T, et la ConA est un mitogène des cellules T CD4. Les résultats obtenus montrent une diminution de la production d'IL-1ra, alors que dans le cas de l'IL-8, sa production était fortement augmentée, de même que celle de l'IL-6, mais dans une moindre mesure. Pour l'IL-2, l'IL-4 et le TNF- α , aucun effet significatif ne fut mesuré. L'exposition de macrophages alvéolaires de rat à des NPs d'Ag enrobées d'hydrocarbures cause une augmentation de la production de TNF- α , MIP-2 et d'IL-1 β (Carlson et al., 2008). Une augmentation de l'expression du TNF- α par les NPs d'Ag a également été mesurée en fonction de la dose de NPs lors de l'exposition de macrophages péritonéales de souris (RAW 264.7) (Park et al., 2010c). Le même effet a aussi été rencontré à la suite de l'exposition de kératinocytes humains à des NPs d'Ag, combiné à une augmentation de la production d'IL-1 β , IL-6 et IL-8 (Samberg et al., 2010). Dans cette étude, un effet pro-inflammatoire des NPs d'Ag a aussi été mesuré *in vivo* à la suite de l'application de NPs d'Ag sur la peau de porc. Des conclusions similaires sont tirées de l'étude de Cha et al., qui ont gavé des souris avec une seule dose de 2,5 g de NPs d'Ag, et observé, lors de l'analyse effectuée trois jours après l'administration, une infiltration focale de lymphocytes au niveau des intestins (Cha et al., 2008). Une inflammation à la suite de l'inhalation chronique de NPs d'Ag a aussi été mesurée chez des rats exposés durant 13 semaines à raison de 6h par jour (Sung et al., 2009). Les résultats montraient une infiltration de cellules inflammatoires et la présence de lésions

granulomateuses au niveau des poumons. Tous ces résultats vont dans le sens d'un effet pro-inflammatoire provoqué par les NPs d'Ag.

Paradoxalement, d'autres études ont plutôt observé des effets anti-inflammatoires. Shin et al. ont mesuré une diminution de la réponse de PBMCs à la phytohémagglutinine (PHA) lorsque des NPs d'Ag de 5 nm étaient présentes. L'effet était mesuré en évaluant la synthèse d'IL-5, IFN- γ et TNF- α (Shin et al., 2007). De plus, une autre étude a plutôt montré une diminution de la production de TNF- α par des macrophages (RAW 264.7 et J774.1) en présence de NPs d'Ag (Wong et al., 2009). La différence dans la méthodologie par rapport à l'étude de Park et al. citée auparavant est que dans ce cas-ci, les macrophages étaient stimulés avec du LPS pour maximiser la production de TNF- α . Des tests *in vivo* ont aussi été réalisés dans cette étude en effectuant une incision au niveau du colon chez des souris sous anesthésie, et en injectant ensuite des NPs d'Ag dans la cavité péritonéale. Au 14^e jour après l'opération, l'analyse histologique des tissus péritonéaux a montré une diminution par rapport au contrôle de l'infiltration de cellules entre le muscle et les couches péritonéaux, signifiant une réduction de l'inflammation en présence de NPs d'Ag. Une diminution de la production d'IFN- γ a aussi été mesurée chez les animaux. En comparaison aux études *in vivo* exposées précédemment qui mesuraient un effet pro-inflammatoire, celle-ci s'effectue dans un modèle où l'animal subit d'abord une blessure avant d'être exposé aux NPs. Dû à l'utilisation récente des NPs d'Ag comme agent antimicrobien dans des crèmes antiseptiques et des pansements, des études ont cherché à déterminer l'effet de ces nouveaux produits sur le système immunitaire. Il fut observé chez des souris ayant subi une brûlure, que l'utilisation de pansements contenant des NPs d'Ag accélère la guérison (Tian et al., 2007). Cela résulterait d'un effet anti-inflammatoire mesuré par une quantité inférieure de neutrophiles et de l'expression d'ARNm d'IL-6, TGF- β , IL-10 et IFN- γ . Dans des modèles murin et porcine de dermatite de contact, il a été démontré que la présence des NPs d'Ag réduit l'érythème en fonction de la dose, réduit l'expression du TNF- α , TGF- β et IL-8 et induit l'apoptose des cellules inflammatoires (Bhol et al., 2004; Bhol & Schechter, 2005; Nadworny et al., 2008; Nadworny et al., 2010). En conclusion, les NPs d'Ag auraient un effet anti-inflammatoire *in vivo* lorsque l'animal est dans un état pro-inflammatoire.

Peu d'études ont évalué si les NPs d'Ag pouvaient interférer dans la réponse cellulaire aux cytokines ou aux agents mitogènes (LPS, PHA, ConA). Greulich et al. (2011) ont étudié l'effet de NPs d'Ag de 70 ± 20 nm enrobées de polyvinylpyrrolidone, un polymère permettant de stabiliser les NPs pour éviter qu'elles s'agglomèrent, sur la prolifération des cellules T à la suite d'une stimulation avec la ConA pour une durée allant jusqu'à 7 jours (Greulich et al., 2011). Les résultats n'ont montré aucun

effet significatif des NPs sur la réponse proliférative à la ConA. Shin et al. ont évalué l'effet de NPs d'Ag sur la prolifération des cellules, mais à l'aide de NPs de plus petites dimensions (5 nm et moins) et en stimulant les cellules avec la PHA (Shin et al., 2007). Ils ont observé, contrairement à l'étude précédente, une diminution de la prolifération en présence des NPs d'Ag. Deux autres études ont comparé l'effet de NPs sur la prolifération de cellules, mais en réponse à l'EGF et au VEGF, avec une lignée de cellules épithéliales humaines (A431) et de cellules bovines endothéliales de la rétine respectivement (Gurunathan et al., 2009; Comfort et al., 2011a). Ces études étant davantage axé sur une approche mécanistique, leurs résultats ont permis de montrer que les NPs d'Ag interfèrent dans la voie PI3K/Akt, car une diminution de la phosphorylation de la protéine Akt et de l'activité de la PI3K en présence des NPs a été mesurée. Le traitement des cellules A431 avec l'EGF en présence de H₂O₂ n'ayant eu aucun effet, la génération de ROS par les NPs d'Ag est à exclure pour expliquer ces observations (Comfort et al., 2011a). La protéine Akt est une sérine/thréonine kinase jouant un rôle important dans plusieurs processus cellulaires, incluant le métabolisme, la prolifération, la survie cellulaire et l'angiogénèse (Comfort et al., 2011a). Les NPs d'Ag agiraient en inhibant cette voie, car il fut mesuré que l'apoptose résultant d'une exposition aux NPs d'Ag était bloquée lorsque les cellules étaient transfectées avec un plasmide exprimant une forme constitutivement active de la protéine Akt (Gurunathan et al., 2009). Comfort et al. ont également mesuré une diminution du niveau de phosphorylation de ERK1/2 à la suite de l'exposition aux NPs d'Ag (Comfort et al., 2011a). La présence des NPs d'Ag a plutôt tendance à inhiber les principales voies de signalisation, et cela se traduit généralement par une diminution de la prolifération cellulaire.

Les NPs d'Ag sont considérées comme étant le type de NP ayant la plus grande cytotoxicité, et les résultats des études évaluant celle-ci sont généralement en concordance. Par contre, lorsque les effets plus subtils à des doses n'affectant pas la viabilité cellulaire sont analysés, les conclusions des études diffèrent. Ainsi, des effets anti- et pro-inflammatoires sont mesurés. Par contre, dans les études *in vivo*, lorsque l'animal est en condition pro-inflammatoire, les NPs d'Ag montrent un effet anti-inflammatoire. Cette action des NPs d'Ag consolide encore davantage leur utilisation dans les crèmes antiseptiques et les pansements où elles pourraient non seulement protéger contre les infections, mais aussi réduire l'inflammation.

1.2.10.2 Nanoparticules de Fullerène C₆₀

La croissance anticipée de la présence des fullerènes sur le marché implique une exposition directe pour plusieurs des applications, comme les crèmes pour la peau et les systèmes pour cibler l'action de médicaments (Aschberger et al., 2010). L'une des difficultés associées à l'étude de la toxicité des NPs de C₆₀ est que celles-ci sont insolubles dans l'eau (Ruoff et al., 1993). Ce faisant, plusieurs dérivés de ces NPs sont synthétisés afin de les rendre solubles, soit par l'ajout de groupements fonctionnels variés, comme -OH, -COOH, NH₂, etc (Harhaji et al., 2007). De façon générale, les études évaluant la cytotoxicité des NPs de C₆₀ rapportent une excellente biocompatibilité pour ces NPs et ce jusqu'à des doses très élevées (Jia et al., 2005; Fiorito et al., 2006; Porter et al., 2006; Jacobsen et al., 2008). Certaines études ont par contre rapporté une importante cytotoxicité sur plusieurs types cellulaires, incluant des fibroblastes, astrocytes et hépatocytes humains, via l'augmentation des ROS et la peroxydation des lipides (Sayes et al., 2004; Sayes et al., 2005; Isakovic et al., 2006; Harhaji et al., 2007). Par contre, dans chacune de ces études, la suspension de NPs de C₆₀ dans l'eau est obtenue en évaporant le tétrahydrofurane (THF), un solvant organique, d'un mélange de C₆₀/THF/H₂O. Depuis la publication de ces études, il a été montré qu'un produit hautement toxique est formé dans une suspension de C₆₀ et THF, soit la γ -butyrolactone, qui résulte de l'oxydation du THF, ce qui expliquerait l'augmentation de la toxicité des NPs de C₆₀ préparées via cette technique (Henry et al., 2007).

Plusieurs études ne mesurent pas d'effet antioxydant à la suite de l'exposition de cellules à des NPs de C₆₀ ou à ses dérivés, alors qu'il s'agit pourtant de la propriété à la source de leur utilisation (Sayes et al., 2007; Jacobsen et al., 2008; Funakoshi-Tago et al., 2012). Par contre, plusieurs montrent cette activité de captage des radicaux libres. Yin et al. ont observé à partir d'une lignée de cellules pulmonaires humaines (A549), que les NPs de C₆₀(OH)₂₂ avaient un effet protecteur sur la toxicité du H₂O₂ lorsque les cellules étaient prétraitées durant 24h aux NPs avant d'être exposées au H₂O₂ (Yin et al., 2009). Cet effet protecteur s'est traduit par une diminution de la génération de ROS, de la peroxydation des lipides et des dommages au niveau de la mitochondrie. Une autre étude a montré que les particules de C₆₀ protégeraient contre l'irradiation aux rayons UVA, en mesurant une diminution de la cytotoxicité de ceux-ci sur une lignée de kératinocytes humains (HaCaT) en présence des particules de C₆₀ (Xiao et al., 2006). L'effet protecteur des NPs de C₆₀ a aussi été étudié *in vivo* dans un modèle d'exposition au CCl₄ (Gharbi et al., 2005). Pour ce faire, des rats étaient prétraités de façon intrapéritonéale avec des NPs de C₆₀, puis exposés au CCl₄. Ce modèle permet d'étudier les blessures au foie résultant des radicaux libres. Les résultats ont montré une réduction de la toxicité en fonction de la dose de NPs. Ce qui signifie que l'effet protecteur observé est attribuable aux capacités anti-

oxydantes des NPs de C₆₀. Généralement les NPs de C₆₀ non dérivées, donc peu solubles, ne possèdent pas d'effet protecteur et peuvent même avoir un effet toxique via la peroxydation des lipides (Sayes et al., 2007). Il semble que les propriétés anti-oxydantes des fullerènes soient restreintes à certaines formes et dépendent de leur solubilité dans l'eau et de la dose administrée (Aschberger et al., 2010). Un effet similaire est observé par les vitamines anti-oxydantes, comme l'acide ascorbique, qui présentent une activité anti-oxydante à faible dose, mais deviennent pro-oxydantes à des doses plus élevées (Aschberger et al., 2010). Dans le cas des fullerènes, l'observation d'un effet pro-oxydant dans certaines conditions peut résulter du fait que davantage d'agrégats se forment lorsque leur solubilité est faible et les concentrations élevées. Cela a pour effet de réduire leur activité anti-oxydante, car l'aire de surface réduite implique moins de sites disponibles pour réagir avec les ROS (Yin et al., 2009).

L'un des mécanismes par lequel l'inflammation peut être diminuée implique l'élimination des ROS et des radicaux libres (Sadowska et al., 2006). Les NPs de C₆₀ pourraient donc dans certaines conditions avoir un effet anti-inflammatoire (Ryan et al., 2007). Des études montrent par contre l'inverse. Park et al. ont évalué la capacité des NPs de C₆₀ à induire une réponse inflammatoire au niveau des poumons à la suite de leur instillation chez des souris (Park et al., 2010a). Une augmentation en fonction de la dose instillée de la production de cytokines pro-inflammatoires, soit l'IL-1, TNF- α et IL-6, un jour après l'exposition a été observé. Le niveau des cytokines restait élevé pour toute la durée de la période expérimentale, soit aux jours 7, 14 et 28, ce qui suggère que la présence des NPs de C₆₀ aux niveaux des poumons induit des dommages tissulaires de façon continue. Une autre étude a évalué la réponse inflammatoire au niveau des poumons chez des rats en mesurant l'infiltration de neutrophiles à la suite d'une seule instillation (Morimoto et al., 2010). Les résultats montrent que l'infiltration augmentait après 3 jours, mais uniquement à de fortes doses. Roursgaard et al. (2008) ont mesuré une infiltration de neutrophiles et une augmentation dans le fluide BAL du niveau de MIP-2 à la suite de l'instillation pulmonaire à des souris de doses très élevées de fullerénol (Roursgaard et al., 2008). Dans cette même étude, l'effet d'un pré-traitement à des doses plus faible de fullerénol sur la réponse inflammatoire associée à une exposition à des particules de quartz fut également évaluée. Les résultats montrèrent que l'importante infiltration de neutrophiles associée à une exposition au quartz était diminuée d'environ 50% lorsque les souris étaient pré-traitées aux NPs de fullerénol, et les niveaux de MIP-2 dans le fluide BAL diminuaient également lorsqu'il y avait pré-traitement. Donc des effets anti-inflammatoires s'observent à de faibles doses, alors qu'à des doses élevées, un effet pro-inflammatoire est mesuré. Baker et al. ont déterminé l'influence de la présence d'agrégats en exposant par aérosol des rats à des NPs (55 nm) ou des microparticules (0,93 μ m) de C₆₀ 3h par jour durant 10 jours (Baker et

al., 2008). Ils ont mesuré une légère augmentation dans le fluide BAL de TNF- α et IL-1 β chez les rats exposés aux microparticules, alors qu'aucune différence n'était mesurée chez ceux exposés aux NPs. *In vitro*, Liu et al. (2009) ont observé une stimulation des cellules immunitaires par les NPs de C₆₀(OH)₂₀, soit plus particulièrement des cellules T et des macrophages isolés à partir de la rate de souris (Liu et al., 2009). Ils ont mesuré une augmentation de la libération de certaines cytokines, soit particulièrement du TNF- α , mais aussi de l'IL-2 et de l'IFN- γ , toutes des cytokines de type Th₁, alors que la production des cytokines de type Th₂ (IL-4, IL-5 et IL-6) était quant à elle diminuée. *In vivo*, la même étude a montré que cet effet activateur des NPs de C₆₀(OH)₂₀ permet de réduire la croissance tumorale (Liu et al., 2009).

Peu d'études ont cherché à évaluer l'action des NPs de C₆₀ sur les voies de signalisation. Il a été montré que l'effet protecteur du dérivé d'acide malonique C₆₀(C(COOH)₂)₂ sur l'apoptose induite par le H₂O₂ chez les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales résulte d'une action au niveau de JNK (Lao et al., 2009). L'augmentation du niveau de phosphorylation de JNK de même que son substrat c-Jun suite au traitement avec H₂O₂ était inhibée en présence des NPs de C₆₀(C(COOH)₂)₂. Par contre, celles-ci n'avaient aucun effet sur l'augmentation du niveau de phosphorylation de la protéine ERK1/2. Le traitement d'une lignée de cellules murines de la moelle osseuse dérivé de pro-cellules B (Ba/F3) avec des NPs de C₆₀ couplées avec le pyrrolidinium a également mené à une diminution de l'activation de JNK et c-jun, et a aucun effet sur ERK1/2 (Funakoshi-Tago et al., 2012). De plus, aucun effet ne fut mesuré sur certaines protéines situées en aval de la kinase JAK2, soit Stat3, Stat5 et Akt.

En résumé, les NPs de C₆₀ ont des effets divers selon les formes de dérivés et les doses auxquelles ont été exposées les cellules. Les NPs non dérivées ont généralement peu d'effet, sauf à très fortes doses, alors que les formes dérivées hautement solubles et chargées négativement sont celles ayant la plus grande activité anti-oxydante, probablement à cause de leur niveau de dispersion élevée. Elles montrent un potentiel de protection contre le stress oxydatif et l'inflammation.

1.2.10.3 Nanoparticules de Ferrite de Zinc

Les NPs de ZnFe₂O₄ font partie de la catégorie des spinelles ferromagnétiques, qui sont parmi les plus importants NMs magnétiques et sont notamment largement utilisées dans le domaine électronique (Lu et al., 2007). Bien que toutes les NPs faisant partie de cette catégorie présentent des

caractéristiques similaires, la substitution d'un autre élément par du Zn a une influence sur les propriétés de ces NPs. Girgis et al. ont comparé des NPs de CoFe_2O_4 et ZnFe_2O_4 , et observé des propriétés magnétiques supérieures par les NPs de CoFe_2O_4 et des propriétés optiques supérieures dans le cas des NPs de ZnFe_2O_4 (Girgis et al., 2011). Des études récentes ont montré qu'une substitution du Co par le Zn dans les NPs de CoFe_2O_4 augmentait la stabilité chimique et la résistance à la corrosion (Girgis et al., 2011).

Dans le cas de la toxicité de ces NPs en fonction du métal complétant la formule MFe_2O_4 , peu d'études ont évalué cet effet. La toxicité de NPs de Fe_3O_4 , ZnFe_2O_4 et NiFe_2O_4 ayant toutes un diamètre de 20-30 nm a été comparée à la suite de l'exposition de cellules de la lignée HeLa (Tomitaka et al., 2009). Aucune diminution de la viabilité ne fut associée à une exposition aux NPs de Fe_3O_4 . Par contre à des doses élevées, une cytotoxicité fut observée dans le cas des NPs de ZnFe_2O_4 et NiFe_2O_4 . La toxicité de formes dérivées du ZnFe_2O_4 a aussi été mesurée. Beji et al. (2010) ont évalué l'effet sur la fonction mitochondriale de NPs de $\text{Mn}_{0.2}\text{Zn}_{0.8}\text{Fe}_2\text{O}_4$ sur des cellules endothéliales humaines (Beji et al., 2010). Ils ont mesuré une légère diminution seulement après 72h d'exposition, sauf dans le cas de la dose la plus élevée qui diminuait l'activité mitochondriale de façon importante (Beji et al., 2010). La cytotoxicité d'une autre forme de dérivé, le $\text{CuZnFe}_2\text{O}_4$, fut testée, en plus de celle d'autres types de NPs, incluant Fe_3O_4 , ZnO et CuO , sur une lignée de cellules épithéliales de poumons humaines (A549) (Karlsson et al., 2008). La cytotoxicité des NPs de Fe_3O_4 et $\text{CuZnFe}_2\text{O}_4$ était faible et équivalente, alors que celle des NPs de ZnO et CuO était très élevée. La cytotoxicité des NPs de ZnFe_2O_4 serait donc faible et leur effet se comparerait davantage à celui des NPs de Fe_3O_4 qu'aux NPs de ZnO . Comme aucune étude portant sur l'effet d'une exposition aux NPs de ZnFe_2O_4 sur le système immunitaire ou sur les voies de signalisation cellulaires n'a été publiée à ce jour, la suite de cette section se concentrera sur les NPs de Fe_3O_4 .

Certaines études ont cherché à mesurer l'effet sur le système immunitaire des NPs de Fe_3O_4 . À forte dose, il a été montré que l'administration intratrachéale ou par inhalation à des souris de NPs de Fe_3O_4 conduit à une infiltration de neutrophiles (Ban et al., 2012; Srinivas et al., 2012). L'analyse des cytokines présentes dans le fluide du BAL effectuée 48h après l'exposition montre une diminution de la quantité de $\text{TNF-}\alpha$ et d'IL-6 (Ban et al., 2012). Deux études ont plutôt mesuré une augmentation de $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 et IL-1 β à 24h, mais cette augmentation est déjà moins importante après 48h (Park et al., 2010b; Srinivas et al., 2012). Donc l'effet sur la production de ces cytokines est rapide et de courte durée. Park et al. ont évalué la production d'autres cytokines sur le long terme à la suite de l'instillation

intratrachéale à des souris de NPs de Fe₃O₄, soit jusqu'à 28 jours après l'administration (Park et al., 2010b). La quantité dans le fluide du BAL d'IL-2, IL-4 et IL-5 fut mesurée, et contrairement aux autres cytokines proinflammatoires, la production augmente légèrement dans le temps, pour atteindre un maximum 28 jours après l'instillation. Cela suggère une élimination très lente de ce type de NPs. Wang et al. n'ont pas observé d'effet sur les niveaux d'IL-2, IL-4, IL-10 et IFN- γ dans le sérum après la perfusion gastrique répétée de NPs de Fe₃O₄ à des souris durant 14 jours (Wang et al., 2011). Chen et al. ont injecté à des souris par intraveineuse différentes doses de NPs de Fe₃O₄ et évalué les concentrations d'IFN- γ , IL-2 et IL-10 dans le sang 72h après l'injection (Chen et al., 2010). Les concentrations des trois cytokines augmentaient fortement à la dose plus faible, mais l'effet était moins important aux doses plus élevées. Les quantités d'IL-2 et IL-10 diminuaient même à la dose plus élevée. Les résultats indiquent que les NPs de Fe₃O₄ affectent le système immunitaire, mais leur effet évolue dans le temps.

Les tests *in vitro* effectués à partir de cultures primaires de splénocytes ou de cellules mononucléaires de la circulation périphérique de souris exposées aux NPs de Fe₃O₄ *in vivo* ou en culture montrent des résultats moins concluants. Les mesures de la prolifération en réponse à la ConA en présence de NPs de Fe₃O₄ ont montré une augmentation à des faibles doses, mais une diminution à des doses plus élevées de la prolifération, ou aucun effet lors d'une autre étude (Chen et al., 2010; Wang et al., 2011). Pour des splénocytes sensibilisés *in vivo* à l'ovalbumine, la présence des NPs de Fe₃O₄ n'avait également pas d'effet sur la prolifération induite *in vitro* par l'ovalbumine (Shen et al., 2011). Il est intéressant de comparer l'effet sur des cellules stimulées ou non, car cela aurait une influence sur la réponse aux NPs. Siglienti et al. (2006) ont évalué la production de TNF- α à l'aide de cultures primaires de macrophages de rats en induisant ou non la libération de TNF- α à l'aide du LPS (Siglienti et al., 2006). Ils ont mesuré une diminution de la production en présence des NPs de Fe₃O₄ dans les deux cas, mais celle-ci était beaucoup plus importante en présence de LPS. L'induction par le LPS de la libération de TNF- α était totalement inhibée par la présence des NPs, ce qui indique que celles-ci pourraient empêcher une réponse à un stimulus pro-inflammatoire.

Les macrophages sont affectés par les NPs de Fe₃O₄. Une diminution de la viabilité et une augmentation importante des ROS chez ce dernier type cellulaire ont été observées suite une exposition à ces NPs (Hsiao et al., 2008; Naqvi et al., 2010; Yeh et al., 2010). Cet effet résulterait de l'augmentation du niveau de fer à la suite de l'internalisation par endocytose des NPs (Siglienti et al., 2006; Hsiao et al., 2008). Les NPs de Fe₃O₄ sont principalement séquestrées dans les lysosomes, où le

pH faible facilite la libération d'ions Fe (Hsiao et al., 2008; Kim et al., 2011). Le fer libre peut ensuite provoquer une augmentation du niveau de stress oxydatif (Puntarulo, 2005). Kim et al. ont traité les cellules de rat PC12, une lignée dérivée d'un phéochromocytome, au facteur de croissance nerveuse (NGF) en présence de NPs de Fe_3O_4 (Kim et al., 2011). Ils ont mesuré une augmentation de la longueur des neurites et du pourcentage de cellules différenciées lorsque les NPs étaient présentes. Les auteurs ont considéré que la libération d'ions par les NPs pourrait expliquer ce phénomène, car il a été rapporté que le traitement avec des ions de fer conduit aux mêmes effets. Ils ont aussi mesuré une augmentation du niveau de phosphorylation de ERK1/2 en présence des NPs. L'effet des NPs de Fe_3O_4 a aussi été évalué au niveau de la voie de signalisation JNK, où une activation de JNK chez les cellules A549 a été mesurée (Konczol et al., 2011). L'étude a aussi montré que l'activité de liaison de NF- κ B à l'ADN restait constante lors d'un traitement aux NPs seulement, mais diminuait lors d'un traitement au TNF- α en présence des NPs par rapport au contrôle.

Ces derniers résultats, et d'autres présentés précédemment, montrent que les NPs de Fe_3O_4 peuvent influencer la réponse cellulaire. Comme pour les autres NPs, cet effet varie selon le type cellulaire exposé, la dose administrée et l'activation des cellules. Une étude sur la biodistribution de ces NPs chez le rat a montré que le niveau de fer dans le sérum augmentait graduellement jusqu'à une semaine après l'injection par intraveineuse, pour ensuite lentement diminuer (Jain et al., 2008). Cela pourrait expliquer l'évolution constatée dans l'effet de ces NPs. Pour ce qui est de la possible extrapolation de ces résultats aux NPs de ZnFe_2O_4 , davantage d'études devront être effectuées dans le but de déterminer la conséquence d'une substitution du Fe par le Zn.

1.2.11 Perspectives

L'étude approfondie des interactions entre les NPs et les systèmes biologiques est essentielle pour évaluer les risques potentiels, de même que les possibilités des nanotechnologies (Kunzmann et al., 2011). La comparaison des différentes études montre l'importance des caractéristiques physicochimiques des NPs sur ces interactions, notamment leur taille et la charge de surface. L'un des défis est d'améliorer les techniques de caractérisation des NPs. Le niveau d'absorption, de même que les processus de distribution et élimination des NPs sont encore peu connus, donc des études doivent être poursuivies, notamment sur la possible bioaccumulation des NPs. Le niveau de compréhension des effets sur les voies de signalisation est lui aussi négligeable, car les différentes études se limitent le plus

souvent à quelques voies de signalisation. Comprendre la réponse immunitaire aux NPs est essentiel pour plusieurs des applications biomédicales. L'observation d'une inflammation induite à la suite de l'administration d'une grande quantité de NPs n'est pas représentative de l'utilisation de cette technologie. L'évaluation de l'immunotoxicité des NPs devrait éviter ces doses extrêmes, et davantage chercher à établir le mécanisme d'action des NPs chez les différents types cellulaires et en fonction de leur état d'activation avant l'exposition, élément dont l'importance a été démontrée par plusieurs études.

1.3 Objectifs et Hypothèses de recherche

L'IL-2 est une cytokine importante tout au long du processus de la réponse immunitaire impliquant les cellules T CD4, soit l'activation, prolifération, fonction effectrice, contraction et formation des cellules mémoires. Les résultats sur les effets des NPs sur le système immunitaire sont encore exploratoires, et l'étude de leur effet en lien avec l'IL-2 se limite uniquement à sa production par les cellules T. Les cellules stimulées à l'IL-2 sont distinctes des cellules quiescentes, et plusieurs résultats rapportés dans la revue de la littérature montrent que les cellules activées répondent différemment aux NPs.

L'hypothèse de recherche est que la réponse à l'IL-2 devrait être influencée par la présence des NPs, car celles-ci sont reconnues pour augmenter les niveaux de stress oxydatif. Les ROS ainsi générées activeraient certaines protéines kinases, notamment les MAPK, impliquées dans la signalisation de l'IL-2R.

Le premier objectif du projet est de comparer la toxicité de trois types différents de NPs, soit les NPs d'Ag, de C₆₀ et de ZnFe₂O₄. Le second objectif est d'évaluer si ces NPs peuvent influencer la réponse proliférative des lymphocytes T CD4 à l'IL-2. Finalement, nous allons cibler certaines protéines clés impliquées dans la signalisation du récepteur à l'IL-2 pour tenter d'établir à quel niveau les NPs agissent.

Ces trois types de NPs possèdent des propriétés très différentes, donc leur effet devrait l'être également. Les NPs d'Ag possèdent généralement une toxicité plus grande, donc l'impact de leur utilisation devrait être plus important que celui des autres NPs, qui devraient montrer moins d'effets dû à leur bonne biocompatibilité. Certaines MAPK seront analysées pour évaluer leur niveau de phosphorylation de façon à déterminer leur implication dans les effets potentiellement observés.

Chapitre 2 : Silver and fullerene nanoparticles' effect on interleukin-2-dependent proliferation of CD4(+) T cells

2.1 Contribution à l'article

J'ai effectué l'ensemble des mises au point techniques, des expériences en laboratoire et des traitements des résultats pour cet article. J'ai également rédigé l'ensemble de la première version de l'article. Mon directeur, Dr. Jacques Bernier, a supervisé l'ensemble du projet présenté et corrigé la version finale de l'article soumis.

2.2 Résumé en français

Les études portant sur l'immunotoxicité des nanoparticules (NPs) sur les cellules T analysent leur effet au niveau de l'activation par le récepteur des cellules T et négligent la régulation de la prolifération par l'IL-2. Dans cette étude, la lignée lymphoblastoïde IL-2-dépendante WE17/10 a été utilisée pour comparer la toxicité des NPs d'argent (Ag-NPs) et de fullerène (C₆₀-NPs) et évaluer si ces NPs pouvaient interférer avec la prolifération IL-2-dépendante. Les résultats ont montré que les Ag-NPs sont plus toxiques, car elles réduisent la viabilité cellulaire à la concentration testée la plus élevée (100 µg/ml), alors que les C₆₀-NPs avaient une bonne biocompatibilité. La caractérisation des suspensions de NPs par diffusion dynamique de la lumière a mesuré de gros agrégats pour les C₆₀-NPs, tandis que les Ag-NPs étaient relativement bien dispersées et stables. Cela s'est traduit par une entrée beaucoup plus importante des NPs-Ag à l'intérieur des cellules comparativement aux NPs-C₆₀, tel que mesuré par cytométrie en flux. Les mesures de prolifération à l'aide du CFSE après 72h d'incubation ont montré que les NPs-Ag diminuaient la prolifération cellulaire, alors que les NPs-C₆₀ augmentaient légèrement la prolifération. L'expression de CD25 était inchangée à la suite de l'exposition aux NPs-C₆₀, mais significativement augmentée en présence des NPs-Ag lors d'incubations de courte ou longue durée. L'analyse de trois protéines de signalisation clés activées par le récepteur à l'IL-2 (Stat5, JNK et ERK1/2) par immunobuvardage de type western a montré aucun effet par l'une ou l'autre des NPs sur la phosphorylation de Stat5 et JNK. ERK1/2 était légèrement activée à la suite d'une courte exposition aux NPs-Ag, tandis que les NPs-C₆₀ n'avaient aucun effet. Nos résultats montrent que les NPs-C₆₀ ont

une bonne biocompatibilité et n'interfèrent pas avec la prolifération IL-2-dépendante. Un examen plus approfondi serait nécessaire dans le cas des NPs-Ag, car leur mécanisme d'action est incertain.

Mots clés : argent, fullerène, nanoparticules, toxicité, lymphocyte T, IL-2

2.3 Article soumis

Silver and fullerene nanoparticles' effect on interleukin-2-dependent proliferation of CD4(+) T cells

Guillaume Côté-Maurais & Jacques Bernier*

Institut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Laval, Québec, Canada H7V 1B7

*Corresponding author address:

Dr. Jacques Bernier
INRS-Institut Armand-Frappier
531 Boulevard des Prairies
Laval, QC, Canada
H7V 1B7
Tel. (450) 687 5010 ext 8813
Fax (450) 686 5501
E-mail: jacques.bernier@iaf.inrs.ca

2.3.1 Abstract

Immunotoxicity studies of nanoparticles on T cells addressed their effects on activation by T antigen receptor, but have neglected the regulation of proliferation by IL-2. In this study, the IL-2-dependent T lymphoblastoid WE17/10 cell line was used to compare silver (Ag-NPs) and fullerene (C₆₀-NPs) nanoparticles' toxicity and evaluate whether these NPs could interfere with IL-2-dependent proliferation. Results have shown that Ag-NPs are more toxic, as they reduced cell viability at the highest concentration tested (100 µg/ml), while C₆₀-NPs have shown good biocompatibility. Characterization of NP suspensions by dynamic light scattering measured large aggregates for C₆₀-NPs, whereas Ag-NPs were relatively stable and well dispersed. This translated into a much larger uptake of Ag-NPs compared to C₆₀-NPs, as measured by flow cytometry. Proliferation measurements by CFSE following 72h incubation have shown that Ag-NPs decrease cell proliferation and C₆₀-NPs slightly increase proliferation. CD25 expression was unchanged following exposure to C₆₀-NPs, but was significantly increased by Ag-NPs' presence for short and long-term incubations. Analyses of three key signaling proteins activated by IL-2 receptor (Stat5, JNK and ERK1/2) by western immunoblotting have shown no effects from either NPs on Stat5 and JNK phosphorylation. ERK1/2 was slightly activated following a short exposure to Ag-NPs, while C₆₀-NPs had no effect. Our results show that C₆₀-NPs have good biocompatibility and don't interfere with IL-2-dependent proliferation. A deeper investigation would be needed for the case of Ag-NPs, since the mechanism of their action is still unclear.

Keywords : silver, fullerene, nanoparticle, toxicity, T-lymphocyte, IL-2

2.3.2 Introduction

Products containing nanomaterials (NMs) are already on the market and their numbers are rapidly increasing. With the growth of nanotechnologies, the importance accorded to toxicological research has also increased, since the requirement for ensuring safe usage of this technology is becoming a central issue. Two interesting nanoparticles are silver- (Ag) and fullerene-based (C_{60}) NMs. Presently, silver is the most commercialized (Stensberg et al., 2011). Their utilization is mostly due to their antimicrobial properties, which explains their addition to creams, dressings, surgical instruments and bone prostheses (Arora et al., 2009). Fullerene NPs are also an interesting type of NM because of their remarkable stability and the presence of 30 double bonds to its structure, which can react with free radicals (Aschberger et al., 2010). These NPs are used for their antioxidant properties (Aschberger et al., 2010). C_{60} -NPs are presently used in cosmetics, but could also have medical applications for treatment of diseases associated with free radical formation, such as neurodegenerative disorders and some types of cancers (Aschberger et al., 2010, Dugan et al., 2001, Krug and Wick, 2011, Markovic and Trajkovic, 2008).

NPs may enter the human body through inhalation, ingestion, injection for therapeutic purposes and dermal contact (Oberdorster, 2010). Ag-NPs are considered to be among the most toxic types of NPs, since an exposure to these NPs can induce apoptosis at much lower concentrations than with other types of NPs. C_{60} -NPs, on the contrary, were shown to have a protective effect against reactive oxygen species (ROS) toxicity in certain conditions (Gharbi et al., 2005, Xiao et al., 2006, Yin et al., 2009). Presently, the need in nanotoxicology is to understand the interactions of NPs with biological processes at the protein level to investigate whether it has an influence on signaling pathways. The identification and characterization of these interactions permit not only to evaluate potential harmful effects, but are also essential to many of the biomedical applications, especially at the level of the immune system.

Because of their utilization in preventing wound infections, action of Ag-NPs on the immune system has been extensively evaluated. Results on its effects are sometimes contradictory, but it is generally considered that they have immunosuppressive effects. Their presence *in vitro* with lymphocytes or macrophages is usually associated with a reduced pro-inflammatory cytokine production (Shin et al., 2007, Wong et al., 2009). *In vivo* studies with mice, using nanosilver-coated dressings or topical nanocrystalline silver creams for injuries or contact dermatitis, have shown anti-

inflammatory effects also via reduction of pro-inflammatory cytokine production (Bhol and Schechter, 2005, Tian et al., 2007).

Exposure of mice or rats by instillation to large quantities of C₆₀-NPs is usually associated with pro-inflammatory responses (Morimoto et al., 2010, Park et al., 2010). However, the pre-treatment of mice with low concentrations of fullerene reduced inflammatory response associated with an exposure to quartz particles (Roursgaard et al., 2008). C₆₀-NPs reduced delayed-type hypersensitivity induced by methylated bovine serum albumin in mice (Yamashita et al., 2009).

T cells play a central role in regulation of adaptive immune response. Interleukin-2 (IL-2) is mostly produced by activated CD4⁺ T cells and is a key mediator of growth, proliferation, and differentiation of effector CD4⁺ T cells (Gaffen, 2001, Liao et al., 2011). They are also involved in the regulation of self-tolerance through their essential roles in the development and homeostasis maintenance of regulatory T cells (Treg) (Malek and Bayer, 2004, Walsh et al., 2006). IL-2 receptor (IL-2R) is consisted of three chains, the CD122, the γ c and the CD25. CD25 increases the receptor affinity for IL-2 and its expression is induced following antigenic stimulation (Gaffen, 2001).

The objective of our research was to determine whether Ag or C₆₀-NPs could interfere with IL-2-dependent CD4⁺ T cell proliferation. This will allow us to evaluate NPs' effects on proliferating, instead of quiescent, CD4⁺ T cells, which are the most studied. An *in vitro* approach was chosen in order to reject signals from other cytokines and to establish NPs' mechanism of action on signaling pathways activated by IL-2R.

2.3.3 Experimental methods

Nanoparticles - Ag-NPs and C₆₀-NPs

Manufactured silver (Ag) (cat. no. 576832, vendor size <100 nm) and fullerene (C₆₀) (572500, vendor size <100 nm) nanoparticles were purchased from Sigma Aldrich (Oakville, On, Canada). Ag-NPs arrived as nanopowder and were coated with polyvinylpyrrolidone (PVP) to increase their stability and avoid agglomeration. C₆₀-NPs were purified by column chromatography in toluene, then heat-treated under vacuum to remove solvent residue in order to obtain a highly crystalline sublimed material with low solvent and metal content. Ag-NPs had a purity of $\geq 99,5\%$ and C₆₀-NPs of \geq

99,85% as determined by trace metals analysis and HPLC respectively. The hydrodynamic diameter and the zeta-potential of the dispersed particles were measured by dynamic light scattering (DLS) with a Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern, Worcestershire, UK). The characteristics of Ag and C₆₀-NPs are shown in Table 1.

Cells Culture

The IL-2-dependent T lymphoblastoid WE17/10 cell line was maintained in RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) supplemented with 20% heat-inactivated fetal bovine serum (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), antibiotic solution (100 IU/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin; Sigma-Aldrich), 10 mM HEPES (Sigma-Aldrich) and 50 U/ml of recombinant human IL-2 (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA). Cells were maintained in 5% CO₂ humidified incubator at 37°C. Before each experiment, cells were washed with PBS and resuspended in complete medium containing 30 U/ml of IL-2.

Nanoparticles preparation and cell treatment

Stock solutions of nanoparticles (2 mg/ml) were prepared in sterile deionized water. Nanoparticles were dispersed by sonication on ice for 5 minutes, followed by addition of BSA and PBS 10X to attain a concentration of 15 mg/ml and 1X respectively. It was shown that albumin stabilizes nanoparticles dispersion (Bihari et al., 2008). Cells were then immediately treated with nanoparticles from the stock solution to obtain a range of concentrations from 5 to 100 µg/ml. Controls were treated with the vehicle.

Cell viability assay

To assess cell viability following nanoparticles treatment, propidium iodide (PI; Sigma Aldrich) prepared in PBS was added to cells to yield a concentration of 10 µg/ml. Fluorescence was then immediately read by flow cytometry with a FACScan[®] (BD Biosciences, Mississauga, On, Canada). Dead cells show nuclear staining from the PI, which stains both late-stage apoptotic and necrotic cells displaying permeable membranes. Viability percentages consisted of the proportion of cells expressing a low fluorescence level in relation to total cell number. NPs were excluded from the analysis based on absence of fluorescence signal and light forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) characteristics. Analysis was performed on 10 000 collected events using the WinMdi 2.9 software.

Proliferation measurement using Carboxyfluorescein succinimidyl ester labeling

Cells were diluted (10×10^6 cells/ml) in a solution of HBSS supplemented with 0.1% BSA and incubated for 10 min at 37°C with carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE; Invitrogen) at a final working concentration of 5 μ M. CFSE was subsequently neutralized by adding ice-cold complete RPMI to cells, followed by 5 min of incubation at room temperature and washed once with ice-cold complete RPMI. CFSE-labelled WE17/10 cells were cultured for 72h in 24-well plates in presence of nanoparticles. Cells were analyzed as previously described on a FACScan[®] (BD Biosciences) flow cytometer by gating only live cells. Results are presented as the inverse ratio of the average Gmean read following an exposure to NPs to the Gmean of control cells.

Kinetics evaluation of cellular uptake by flow cytometry

The kinetics of cellular binding and uptake of Ag and C₆₀-NPs into WE17/10 cells were examined by flow cytometry (Suzuki et al., 2007). The side scatter distribution ratio was chosen as a measure of cellular uptake. Cells' analysis was carried out after 72h incubation in the presence of NPs. Cells were sampled and directly analyzed by flow cytometry with FACScan[®] (BD Biosciences). Analysis was performed as described above. Cellular uptake of NPs was calculated by dividing the SSC values of particle-treated cells by the SSC values in control cells.

Intracellular reactive oxygen species measurement

To measure reactive oxygen species (ROS) generation, 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA; Invitrogen) was used. Briefly, cells were treated with different concentrations of nanoparticles for 24h or 48h. After washing, cells were incubated with 5 μ M DCFH-DA prepared in PBS containing 1 g/L of glucose for 45 min in the dark (incubator, 37°C). DCFH-DA passively enters the cell, and is hydrolyzed by esterases to DCFH. This nonfluorescent molecule is then oxidized to fluorescent compound dichlorofluorescein (DCF) by cellular oxidants (Song et al., 2010). At the end of incubation, the fluorescence intensity was measured by flow cytometry with FACScan[®] (BD Biosciences, Mississauga, On, Canada). To ensure cells' capability of ROS production, positive control samples were activated with 1,5 μ M PMA during the 45 minutes of loading with DCFH-DA. NPs were excluded from the analysis based on absence of fluorescence signal and forward-scattered light (FSC) and SSC characteristics. Histogram analyses were performed using WinMdi software by gating only live cells.

Phenotypic analysis

Phenotypic analysis of WE17/10 cells was performed following treatment with 25 µg/ml NPs for 24h, 48h and 72h. Cells were washed twice with PBS and non-specific binding sites were blocked with 10 µg/ml human IgG (Sigma–Aldrich) for 30 min on ice. Cells were stained with 0,2 µg of mouse anti-human:CD25 Alexa Fluor 488 conjugated antibody (eBioscience, San Diego, CA, USA) for 30 min. Cells were then washed twice with ice-cold PBS and analyzed for fluorescence by flow cytometry with FACScan® (BD Biosciences). Analysis was performed as described above.

Western Immunoblotting

Following exposure to nanoparticles, WE17/10 cell extracts were prepared in lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, and 1% Triton X-100] supplemented with 1 mM EDTA, 1X Halt protease inhibitor cocktail (78430; Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) and 1X Halt phosphatase inhibitor cocktail (78428; Pierce Biotechnology). The soluble protein concentration was determined using the BCA protein assay (Pierce Biotechnology). Protein samples (30 µg) were separated by SDS-PAGE and transferred onto a PVDF or nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Membranes were blocked with 5% non-fat dry milk or 3% BSA diluted in Tris-buffered saline-Tween (TBS-T; 50 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, and 0,1 % Tween) for 1 h at room temperature and hybridized overnight at 4°C with anti-phosphoStat5 (9359; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), anti-phosphoERK1/2 (44680G; Invitrogen), or anti-phosphoJNK (4671; Cell Signaling Technology) prepared in blocking buffer. Specific antibody–antigen complexes were identified using a horseradish peroxidase (HRP) linked sheep anti-rabbit IgG (NA934; GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom) and SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate (Pierce Biotechnology). Membranes were stripped and reprobbed with anti-Stat5 (9358; Cell Signaling Technology), anti-ERK1/2 (44654G; Invitrogen) or anti-JNK (9258; Cell Signaling Technology) to evaluate protein loading in each sample.

Statistical analysis

Results are presented as mean ± standard error of the mean (SEM) of 3 replicates in each experiment. Each experiment was performed at least three times. Pairwise comparisons against the respective controls were performed using two-sided Dunnett's test as a post hoc analysis with the InStat statistics program (GraphPad Software, San Diego, CA). Differences were considered significant when $P < 0.05$.

2.3.4 Results

NPs characterization

Summary of Ag and C₆₀-NPs characteristics can be found in Table 1. Since it is known that NPs will agglomerate to some extent when dispersed in the media (Murdock et al., 2008), dynamic light scattering (DLS) was performed to determine size distribution and agglomerates' sizes in media with serum at a concentration of 25 µg/ml of NPs. Results have shown that C₆₀-NPs' agglomerates had an average diameter of 478 ± 93 nm, while Ag-NPs' diameter was 185 ± 44 nm, showing that C₆₀-NPs form much larger agglomerates than Ag-NPs. The zeta potential was also measured and results showed no significant difference between Ag and C₆₀-NPs, with values of -10,1 ± 0,9 mV and -11,4 ± 0,7 mV respectively.

Effect on cell viability

The viability was measured by flow cytometry using propidium iodide in order to determine at which concentration the NPs would have a toxic effect leading to cell death. The assay was carried out following a 72h exposure. It was shown that the viability was not affected by an exposure to C₆₀-NPs at up to 100 µg/ml. For Ag-NPs, significant decrease in cell viability was observed following an exposure to a concentration of 100 µg/ml.

Nanoparticles Uptake potential

It is well demonstrated that nanomaterials, by endocytic mechanisms and/or by passive processes, are capable of entering live cells. To evaluate the uptake potential of these NPs, we measured the flow cytometry light scatter (SSC) modifications associated with exposure to NPs. Several authors have shown the relevance of this method when assessing NPs' uptake (Suzuki et al., 2007, Zucker et al., 2010, Greulich et al., 2011). Our results indicated a different uptake between Ag and C₆₀-NPs (Figure 1). There is a significant increase of cellular uptake of Ag-NPs following an exposure to 25 to 100 µg/ml. C₆₀-NPs uptake is limited, and significant only after an exposure to 75 to 100 µg/ml. Considering loss of viability, the following tests made with Ag-NPs were done using concentrations from 5 to 50 µg/ml in order to avoid any loss of cell viability.

Nanoparticles' influence on cell proliferation in response to IL-2

We have next measured the effects of Ag and C₆₀-NPs on cell proliferation in response to IL-2. Results have shown that Ag-NPs significantly decrease the proliferative response to IL-2 (Figure 3).

On the contrary, C₆₀-NPs slightly, but significantly, increase proliferative response to IL-2 at all doses tested. Significant effects on proliferation are observed from 5 µg/ml for Ag-NPs and 10 µg/ml for C₆₀-NPs. Ag-NPs had a much stronger effect than C₆₀-NPs and a dose-dependent relation is observed unlike for C₆₀-NPs. Considering that there was no significant effect on cell viability at above 75 µg/ml for Ag-NPs, these observations do not result from viability loss.

Assessment of ROS generation

Several nanoparticles induce an increase in oxidative stress in cells (Oberdorster et al., 2005). To evaluate if an exposure to Ag and C₆₀-NPs affects the level of oxidative stress in WE17/10 cells, ROS levels have been measured after 24h with DCFH-DA probes. In the protocol, Ag-NPs caused a quenching effect on DCFH-DA assays and could not be considered for measuring ROS (Supplement data S1). C₆₀-NPs do not interfere with DCFH-DA, and ROS determination after 24h showed a significant dose-dependent increase from 50 µg/ml to the higher dose used (Figure 3).

Determination of IL-2R expression after exposure to nanoparticles

In order to determine whether NPs can act directly on the receptor's expression to influence cell proliferation, levels of CD25 expression were measured at 24h, 48h and 72h following exposure to 25 µg/ml of NPs. Results have shown that the presence of Ag-NPs lead to a higher surface expression of CD25 (Figure 3b). This effect was seen following 24h of incubation and stayed relatively consistent throughout the incubation, although the level of CD25 expression decreased in all conditions at 72h. C₆₀-NPs did not show any effects on CD25 expression at any time point. The percentage of CD25⁺ cells has also been measured, and the results showed no significant effect on this aspect for both types of NPs (data not shown).

Interference signaling processes

IL-2 binding causes signal transduction in cells mediated by βγ chain complex. In order to evaluate NPs' effects on signaling pathways, we have determined their influence on the MAPK pathway and the JAK -STAT pathway. ERK1/2 analysis following exposure to Ag-NPs have shown that after 6h of exposure, there was a significant increase in ERK1/2 activation followed by a return to the normal level after 24h (Figure 4a). C₆₀-NPs caused no significant changes in ERK1/2 activation. JNK pathway was not affected by both NPs up until 48h of exposure (Figure 4b).

Next, we have determined the effects of NPs on Stat5 activation, a protein directly involved in the transcription of specific genes in response to IL-2. Stat5 analysis has shown that both Ag and C₆₀-NPs have no effects on its level of activation in the first 24h (Figure 5a). Surprisingly, a significant decrease was noted at 48h exposure to C₆₀-NPs. This effect was even stronger following a 72h incubation (data not shown). We hypothesized that this resulted from proliferation increase caused by the presence of C₆₀-NPs, which enhance cells' consumption of IL-2, leading to cells' deprivation of the cytokine from 48h incubation time and up. To confirm this hypothesis, IL-2 has been added to cells after 48h incubation time and Stat5 phosphorylation was determined 24h later. Results have shown that this permitted the cells to recover the same level of activation as the control cells (Figure 5b). Therefore, the C₆₀-NPs' measured effect following long-term incubation was in fact an indirect effect resulting from increase in proliferation.

2.3.5 Discussion

Silver NPs and C₆₀-NPs are among the most promising types of nanomaterials today. Their chemical compositions are very different, as C₆₀-NPs are relatively inert and hydrophobic, while Ag-NPs are reactive and possess antimicrobial properties. Characterization of both NPs using DLS has shown that agglomerates' sizes in media with serum were much larger for C₆₀-NPs than for Ag-NPs. This could be accounted by the hydrophobic properties of C₆₀-NPs and by Ag-NPs' stock nanopowder form, which included PVP as dispersant. Presence of PVP enabled more effective dispersion and diminished tendency towards aggregation by steric hindrances (Foldbjerg et al., 2009). To evaluate uptake potential of both NPs, SSC analysis by flow cytometry has been carried out after a 72h exposure. This method is based on the principle that SSC analysis reflects the inner density of particles (Suzuki et al., 2007). Increase of SSC is mainly caused by the NPs both adsorbed on the cell surface and enclosed within endosomes (Xia et al., 2008). Results showed an uptake of Ag-NPs from 25 µg/ml to 100 µg/ml. On the contrary, the uptake of C₆₀-NPs was only observed at 75 to 100 µg/ml. Polyvinylpyrrolidone used as coating for Ag-NPs can influence their behaviors in solution leading to a decrease in aggregate formation. Since NPs can enter T cells by pinocytosis or by passive diffusion, smaller Ag-NPs are able to penetrate cell membranes more efficiently than C₆₀-NPs. Greulich et al. have shown that Ag-NPs agglomerates cannot penetrate T cells (Greulich et al., 2011).

Both NPs' effects on cell viability have been measured after the exposure of T cells to 5 to 100 $\mu\text{g/ml}$ for 72h. The only significant loss of viability that was observed was for cells exposed to 100 $\mu\text{g/ml}$ of Ag-NPs. It is surprising that the uptake of Ag-NPs was not associated with an increase in cell death. Indeed, it was shown in several cell lines that lower concentrations, such as 8 $\mu\text{g/ml}$, of Ag-NPs significantly decreased cell viability (Guo et al., 2013). Prasad et al. had established that smaller (10 nm) Ag-NPs were more toxic (Prasad et al., 2013). Since we used a formulation with different sizes below 100 nm, it could explain the decrease in cytotoxicity compared to a uniform suspension with a size range between 1 and 30 nm (Guo et al., 2013). Influence of PVP coating seems to be negligible since Guo et al. had used the same variety of Ag-NPs. The C₆₀-NPs did not affect viability at any concentration, possibly resulting from their low reactivity and aggregate size, which could reduce cellular uptake.

The proliferation of resting peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) stimulated with phytohaemagglutinin (PHA) is reduced in the presence of Ag-NPs colloidal solution (Shin et al., 2007). In another study, the stimulation of PBMCs was done with Concanavalin A (Con A), and no significant effect on cell proliferation was measured at up to 15 $\mu\text{g/ml}$ of PVP-coated Ag-NPs (Greulich et al., 2011). PHA and Con A mitogens act primarily via CD3/TCR on T cells and importantly, monocytes/macrophages participate in lectin-induced activation of T cells. The divergent response could be caused by Ag-NPs' properties, the concentration of NPs and mitogenic stimuli used. In our model, we used WE17/10 cells, an IL-2-dependent cell line. Upon stimulation, the IL-2R activates major signal transduction pathways that are responsible for survival and proliferation. This latest event is downstream of signaling pathways triggering stimulation by TCR. Activation by IL-2R leading to proliferation in the presence of Ag-NPs or C₆₀-NPs was perturbed. Cell proliferation was inversely related and dose-dependent to Ag-NPs. Fullerene C₆₀-NPs slightly, but significantly increased proliferation in response to IL-2. A decrease in proliferation could be caused by the release of silver ions from Ag-NPs after oxidation in media and could be associated with an increase of ROS (Kim and Ryu, 2013). In our case, Ag-NPs quenched the DCFH-DA probes. We confirmed quenching effect by the absence of ROS formation after addition of PMA on cells incubated with Ag-NPs (supplement S1). C₆₀-NPs caused a dose-dependent increase of ROS associated with low, but significant increase of proliferation. Exposure to fullerene caused an increase of the intracellular ROS level in keratinocytes and lung cell lines (Horie et al., 2010). However, C₆₀-NPs can prevent oxidative stress in thymocytes and PBMCs (Monti et al., 2000, Hrebinyk et al., 2012). Interestingly, fullerene can also improve the immune response (Liu et al., 2009). In our model, the increase of ROS was associated with the

increase in proliferation. This latter association could be explained by the capacity of IL-2 to rescue apoptosis as was demonstrated with dexamethasone (Rebollo et al., 1995, Mor and Cohen, 1996).

Modulation of proliferative responses can be explained by down-regulation of high-affinity IL-2 receptors or by a perturbation of signaling pathways. CD25 expression was measured following exposure to both NPs to determine if they caused a modulation of high affinity IL-2 receptor. Its expression is regulated by signaling pathways triggered by the binding of IL-2 to its receptor (Malek, 2008). The presence of C₆₀-NPs had no effect on CD25 expression, while Ag-NPs significantly increased the level of expression up until 72h of culture. These results indicate an increase of high affinity receptors, which are complexes formed by $\alpha/\beta/\gamma$ chains. However, we have observed no modulation of β chains (data not shown), which are critical for IL-2-dependent signal transduction (Hatakeyama et al., 1989). The number of high affinity IL-2 binding sites appears limited by the total number of IL-2R β subunits on the cell surface and an excess of α -chains at the cell surface represents a low affinity IL-2R without signaling capacity (Hemler et al., 1984). Thus, an excess of IL-2R α can compete with IL-2R $\alpha\beta\gamma$ or IL-2R $\beta\gamma$ for IL-2 available in cell culture, slightly reducing proliferation. Ag-NPs' effects were also associated with ERK1/2 activation after 6h of exposure. This increase might result from ROS production due to the presence of Ag-NPs. It is well accepted that ROS activate the MAPK pathway (Torres and Forman, 2003). Eom et al. have measured no effects on either ERK or JNK activation following exposure of Jurkat T cells to dispersed tetrahydrofuran Ag-NPs (Eom and Choi, 2010). Ag-NPs' formulation and doses used could explain the differences in ERK results in the present study.

Stat5 transcription factor is known to be involved in the regulation of CD25 expression (Malek, 2008) and in cell cycle progression in response to IL-2 (Moriggl et al., 1999). Analysis of Stat5 phosphorylation has shown no perturbation by Ag-NPs. However, a decrease of Stat5 by C₆₀-NPs was noted at 48h although proliferation was increased and CD25 expression not affected. Thus, we have hypothesized that the decrease in Stat5 activation was related to a decrease in IL-2 availability caused by the increase in proliferation of WE17/10 cells. Addition of fresh IL-2 restores activation of Stat5, confirming our hypothesis. C₆₀-NPs have been known to have immunostimulatory properties by increasing Th1 cytokine production (Liu et al., 2009).

Overall, our study has shown that Ag-NPs perturb the IL-2 proliferation by decreasing cell proliferation due to an increase of low-affinity receptors for this cytokine. C₆₀-NPs increase the turnover of IL-2-dependent proliferating cells at concentrations that do not significantly increase ROS formation.

2.3.6 Acknowledgments

We acknowledge the support of Environmental Health Research Network (RRSE), funded by the Fonds de la recherche en santé du Québec. We would like to acknowledge the Fondation Armand-Frappier for the research grant awarded to Guillaume Côté-Maurais.

2.3.7 References

- ARORA, S., JAIN, J., RAJWADE, J. M. & PAKNIKAR, K. M. 2009. Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 236, 310-8.
- ASCHBERGER, K., JOHNSTON, H. J., STONE, V., AITKEN, R. J., TRAN, C. L., HANKIN, S. M., PETERS, S. A. & CHRISTENSEN, F. M. 2010. Review of fullerene toxicity and exposure--appraisal of a human health risk assessment, based on open literature. *Regul Toxicol Pharmacol*, 58, 455-73.
- BHOL, K. C. & SCHECHTER, P. J. 2005. Topical nanocrystalline silver cream suppresses inflammatory cytokines and induces apoptosis of inflammatory cells in a murine model of allergic contact dermatitis. *Br J Dermatol*, 152, 1235-42.
- BIHARI, P., VIPPOLA, M., SCHULTES, S., PRAETNER, M., KHANDOGA, A. G., REICHEL, C. A., COESTER, C., TUOMI, T., REHBERG, M. & KROMBACH, F. 2008. Optimized dispersion of nanoparticles for biological in vitro and in vivo studies. *Part Fibre Toxicol*, 5, 14.
- DUGAN, L. L., LOVETT, E. G., QUICK, K. L., LOTHARIUS, J., LIN, T. T. & O'MALLEY, K. L. 2001. Fullerene-based antioxidants and neurodegenerative disorders. *Parkinsonism Relat Disord*, 7, 243-246.
- EOM, H. J. & CHOI, J. 2010. p38 MAPK activation, DNA damage, cell cycle arrest and apoptosis as mechanisms of toxicity of silver nanoparticles in Jurkat T cells. *Environ Sci Technol*, 44, 8337-42.
- FOLDBJERG, R., OLESEN, P., HOUGAARD, M., DANG, D. A., HOFFMANN, H. J. & AUTRUP, H. 2009. PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes. *Toxicol Lett*, 190, 156-62.
- GAFFEN, S. L. 2001. Signaling domains of the interleukin 2 receptor. *Cytokine*, 14, 63-77.
- GHARBI, N., PRESSAC, M., HADCHOUEL, M., SZWARC, H., WILSON, S. R. & MOUSSA, F. 2005. [60]fullerene is a powerful antioxidant in vivo with no acute or subacute toxicity. *Nano Lett*, 5, 2578-85.
- GREULICH, C., DIENDORF, J., GESSMANN, J., SIMON, T., HABIJAN, T., EGGELER, G., SCHILDHAUER, T. A., EPPLE, M. & KOLLER, M. 2011. Cell type-specific responses of peripheral blood mononuclear cells to silver nanoparticles. *Acta Biomater*, 7, 3505-14.
- GUO, D., ZHU, L., HUANG, Z., ZHOU, H., GE, Y., MA, W., WU, J., ZHANG, X., ZHOU, X., ZHANG, Y., ZHAO, Y. & GU, N. 2013. Anti-leukemia activity of PVP-coated silver nanoparticles via generation of reactive oxygen species and release of silver ions. *Biomaterials*.
- HATAKEYAMA, M., MORI, H., DOI, T. & TANIGUCHI, T. 1989. A restricted cytoplasmic region of IL-2 receptor beta chain is essential for growth signal transduction but not for ligand binding and internalization. *Cell*, 59, 837-45.
- HEMLER, M. E., BRENNER, M. B., MCLEAN, J. M. & STROMINGER, J. L. 1984. Antigenic stimulation regulates the level of expression of interleukin 2 receptor on human T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81, 2172-5.
- HORIE, M., NISHIO, K., KATO, H., SHINOHARA, N., NAKAMURA, A., FUJITA, K., KINUGASA, S., ENDOH, S., YAMAMOTO, K., YAMAMOTO, O., NIKI, E., YOSHIDA, Y. & IWAHASHI, H. 2010. In vitro evaluation of cellular responses induced by stable fullerene C60 medium dispersion. *J Biochem*, 148, 289-98.
- HREBINYK, S. M., HRYNIUK, II, PRYLUTS'KA, S. V. & MATYSHEVS'KA, O. P. 2012. [Generation of active oxygen forms in rat thymocytes under action of hydrogen peroxide and fullerene C60]. *Ukr Biokhim Zh*, 84, 48-52.

- KIM, S. & RYU, D. Y. 2013. Silver nanoparticle-induced oxidative stress, genotoxicity and apoptosis in cultured cells and animal tissues. *J Appl Toxicol*, 33, 78-89.
- KRUG, H. F. & WICK, P. 2011. Nanotoxicology: an interdisciplinary challenge. *Angew Chem Int Ed Engl*, 50, 1260-78.
- LIAO, W., LIN, J. X., WANG, L., LI, P. & LEONARD, W. J. 2011. Modulation of cytokine receptors by IL-2 broadly regulates differentiation into helper T cell lineages. *Nat Immunol*, 12, 551-9.
- LIU, Y., JIAO, F., QIU, Y., LI, W., QU, Y., TIAN, C., LI, Y., BAI, R., LAO, F., ZHAO, Y., CHAI, Z. & CHEN, C. 2009. Immunostimulatory properties and enhanced TNF- alpha mediated cellular immunity for tumor therapy by C60(OH)20 nanoparticles. *Nanotechnology*, 20, 415102.
- MALEK, T. R. 2008. The biology of interleukin-2. *Annu Rev Immunol*, 26, 453-79.
- MALEK, T. R. & BAYER, A. L. 2004. Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nat Rev Immunol*, 4, 665-74.
- MARKOVIC, Z. & TRAJKOVIC, V. 2008. Biomedical potential of the reactive oxygen species generation and quenching by fullerenes (C60). *Biomaterials*, 29, 3561-73.
- MONTI, D., MORETTI, L., SALVIOLI, S., STRAFACE, E., MALORNI, W., PELLICCIARI, R., SCHETTINI, G., BISAGLIA, M., PINCELLI, C., FUMELLI, C., BONAFE, M. & FRANCESCHI, C. 2000. C60 carboxyfullerene exerts a protective activity against oxidative stress-induced apoptosis in human peripheral blood mononuclear cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 277, 711-7.
- MOR, F. & COHEN, I. R. 1996. IL-2 rescues antigen-specific T cells from radiation or dexamethasone-induced apoptosis. Correlation with induction of Bcl-2. *J Immunol*, 156, 515-22.
- MORIGGL, R., TOPHAM, D. J., TEGLUND, S., SEXL, V., MCKAY, C., WANG, D., HOFFMEYER, A., VAN DEURSEN, J., SANGSTER, M. Y., BUNTING, K. D., GROSVELD, G. C. & IHLE, J. N. 1999. Stat5 is required for IL-2-induced cell cycle progression of peripheral T cells. *Immunity*, 10, 249-59.
- MORIMOTO, Y., HIROHASHI, M., OGAMI, A., OYABU, T., MYOJO, T., NISHI, K., KADOYA, C., TODOROKI, M., YAMAMOTO, M., MURAKAMI, M., SHIMADA, M., WANG, W. N., YAMAMOTO, K., FUJITA, K., ENDOH, S., UCHIDA, K., SHINOHARA, N., NAKANISHI, J. & TANAKA, I. 2010. Inflammogenic effect of well-characterized fullerenes in inhalation and intratracheal instillation studies. *Part Fibre Toxicol*, 7, 4.
- MURDOCK, R. C., BRAYDICH-STOLLE, L., SCHRAND, A. M., SCHLAGER, J. J. & HUSSAIN, S. M. 2008. Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique. *Toxicol Sci*, 101, 239-53.
- OBERDORSTER, G. 2010. Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. *J Intern Med*, 267, 89-105.
- OBERDORSTER, G., MAYNARD, A., DONALDSON, K., CASTRANOVA, V., FITZPATRICK, J., AUSMAN, K., CARTER, J., KARN, B., KREYLING, W., LAI, D., OLIN, S., MONTEIRO-RIVIERE, N., WARHEIT, D. & YANG, H. 2005. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Part Fibre Toxicol*, 2, 8.
- PARK, E. J., KIM, H., KIM, Y., YI, J., CHOI, K. & PARK, K. 2010. Carbon fullerenes (C60s) can induce inflammatory responses in the lung of mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, 244, 226-33.
- PRASAD, R. Y., MCGEE, J. K., KILLIUS, M. G., ACKERMAN, D., BLACKMAN, C. F., DEMARINI, D. M. & SIMMONS, S. O. 2013. Investigating oxidative stress and inflammatory responses elicited by silver nanoparticles using high-throughput reporter genes in HepG2 cells: Effect of size, surface coating, and intracellular uptake. *Toxicol In Vitro*.

- REBOLLO, A., PITTON, C., GARCIA, A., GOMEZ, J. & SILVA, A. 1995. A role for the intermediate affinity IL-2R in the protection against glucocorticoid-induced apoptosis. *Immunology*, 84, 388-95.
- ROURSGAARD, M., POULSEN, S. S., KEPLEY, C. L., HAMMER, M., NIELSEN, G. D. & LARSEN, S. T. 2008. Polyhydroxylated C60 fullerene (fullerenol) attenuates neutrophilic lung inflammation in mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 103, 386-8.
- SHIN, S. H., YE, M. K., KIM, H. S. & KANG, H. S. 2007. The effects of nano-silver on the proliferation and cytokine expression by peripheral blood mononuclear cells. *International Immunopharmacology*, 7, 1813-1818.
- SONG, W., ZHANG, J., GUO, J., DING, F., LI, L. & SUN, Z. 2010. Role of the dissolved zinc ion and reactive oxygen species in cytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Toxicol Lett*, 199, 389-97.
- STENSBERG, M. C., WEI, Q., MCLAMORE, E. S., PORTERFIELD, D. M., WEI, A. & SEPULVEDA, M. S. 2011. Toxicological studies on silver nanoparticles: challenges and opportunities in assessment, monitoring and imaging. *Nanomedicine (Lond)*, 6, 879-98.
- SUZUKI, H., TOYOOKA, T. & IBUKI, Y. 2007. Simple and easy method to evaluate uptake potential of nanoparticles in mammalian cells using a flow cytometric light scatter analysis. *Environ Sci Technol*, 41, 3018-24.
- TIAN, J., WONG, K. K., HO, C. M., LOK, C. N., YU, W. Y., CHE, C. M., CHIU, J. F. & TAM, P. K. 2007. Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing. *ChemMedChem*, 2, 129-36.
- TORRES, M. & FORMAN, H. J. 2003. Redox signaling and the MAP kinase pathways. *Biofactors*, 17, 287-96.
- WALSH, P. T., BUCKLER, J. L., ZHANG, J., GELMAN, A. E., DALTON, N. M., TAYLOR, D. K., BENSINGER, S. J., HANCOCK, W. W. & TURKA, L. A. 2006. PTEN inhibits IL-2 receptor-mediated expansion of CD4⁺ CD25⁺ Tregs. *J Clin Invest*, 116, 2521-31.
- WONG, K. K., CHEUNG, S. O., HUANG, L., NIU, J., TAO, C., HO, C. M., CHE, C. M. & TAM, P. K. 2009. Further evidence of the anti-inflammatory effects of silver nanoparticles. *ChemMedChem*, 4, 1129-35.
- XIA, J., ZHANG, S., ZHANG, Y., MA, M., XU, K., TANG, M. & GU, N. 2008. The relationship between internalization of magnetic nanoparticles and changes of cellular optical scatter signal. *J Nanosci Nanotechnol*, 8, 6310-5.
- XIAO, L., TAKADA, H., GAN, X. & MIWA, N. 2006. The water-soluble fullerene derivative "Radical Sponge" exerts cytoprotective action against UVA irradiation but not visible-light-catalyzed cytotoxicity in human skin keratinocytes. *Bioorg Med Chem Lett*, 16, 1590-5.
- YAMASHITA, K., SAKAI, M., TAKEMOTO, N., TSUKIMOTO, M., UCHIDA, K., YAJIMA, H., OSHIO, S., TAKEDA, K. & KOJIMA, S. 2009. Attenuation of delayed-type hypersensitivity by fullerene treatment. *Toxicology*, 261, 19-24.
- YIN, J. J., LAO, F., FU, P. P., WAMER, W. G., ZHAO, Y., WANG, P. C., QIU, Y., SUN, B., XING, G., DONG, J., LIANG, X. J. & CHEN, C. 2009. The scavenging of reactive oxygen species and the potential for cell protection by functionalized fullerene materials. *Biomaterials*, 30, 611-21.
- ZUCKER, R. M., MASSARO, E. J., SANDERS, K. M., DEGN, L. L. & BOYES, W. K. 2010. Detection of TiO₂ nanoparticles in cells by flow cytometry. *Cytometry A*, 77, 677-85.

Table 2.1 Characterization of Ag and C₆₀ NPs

Nanoparticles	Description	Average size	Purity	Surface Area	Hydrodynamic diameter ^d	Zeta (ζ) potential
Ag	Silver Nanopowder ^a	≤ 100 nm	≥ 99,5% ^b	5,0 m ² /g	185 ± 44 nm (91,6 %) 32 ± 6 nm (8,4%)	-10,1 ± 0,9 mV
C ₆₀	Fullerene crystals (sublimed)	≤ 100 nm	≥ 99,85% ^c	n/a	478 ± 93 nm (89,8 %) 18 ± 8 nm (10,2%)	-11,4 ± 0,7 mV

^acontains polyvinylpyrrolidone (PVP) as dispersant

^bTrace Metals Analysis

^cHPLC

^dUsing dynamic light scattering

2.3.8 Figure caption

Figure 2.1 Concentration effect on cellular binding and uptake into WE17/10 cells of (a) Ag-NPs and (b) C₆₀-NPs. The cells were treated with 5, 10, 25, 50, 75 and 100 µg/ml of particles for 72h. Scatter distribution (SSC) ratio was chosen as a measure of cellular binding/uptake. Data are expressed as means ± SEM from three or four independent experiments, *(p < 0.05), **(p < 0.01), ***(p < 0.0001).

Figure 2.2 WE17/10 cells proliferation in presence of (a) Ag-NPs and (b) C₆₀-NPs. Cells were initially labelled with CFSE as described in Experimental Methods section. Cells were then treated with 5, 10, 25 and 50 µg/ml for Ag-NPs, and an addition of 75 and 100 µg/ml for C₆₀-NPs for 72h. IL-2 dependent proliferation was determined by measuring CFDA fluorescence. Data are expressed as means ± SEM of three or four independent experiments, *(p < 0.05), ***(p < 0.0001).

Figure 2.3 (a) ROS production following exposure to C₆₀-NPs. WE17/10 cells were treated with 5, 10, 25, 50, 75 and 100 µg/ml of NPs for 24h. ROS production was determined by measuring H₂DCFDA probe fluorescence as described in Experimental Methods section. Data are expressed as means ± SEM of two independent experiments, *(p < 0.05), **(p < 0.01). (b) IL-2Rα expression in WE17/10 cells in presence of Ag and C₆₀-NPs. WE17/10 cells were incubated with 25 µg/ml of Ag and C₆₀-NPs for 24h, 48h or 72h. IL-2Rα expression was analysed by flow cytometry using Alexa Fluor 488-conjugated anti-human IL-2Rα as described in Experimental Methods section. Data are expressed as means ± SEM from one experience representative of three independent experiments, *(p < 0.05), **(p < 0.01), ***(p < 0.0001).

Figure 2.4 (a) ERK and (b) JNK activation in WE17/10 cells following Ag and C₆₀-NPs treatment. WE17/10 cells were challenged with 25 µg/ml Ag and C₆₀-NPs for 6h, 24h and 48h. Western immunoblotting was used to detect (a) ERK and (b) JNK levels of phosphorylation. Values for protein levels were obtained by densitometry analysis using Image Lab software and normalized against non-phosphorylated protein levels (represents at least four independent trials, *(p < 0.05)).

Figure 2.5 Stat5 activation in WE17/10 cells following Ag and C₆₀-NPs treatment. (a) WE17/10 cells were challenged with 25 µg/ml Ag and C₆₀-NPs for 6h, 24h and 48h. Western immunoblotting was used to detect Stat5 levels of phosphorylation. Values for protein levels were obtained by densitometry analysis using Image Lab software and normalized against non-phosphorylated protein levels

(represents at least four independent trials, $(p < 0.01)$). (b) WE17/10 cells were challenged with 25 $\mu\text{g/ml}$ Ag or C₆₀-NPs for 72h. 30 U/ml of IL-2 was added in a condition following 48h incubation. Western immunoblotting was used to detect Stat5 levels of phosphorylation.

Suppl. 2.S1 ROS production following PMA treatment in presence of Ag-NPs. PBS washed WE17/10 cells were incubated in a solution of PBS containing 1g/L of glucose, 5 μM H₂DCFDA probes, and 1,5 μM PMA, in presence or not of Ag-NPs at 20 $\mu\text{g/ml}$ for 45 min. ROS production was determined by measuring H₂DCFDA probes' fluorescence by flow cytometry. Data are expressed as means \pm SEM of one experiment with three replicates, $(p < 0.05)$.

Suppl. 2.S2 ROS production following PMA treatment in presence of Ag-NPs. PBS washed WE17/10 cells were incubated in a solution of PBS containing 1g/L of glucose, 5 μM H₂DCFDA probe, and 1,5 μM PMA, in presence or not of Ag-NPs at 20 $\mu\text{g/ml}$ for 45 min. ROS production was determined by measuring H₂DCFDA probe fluorescence by flow cytometry. Data are expressed as means \pm SEM of one experiment with three replicates, $(p < 0.05)$.

Figure 2.1 Concentration effect on cellular binding and uptake into WE17/10 cells of (a) Ag-NPs and (b) C₆₀-NPs

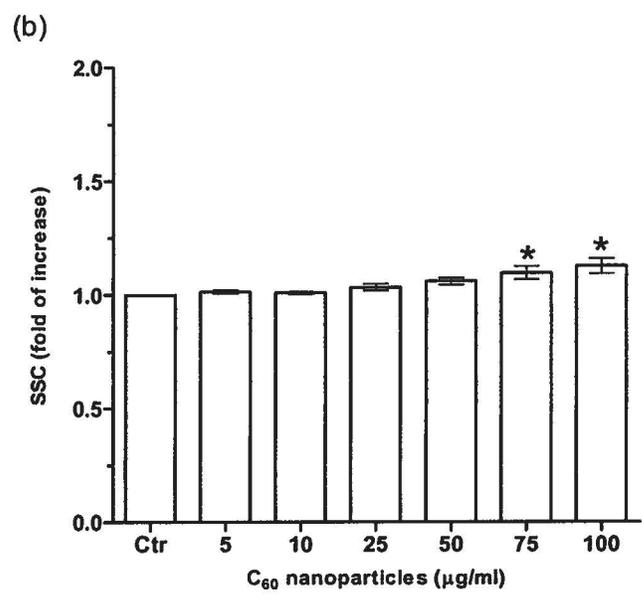
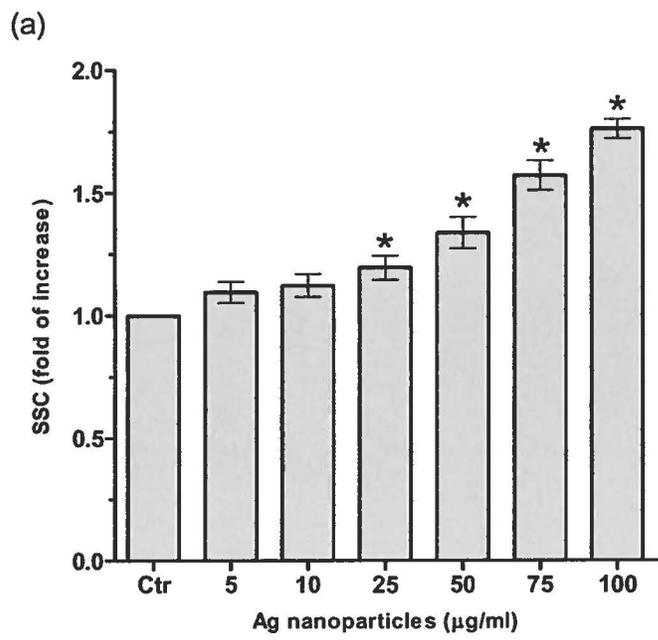


Figure 2.2 WE17/10 cells proliferation in presence of (a) Ag-NPs and (b) C₆₀-NPs

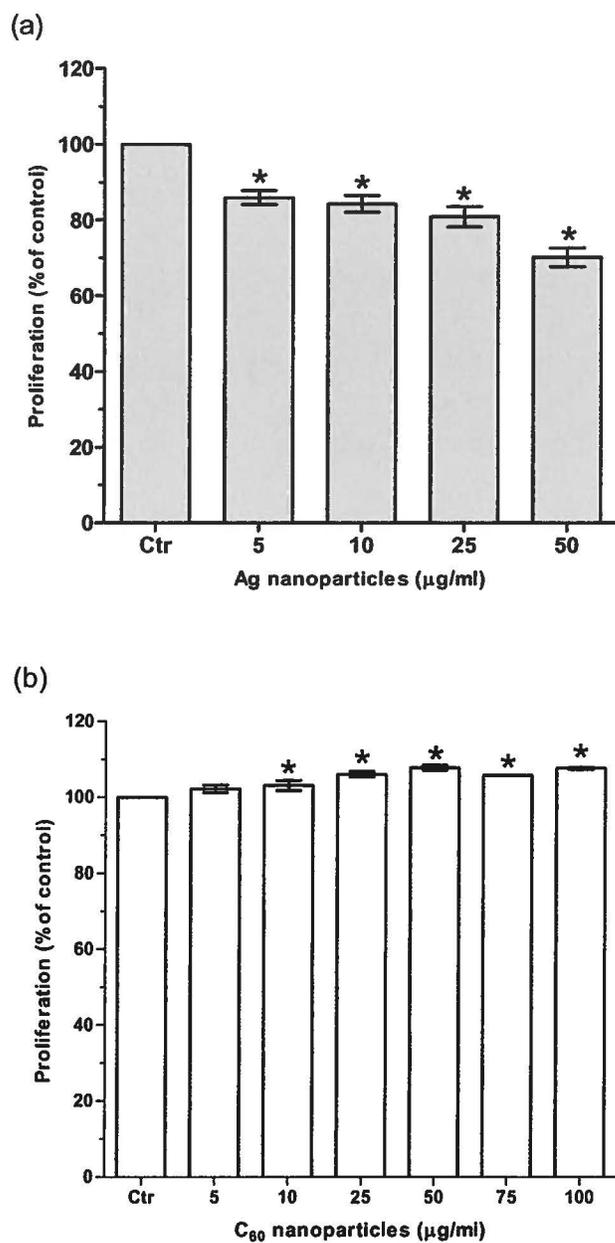


Figure 2.3 (a) ROS production following C₆₀-NPs exposition (b) IL-2R α expression in WE17/10 cells in presence of Ag and C₆₀-NPs

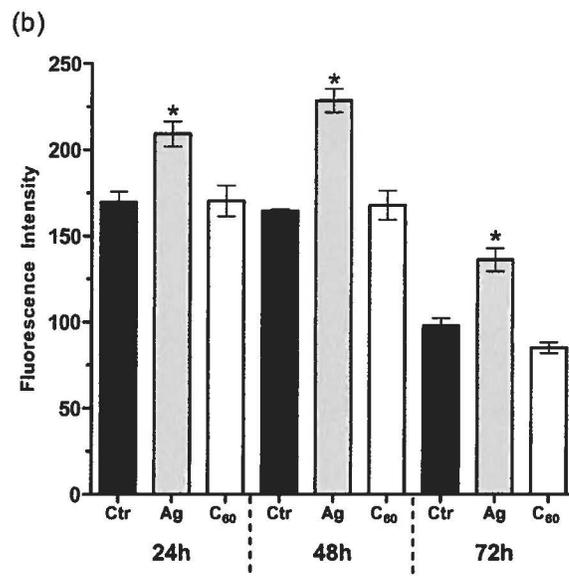
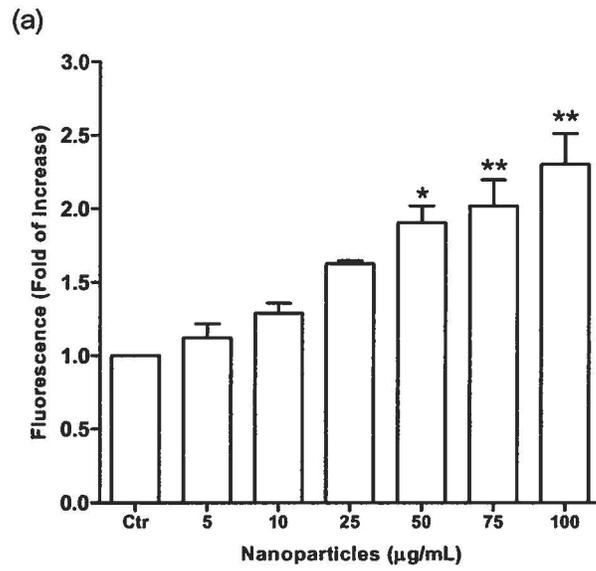


Figure 2.4 (a) ERK and (b) JNK activation in WE17/10 cells following Ag and C₆₀-NPs treatment

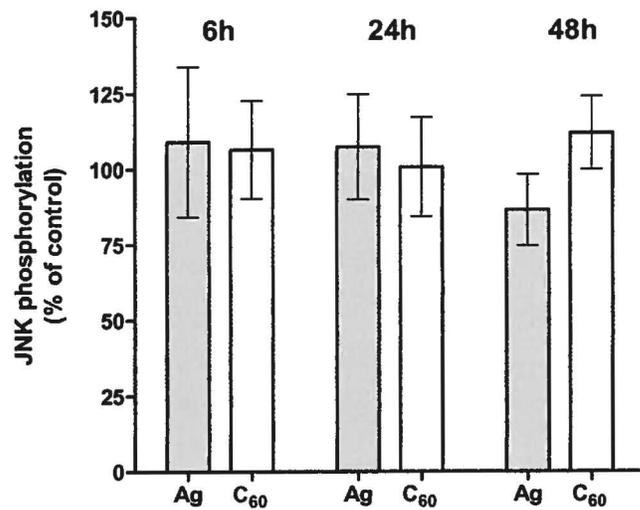
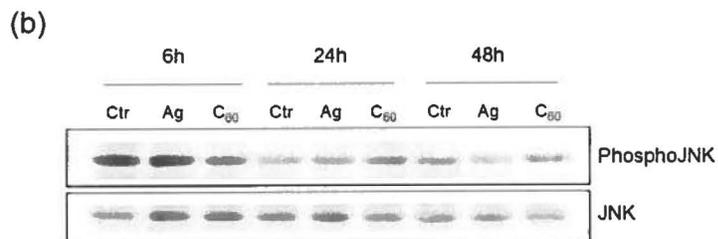
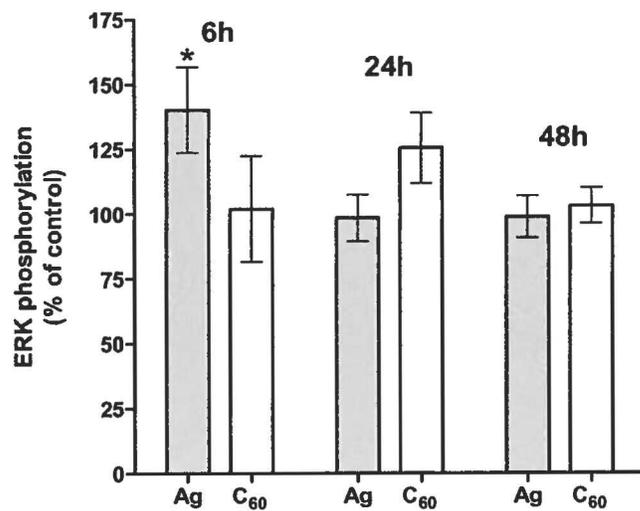
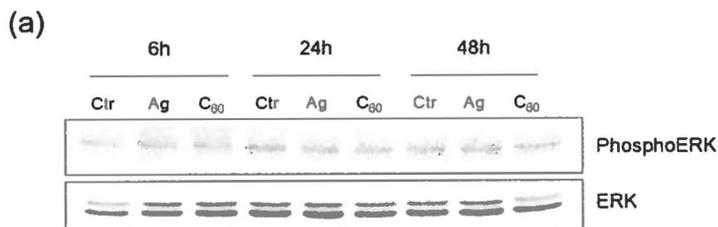
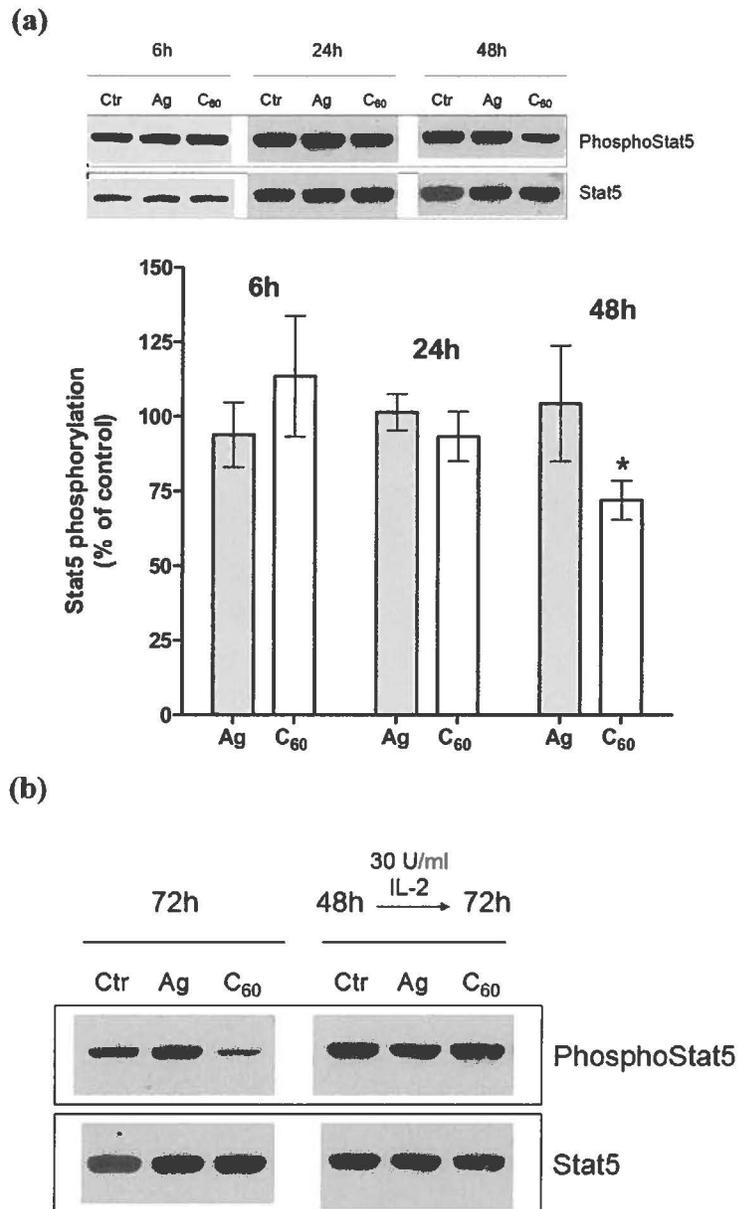
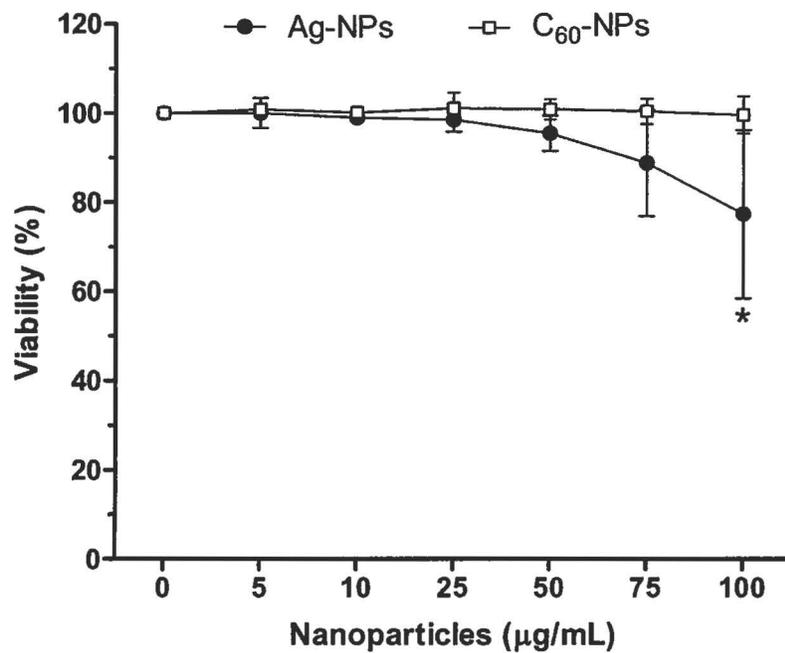


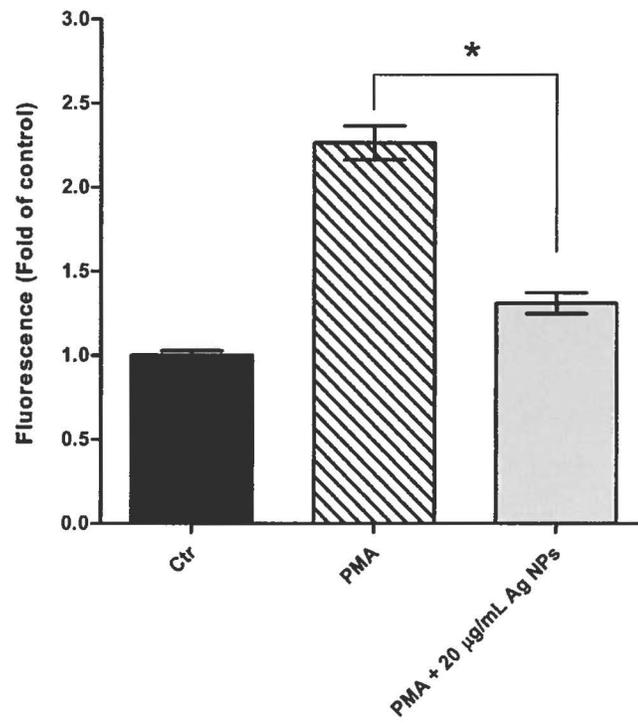
Figure 2.5 Stat5 activation in WE17/10 cells following Ag and C₆₀-NPs treatment



Supplemental figure 2.S1 Percent viability measured by propidium iodide exclusion following Ag and C₆₀-NPs treatment.



Supplemental figure 2.S2 ROS production following PMA treatment in presence of Ag-NPs



Chapitre 3 : Zinc iron oxide nanoparticles' effect on interleukin-2-dependent proliferation of CD4(+) T cells

3.1 Contribution à l'article

J'ai effectué l'ensemble des mises au point techniques, des expériences en laboratoire et des traitements des résultats pour cet article. J'ai également rédigé l'ensemble de la première version de l'article. Mon directeur, Dr. Jacques Bernier, a supervisé l'ensemble du projet présenté et corrigé la version finale de l'article soumis.

3.2 Résumé en français

La plupart des études en nanotoxicologie utilisent des lymphocytes quiescents. Pour cette étude, la lignée cellulaire T lymphoblastoïde IL-2-dépendante, WE17/10, a été utilisée pour évaluer la possible interférence entre les nanoparticules de $ZnFe_2O_4$ et la prolifération dépendante à l'IL-2. Les résultats ont montré que ces nanoparticules n'affectaient pas la viabilité cellulaire à des concentrations allant jusqu'à 100 $\mu\text{g/ml}$, mais induisaient une augmentation du stress oxydatif à partir d'une exposition à 50 $\mu\text{g/ml}$. Les mesures de prolifération à l'aide du composé CFSE à la suite d'incubations de 72h en présence des nanoparticules de $ZnFe_2O_4$ ont montré une légère augmentation de la prolifération à la concentration la plus faible (5 $\mu\text{g/ml}$) ou la plus élevée (100 $\mu\text{g/ml}$). Deux protéines clés dans la transmission de signal à la suite de l'activation du récepteur à l'IL-2, STAT5 et ERK1/2, ont été analysées par immunobuvardage de type western. Les résultats n'ont montré aucun effet des nanoparticules sur le niveau de phosphorylation de ERK1/2 et une légère réduction de celui de STAT5. Une analyse à large spectre de différentes tyrosines kinases par réseaux d'anticorps a permis d'identifier plusieurs protéines qui sont activées par la présence des nanoparticules de $ZnFe_2O_4$, incluant Fer, Fyn et plusieurs types de récepteurs Eph. Cet effet pourrait potentiellement mener à une interférence dans différents processus cellulaires par les nanoparticules de $ZnFe_2O_4$ à la suite de l'exposition humaine, mais une exposition modérée à ces nanoparticules ne semblent pas représenter de risque immédiat pour la santé humaine d'après nos observations.

3.3 Article soumis

Zinc iron oxide nanoparticles' effect on interleukin-2-dependent proliferation of CD4(+) T cells

Guillaume Côté-Maurais & Jacques Bernier*

Institut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada, 531
boul. des Prairies, Laval, Québec, Canada H7V 1B7

*Corresponding author. Tel.: +1 450 687 5010x8813; fax: +1 450 686 5501.
E-mail address: jacques.bernier@iaf.inrs.ca

Keywords : ZnFe_2O_4 , nanoparticle, toxicity, T-lymphocyte, IL-2

3.3.1 Abstract

Most nanotoxicological studies use quiescent lymphocytes. For this study, the IL-2-dependent T lymphoblastoid WE17/10 cell line was used to evaluate a possible interference of ZnFe₂O₄ nanoparticles on IL-2-dependent proliferation. Results have shown that these nanoparticles had no effects on cell viability at up to 100 µg/ml, but increased oxidative stress following an exposure to 50 µg/ml. Proliferation measurements by CFSE following a 72h incubation period have shown that ZnFe₂O₄ nanoparticles slightly increase proliferation at low (5 µg/ml) or high (100 µg/ml) concentrations. Analyses of two key signalling proteins activated by IL-2 receptor (STAT5 and ERK1/2) by western immunoblotting have shown no effects from nanoparticles on ERK1/2 phosphorylation, but showed a slight reduction of STAT5 phosphorylation. Large-scale analyses of different tyrosine kinases by antibody array have identified several proteins that are activated by the presence of ZnFe₂O₄ nanoparticles, including Fer, Fyn and many types of Eph receptors. Those effects could have potential interfering consequences following human exposures, but moderate exposures to ZnFe₂O₄ nanoparticles do not seem to pose potential health problems based on our observations.

3.3.2 Introduction

Magnetic nanoparticles (NPs) are among the most promising materials for nanotechnologies. The interest in them is due to their unique properties, where most of them show superparamagnetism, meaning they quickly respond to an applied magnetic field with a negligible remanence (residual magnetism) (Lu et al. 2007). Their magnetic moment constant is also very high, hence the strong force that magnets exert on them (Sievers et al. 2012). For this reason, they could be used for data storage applications, magnetic resonance imaging (MRI), site-specific gene and drug delivery, and to achieve localized tumor heating with an external alternating magnetic field (Akbarzadeh et al. 2012; Kim et al. 2007; Kobayashi 2011; Sun et al. 2008; Wahajuddin and Arora 2012). Each potential application requires different properties. Spinel ferrite NPs, with the general formula MFe_2O_4 (where M represents a +2 cation of Fe, Ni, Mn, Zn or Co), are an important type of magnetic NP because of their good chemical and thermal stability (Willard et al. 2004). Zinc ferrite, or zinc iron oxide ($ZnFe_2O_4$), NPs are among the interesting ferrites because they possess a large photo-response in the visible light region and a good photochemical stability (Zhang et al. 1994). $ZnFe_2O_4$ NPs also have enhanced chemical reactivity, which explains their use in the removal of sulfur-containing impurities from coal gas (Leminea et al. 2011; Sepelák et al. 1997). Finally, they also have the potential to be used for MRI as contrast agents and for drug delivery (Rishikeshi et al. 2013).

In parallel applications development, studies evaluating possible toxic effects must also be executed. To our knowledge, only one study has assessed the toxicity of $ZnFe_2O_4$ NPs. Exposure to high concentrations of these NPs can slightly reduce viability of HeLa cells, unlike an exposure to the same concentrations of the much more studied Fe_3O_4 NPs (Tomitaka et al. 2009). Some derivatives of $ZnFe_2O_4$ NPs have been used in nanotoxicological researches. $Mn_{0.2}Zn_{0.8}Fe_2O_4$ and $CuZnFe_2O_4$ NPs have shown cytotoxicity only at high concentrations in endothelial human cells and lung epithelial human cells (A549) respectively (Beji et al. 2010; Karlsson et al. 2008). Karlsson et al. had compared the effects of many NPs in their study, including $CuZnFe_2O_4$, Fe_3O_4 , ZnO and CuO NPs. They measured a similar toxicity following an exposure to $CuZnFe_2O_4$ and Fe_3O_4 NPs, whereas the toxicity was much stronger with ZnO and CuO NPs (Karlsson et al. 2008). These results indicate that the interaction of $ZnFe_2O_4$ NPs with cells seems more comparable to Fe_3O_4 than to ZnO NPs.

Because of their potential biomedical applications, the effects of magnetic NPs, mostly Fe₃O₄, on the immune system have recently been studied. Cytokine production is generally modified following Fe₃O₄ administration to mice, as was measured *in vivo* or *in vitro* with isolated splenocytes exposed *in vivo* (Chen et al. 2010; Park et al. 2010; Shen et al. 2012; Shen et al. 2011). Studies have shown dichotomous results, since interferon- γ (IFN- γ) and interleukin-4 (IL-4) productions are increased or decreased depending on the study. The methodology involves the injection of a single dose of Fe₃O₄ NPs. Park et al. evaluated the evolution of cytokine concentrations following an intratracheal instillation (Park et al. 2010). They measured an increase of IL-4 and IL-2 concentrations with time in the bronchoalveolar lavage (BAL) fluid, with a maximum of 28 days after the instillation. Pharmacokinetic studies have shown that Fe₃O₄ NPs possess an elevated half-life and are mostly retained in the reticuloendothelial system (Moghimi et al. 2005; Moller et al. 2001; Wang et al. 2010). These studies indicate that the immune system could be influenced by the presence of Fe₃O₄ NPs. Nevertheless, information on the direct effects of magnetic NPs on immune cells is still lacking.

CD4 T lymphocytes are involved in the regulation of the adaptive immune response. Their activation, following a T cell receptor (TCR) interaction with class II major histocompatibility complex molecules containing a foreign antigen expressed on presenting cells, induces their proliferation and cytokine production (Qian and Weiss 1997). IL-2 is mostly produced by activated CD4 T cells, but also by activated CD8 T cells, dendritic cells (DCs), natural killer (NK) cells, and NKT cells (Malek 2008; Setoguchi et al. 2005). It is an essential mediator of the immune response of CD4 T cells (Gaffen 2001; Walker et al. 1988). The high affinity IL-2 receptor (IL-2R) is constituted of three chains, IL-2R β (CD122), IL-2R α (CD25) and γ c chain (CD132) (Malek and Castro, 2010). Only IL-2R α is induced by stimulation and converts the IL-2R β - γ c receptor to a high affinity receptor for IL-2 (Malek and Castro 2010). The expression of IL-2R α is important for the effective response of CD4 T cells in humans, because a deficiency in IL-2R α leads to a severe immunodepression (Aoki, et al. 2006, Caudy et al. 2007). Several signaling pathways are triggered following the binding of IL-2 to its receptor. They are initiated following the activation of Janus kinase 1 (JAK1), associated with the γ c chain, and JAK3, via IL-2R β . These kinases subsequently activate signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5), mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), leading to the transcription of proinflammatory cytokines and of survival and cell cycle genes (Hoyer et al. 2008; Malek 2008; Malek and Castro 2010).

In this study, the cytotoxic effects of ZnFe₂O₄ NPs on the IL-2-dependent proliferative response of CD4 T cells were determined. Our results showed that these NPs slightly increase ROS without reducing cell viability. Cell proliferation was increased in the presence of ZnFe₂O₄ NPs in every concentration tested, without affecting IL-2R α expression, suggesting that their effect on proliferation could be downstream. Phosphorylation levels of ERK1/2 and STAT5, two key downstream signaling proteins, were evaluated. ERK1/2 levels were unchanged, while STAT5 phosphorylation was reduced in the presence of ZnFe₂O₄ NPs. The large-scale analysis performed by an antibody array identified several kinases that were upregulated following an exposure to these NPs, including Fer, Fyn and many types of Eph receptors. Therefore, those effects on signaling pathways could potentially interfere with CD4 T cell metabolism.

3.3.3 Methods

ZnFe₂O₄ nanoparticles

ZnFe₂O₄ NPs with <100 nm diameter and >99% purity were purchased from Sigma-Aldrich (St-Louis, Missouri, USA). Hydrodynamic particle size and zeta potential measurement in complete medium (wet state, 50 μ g/ml) were performed by dynamic light scattering (DLS) using Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern, Worcestershire, UK). The characterizations of the ZnFe₂O₄ nanoparticles are shown in Table 1.

Cells Culture

The IL-2-dependent T lymphoblastoid WE17/10 cell line was maintained in RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) supplemented with 20% heat-inactivated fetal bovine serum (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), antibiotic solution (100 IU/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin; Sigma-Aldrich), 10 mM HEPES (Sigma-Aldrich) and 50 U/ml of recombinant human IL-2 (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA). Cells were maintained in 5% CO₂ humidified incubator at 37°C. Before each experiment, cells were washed twice with PBS and resuspended in complete medium containing 30 U/ml of IL-2.

Nanoparticles preparation and cells treatment

Stock solutions of ZnFe₂O₄ NPs were prepared at 2 mg/ml in sterile deionized water. NPs were dispersed by sonication on ice for 5 minutes, followed by addition of BSA and PBS 10X to yield a concentration of 15 mg/ml and 1X respectively. It was shown that albumin stabilizes NPs dispersion

(Bihari et al. 2008). Cells were then immediately treated with NPs from the stock solution to obtain a range of concentrations from 5 to 100 µg/ml. Controls were treated with the vehicle.

Intracellular reactive oxygen species measurement

To measure reactive oxygen species (ROS) generation, 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA; Invitrogen) was utilized. Briefly, cells were treated with different concentrations of nanoparticles for 24h or 48h. After washing, cells were incubated with 5 µM DCFH-DA prepared in PBS containing 1 g/L of glucose for 45 min in the dark (incubator, 37°C). DCFH-DA passively enters the cell, and is hydrolyzed by esterases to DCFH. This nonfluorescent molecule is then oxidized to become a fluorescent compound, dichlorofluorescein (DCF), by cellular oxidants (Song et al. 2010). At the end of incubation, the fluorescence intensity was measured by flow cytometry with FACScan[®] (BD Biosciences, Mississauga, On, Canada). To ensure the cells' capability of ROS production, positive control samples were activated with 1,5 µM PMA during the 45 minutes of loading with DCFH-DA. NPs were excluded from the analysis based on the absence of fluorescence signal and forward-scattered light (FSC) and SSC characteristics. Histogram analyses were performed using WinMdi software by gating only live cells.

Proliferation measurement using Carboxyfluorescein succinimidyl ester labeling

Cells were diluted (10×10^6 cells/ml) in a solution of HBSS supplemented with 0.1% BSA and incubated for 10 min at 37°C with carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE; Invitrogen) at a final working concentration of 5 µM. CFSE was subsequently neutralized by adding ice-cold complete RPMI to cells followed by 5 min incubation at room temperature, and washed once with complete RPMI. CFSE-labeled WE17/10 cells were cultured for 72 h in 24-well plates in the presence of NPs and fluorescence was measured by flow cytometry using FACScan[®] (BD Biosciences).

Phenotyping analysis

WE17/10 cells were collected following treatment with nanoparticles for 24h, 48h and 72h. 0.25×10^6 cells were washed twice with PBS. Nonspecific binding sites were blocked with 10 µg/ml human IgG (Sigma–Aldrich) and cells were stained with 0,2 µg of mouse anti-human: IL-2R α Alexa Fluor 488 conjugated antibody (eBioscience, San Diego, CA, USA). Cells were washed twice with ice-cold PBS and analyzed by flow cytometry with FACScan[®] (BD Biosciences). Analysis was performed as described above.

Western Immunoblotting

Following nanoparticles exposure, WE17/10 cell extracts were prepared in lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, and 1% Triton X-100] supplemented with 1 mM EDTA, 1X Halt protease inhibitor cocktail (78430; Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) and 1X Halt phosphatase inhibitor cocktail (78428; Pierce Biotechnology). The soluble protein concentration was determined using the BCA protein assay (Pierce Biotechnology). Protein samples (30 µg) were separated by SDS-PAGE and transferred onto a PVDF or nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Membranes were blocked with 5% non-fat dry milk or 3% BSA diluted in Tris-buffered saline-Tween (TBS-T; 50 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, and 0.1 % Tween) for 1 h at room temperature and hybridized overnight at 4°C with anti-phosphoERK1/2 or anti-phosphoSTAT5 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) prepared in blocking buffer. Specific antibody-antigen complexes were identified using a horseradish peroxidase (HRP) linked sheep anti-mouse IgG (NA931V; GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom) and SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate (Pierce Biotechnology). Membranes were stripped and re-probed with anti-ERK1/2 or anti-STAT5 to evaluate protein loading in each sample.

Antibody Array

The phosphorylation level of tyrosine kinases was quantified using Human Phosphorylation Array (RayBiotech, Norcross, GA, USA). The assay was performed by strictly adhering to the manufacturer's instructions. Briefly, lysates from control cells and cells treated for 24h with 50 µg/ml of ZnFe₂O₄ NPs were separately incubated overnight at 4°C on antibody arrays. After washing, biotinylated anti-phosphotyrosine antibodies were added and incubated for 2h at room temperature. After incubation with streptavidin-conjugated HRP, the signal was then visualized by chemiluminescence.

Statistical analysis

Results are presented as mean ± standard error of the mean (SEM) of 3 replicates in each experiment. Each experiment was performed at least three times. Data analysis was carried out by one-way analyses of variance (ANOVA), followed by two-sided Dunnett's test as a post hoc analysis with the InStat statistics program (GraphPad Software, San Diego, CA). Differences were considered significant when $P < 0.05$.

3.3.4 Results

Assessment of ROS generation

The toxic effect of nanoparticles is associated with an increase in oxidative stress (Oberdorster et al. 2005). Initially, tests have been performed using propidium iodide exclusion assay to ensure that cell viability was not affected in the range of concentrations tested. Results have shown that NPs had no effects on cell viability at up to 100 $\mu\text{g/ml}$ following a 72h exposure (Data not shown). To evaluate if an exposure to ZnFe_2O_4 NPs affects the level of oxidative stress in WE17/10 cells, ROS levels were measured in proliferating cells after 24h and 48h. After 24h, a significant dose-dependent increase of ROS was measured from 50 $\mu\text{g/ml}$ to the highest dose used (Fig. 1). After 48h of exposure, a persistent and significant increase of ROS in cells exposed to ZnFe_2O_4 NPs was noted, even at 25 $\mu\text{g/ml}$.

Effect of ZnFe_2O_4 on cellular proliferation

Proliferation of WE17/10 cells is IL-2-dependent. The effect of ZnFe_2O_4 NPs on IL-2 proliferation response was measured for 72h. The results represent the ratio of fluorescence intensity (Gmean) read for cells exposed to vehicle on Gmean of cells exposed to ZnFe_2O_4 NPs (Fig. 2). Exposure to ZnFe_2O_4 NPs significantly increases the IL-2-dependent proliferative response from the lowest concentration of 5 $\mu\text{g/ml}$ to the highest concentration.

Phenotyping analysis following NPs exposition

In order to determine whether the expression of IL-2R at T cell surfaces would be influenced by the presence of ZnFe_2O_4 NPs, IL-2R α expression on cells' surface was determined. Measurements were taken at 24h, 48h and 72h following incubation with ZnFe_2O_4 NPs. Results showed that ZnFe_2O_4 NPs have no effects on cells expressing IL-2R α and on their expression level at any time during the incubation, suggesting that their effect on proliferation could be downstream (Fig. 3).

Impact of ZnFe_2O_4 NPs on ERK1/2 and STAT5 signaling

We investigated the effects of ZnFe_2O_4 NPs on two major signaling pathways triggered by the IL-2R by measuring the activation levels of ERK1/2 and STAT5. ERK1/2 signals are involved in proliferation and cell survival in response to IL-2 (Gaffen 2001). STAT5 is a transcription factor that regulates genes important for effector function and T cell growth (Malek 2008). Results showed that the presence of ZnFe_2O_4 NPs does not influence phosphorylation levels of ERK1/2 at any time point during the incubation (Fig. 4). For STAT5 activation, no significant effect was measured after 6h of

incubation. From 24h to 48h, STAT5 phosphorylation was lower than the control and this decrease was more important after 48h (Fig. 5).

Consequence of ZnFe₂O₄ NPs' exposition on tyrosine kinases activation

In order to determine at large scale which signaling pathways ZnFe₂O₄ NPs act on to increase cell proliferation, an antibody array had been executed following a 24h exposure to 50 µg/ml NPs. This antibody array included phosphorylation levels of 71 different human tyrosine kinases. Results thus presented include proteins that play a significant role in the T cells' metabolism or proteins showing a large difference in the level of phosphorylation as compared to control, with a difference of 0,3 or more (Table 2). Both ABL1 and Fer kinase had a greater activation level following NPs exposure, with an upregulation of 1,27 and 2,10 respectively. These kinases are proto-oncogenes, therefore their upregulation following ZnFe₂O₄ exposure could explain the increased proliferation. Conversely, ROS kinase's activation, another proto-oncogene, was reduced (0,52) in the presence of ZnFe₂O₄ NPs. FRK (Fyn-related kinase), a potent tumor suppressor, was upregulated by 1,27. Several types of Eph receptors, the largest family of receptor tyrosine kinases in the mammalian genome, were upregulated (Pasquale 2008).

Regarding kinases playing a central role in T cell metabolism, ZnFe₂O₄ NPs exposure increased phosphorylation levels of all Jaks, Jak1 (1,42), Jak2 (1,44), Jak3 (1,15), and Tyk2 (1,46). This kinase family transduces signals initiated by most cytokines (Liu et al. 1998). Interestingly, IL-2-inducible T-cell kinase (Itk) was also upregulated, which indicated increased IL-2 signaling. Itk is phosphorylated following T cell activation and signal actin reorganization (Smith-Garvin et al. 2009). Few other kinases, including Lck (0,73) and ZAP70 (0,73), were downregulated. Their activations were equally reduced, which is in accordance with their connection, since Lck activates ZAP70 (Smith-Garvin et al. 2009). Lck, a member of the Src family, is phosphorylated following TCR activation and is involved in T_H2 differentiation via activation of ERK1/2 (Yamane and Paul 2012). This Lck-reduced phosphorylation could be the result of an 1,27 upregulation of Csk following ZnFe₂O₄ NPs exposure. Csk phosphorylates Lck on its negative regulatory residue and Lck subsequently undergoes dephosphorylation on its positive regulatory residue by phosphatases (Vang et al. 2012). Fyn, another member of the Src family, is upregulated by 3,60 in the presence of ZnFe₂O₄ NPs. Syk, a kinase also implicated in TCR signaling, is not affected, with a phosphorylation level of 0,97 relative to a control sample. Altogether, antibody array results indicate an upregulation of several pro-proliferation kinases, but generally a reduced activation of TCR signaling.

3.3.5 Discussion

Nanotechnologies are among the most promising innovations, as they possess a variety of potential uses. Nanotoxicological studies are therefore increasingly important to ensure safe use of these technologies. For now, these studies are usually performed with the most common nanomaterials. Information on the possible toxic effects of ZnFe₂O₄ NPs is rather limited, hence the interest of our study. Considering their potential biomedical applications, ZnFe₂O₄ NPs will enter the human body via the peripheral blood circulation and be in contact with cells of the immune system. In this study, an IL-2-dependent T lymphoblastoid cell line (WE17/10) was selected to evaluate the *in vitro* effects of ZnFe₂O₄ NPs. NPs exhibited no apparent effect on cell viability at up to 100 µg/ml. Extrapolation to another cell type is limited, because NPs' toxicity is usually cell type-dependent. It has been observed that T cells are much more resistant to ZnO NPs' toxicity than other cell types (Song et al. 2010). A study had measured a significant viability loss in HeLa cells exposed for 48h to 100 µg/ml ZnFe₂O₄ NPs (Tomitaka et al. 2009).

NPs of different chemical compositions are generally considered to generate oxidative stress (Oberdorster et al. 2005). It was still to be determined if that was the case for ZnFe₂O₄ NPs, and on WE17/10 cell line. Results showed an increase of intracellular ROS following ZnFe₂O₄ NPs exposure from 50 µg/ml. This augmentation was more elevated after 48h of incubation compared to 24h, meaning that an induction of the cells' antioxidant defense could not counteract ROS increase. However, the augmentation was not high enough to affect cell viability. Therefore, proliferative response to IL-2 has been evaluated at concentrations between 5 and 100 µg/ml. There was a significant increase of proliferation in the presence of NPs. This effect was independent from IL-2R α expression, which indicates that the effect is downstream of IL-2R. Other studies have also observed an increased cell proliferation in the presence of NPs (Sydlik et al. 2006; Unfried et al. 2008). They have shown that carbon black and silica NPs induced the proliferation in a rat lung epithelial cell line. Further studies have shown that this effect was mediated by ERK1/2 and Akt (Sydlik et al. 2006; Unfried et al. 2008).

Two key proteins of IL-2R signaling and implicated in T cell proliferation, ERK1/2 and STAT5, were investigated for their level of activation by western immunoblotting. For the MAPK

ERK1/2, no significant effect was observed at any time during the incubation with ZnFe₂O₄ NPs. This result differs from another study that had observed enhanced neurite outgrowth following exposure to Fe₃O₄ NPs via an increase of ERK1/2 phosphorylation (Kim et al. 2011). As for the transcription factor STAT5, there was a significant suppressing effect from NPs following 24h of incubation, and this effect was stronger after 48h. From these results, an action via IL-2R tyrosine phosphorylation as a mechanistic explanation for ZnFe₂O₄ NPs' effects on cell proliferation seems unlikely. STAT5 is known to regulate the level of expression of IL-2R α (Malek 2008). This contradicts the result showing that ZnFe₂O₄ NPs have no effect on IL-2R α expression. There could be compensation from other cellular pathways to keep a constant IL-2R α expression.

Cellular response is dynamic and the ultimate phenotype is affected by a myriad of competing or overlapping signals present in the microenvironment. Therefore, an antibody array was performed for large-scale analysis to determine other signaling pathways affected by ZnFe₂O₄ NPs exposure. These NPs had an effect on the level of activation of several tyrosine kinases. Fer kinase was significantly upregulated, which is interesting because it is an intracellular tyrosine kinase activated by ROS that supports cell growth under abnormal conditions (Sangrar et al. 2007). ROS generated following ZnFe₂O₄ exposure could explain this effect. It has been shown that it also sustains the activation of ERK1/2 under hypoxia (Salem et al. 2005). This contradicts our results, since we have seen no effects on ERK1/2 phosphorylation following ZnFe₂O₄ NPs exposure.

Several ephrin (Eph) receptors were also strongly upregulated following ZnFe₂O₄ NPs exposure. Eph receptors are differentially expressed in most cell types (Pasquale 2008). Therefore, an effect on Eph receptor expression resulting from an exposure to ZnFe₂O₄ NPs could interfere with the diverse cell processes, including communication between neurons, thymocyte maturation and bone maintenance (Pasquale 2008). Fyn is another tyrosine kinase whose activation was significantly increased following ZnFe₂O₄ NPs exposure. It has diverse functions, mostly immune and neurological. It regulates cell-cell adhesion, cell cycle entry, growth, and proliferation (Saito et al. 2010). Thereby, an effect on this kinase's activity following ZnFe₂O₄ NPs exposure could also influence several biological processes.

There are currently few hypotheses in the field of nanotoxicology on the mechanisms explaining NPs' interactions with cellular processes, including proliferation. The most common is that ROS generated by NPs play a central role by activating several types of kinases. In this project, the

effect of ZnFe₂O₄ NPs on proliferation is significant at 5 µg/ml, a concentration that has shown no effect on ROS levels, so the ROS hypothesis seems unlikely. There is also the possibility that NPs slowly decompose and release ions. Therefore, ZnFe₂O₄ NPs could release Zn²⁺ ions during the incubation time. It has been shown that Zn²⁺ activates protein kinase C and promotes IL-2-dependent proliferation in T cells (Haase and Rink 2009; Kaltenberg et al. 2010). Kaltenberg et al. have also measured that Zn²⁺ presence was particularly important for ERK1/2 activation. Despite our observation of an increased proliferation of IL-2-dependent WE17/10 cell line after an exposure to ZnFe₂O₄ NPs, our results do not indicate that these NPs interfere with IL-2R signaling pathways. Large-scale antibody array analysis has shown that ZnFe₂O₄ NPs can affect the level of activation of several kinases, but we have not observed significant toxic effects or phenotypic modifications. From these observations, exposure to ZnFe₂O₄ NPs should not pose any health problems if the level of exposure is moderate. Results from the antibody array add information to support the understanding of the molecular mechanisms by which NPs induce cellular reactions, as several potential targets have been identified from this study.

3.3.6 Acknowledgments

We acknowledge the support of Environmental Health Research Network (RRSE), funded by the Fonds de la recherche en santé du Québec. We would like to acknowledge the Fondation Armand-Frappier for the research grant awarded to Guillaume Côté-Maurais.

3.3.7 Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

3.3.8 References

- Aasheim, H. C., Delabie, J. & Finne, E. F. 2005. Ephrin-A1 binding to CD4+ T lymphocytes stimulates migration and induces tyrosine phosphorylation of PYK2. *Blood*, **105**, 2869-76.
- Acquaviva, J., Wong, R. & Charest, A. 2009. The multifaceted roles of the receptor tyrosine kinase ROS in development and cancer. *Biochim Biophys Acta*, **1795**, 37-52.
- Akbarzadeh, A., Samiei, M. & Davaran, S. 2012. Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine. *Nanoscale Res Lett*, **7**, 144.
- Alfaro, D., Garcia-Ceca, J. J., Cejalvo, T., Jimenez, E., Jenkinson, E. J., Anderson, G., *et al.* 2007. EphrinB1-EphB signaling regulates thymocyte-epithelium interactions involved in functional T cell development. *Eur J Immunol*, **37**, 2596-605.
- Aoki, C. A., Roifman, C. M., Lian, Z. X., Bowlus, C. L., Norman, G. L., Shoenfeld, Y., *et al.* 2006. IL-2 receptor alpha deficiency and features of primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun*, **27**, 50-3.
- Beji, Z., Hanini, A., Smiri, L. S., Gavard, J., Kacem, K., Villain, F., *et al.* 2010. Magnetic properties of Zn-substituted MnFe₂O₄ nanoparticles synthesized in polyol as potential heating agents for hyperthermia. Evaluation of their toxicity on endothelial cells. *Chem. Mater.*, **22**, 5420-5429.
- Bihari, P., Vippola, M., Schultes, S., Praetner, M., Khandoga, A. G., Reichel, C. A., *et al.* 2008. Optimized dispersion of nanoparticles for biological in vitro and in vivo studies. *Part Fibre Toxicol*, **5**, 14.
- Carmel, M., Shpungin, S. & Nir, U. 2000. Role of positive and negative regulation in modulation of the Fer promoter activity. *Gene*, **241**, 87-99.
- Caudy, A. A., Reddy, S. T., Chatila, T., Atkinson, J. P. & Verbsky, J. W. 2007. CD25 deficiency causes an immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked-like syndrome, and defective IL-10 expression from CD4 lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol*, **119**, 482-7.
- Chapman, N. M., Yoder, A. N. & Houtman, J. C. 2012. Non-catalytic functions of pyk2 and fyn regulate late stage adhesion in human T cells. *PLoS One*, **7**, e53011.
- Chen, B. A., Jin, N., Wang, J., Ding, J., Gao, C., Cheng, J., *et al.* 2010. The effect of magnetic nanoparticles of Fe₃O₄ on immune function in normal ICR mice. *Int J Nanomedicine*, **5**, 593-9.
- Chu, D. H., Morita, C. T. & Weiss, A. 1998. The Syk family of protein tyrosine kinases in T-cell activation and development. *Immunol Rev*, **165**, 167-80.
- Deininger, M. W., Goldman, J. M. & Melo, J. V. 2000. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*, **96**, 3343-56.
- Fowell, D. J., Shinkai, K., Liao, X. C., Beebe, A. M., Coffman, R. L., Littman, D. R., *et al.* 1999. Impaired NFATc translocation and failure of Th2 development in Itk-deficient CD4+ T cells. *Immunity*, **11**, 399-409.
- Funk, S. D. & Orr, A. W. 2012. Ephs and ephrins resurface in inflammation, immunity, and atherosclerosis. *Pharmacol Res*, **67**, 42-52.
- Gaffen, S. L. 2001. Signaling domains of the interleukin 2 receptor. *Cytokine*, **14**, 63-77.
- Haase, H. & Rink, L. 2009. Functional significance of zinc-related signaling pathways in immune cells. *Annu Rev Nutr*, **29**, 133-52.
- Hagemeyer, A. & Graux, C. 2010. ABL1 rearrangements in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*, **49**, 299-308.
- Holen, H. L., Nustad, K. & Aasheim, H. C. 2010. Activation of EphA receptors on CD4+CD45RO+ memory cells stimulates migration. *J Leukoc Biol*, **87**, 1059-68.
- Hoyer, K. K., Dooms, H., Barron, L. & Abbas, A. K. 2008. Interleukin-2 in the development and control of inflammatory disease. *Immunol Rev*, **226**, 19-28.

- Kaltenberg, J., Plum, L. M., Ober-Blobaum, J. L., Honscheid, A., Rink, L. & Haase, H. 2010. Zinc signals promote IL-2-dependent proliferation of T cells. *Eur J Immunol*, **40**, 1496-503.
- Karlsson, H. L., Cronholm, P., Gustafsson, J. & Moller, L. 2008. Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chem Res Toxicol*, **21**, 1726-32.
- Kim, D., Hong, K. S. & Song, J. 2007. The present status of cell tracking methods in animal models using magnetic resonance imaging technology. *Mol Cells*, **23**, 132-7.
- Kim, J. A., Lee, N., Kim, B. H., Rhee, W. J., Yoon, S., Hyeon, T., *et al.* 2011. Enhancement of neurite outgrowth in PC12 cells by iron oxide nanoparticles. *Biomaterials*, **32**, 2871-7.
- Kitamura, T., Kabuyama, Y., Kamataki, A., Homma, M. K., Kobayashi, H., Aota, S., *et al.* 2008. Enhancement of lymphocyte migration and cytokine production by ephrinB1 system in rheumatoid arthritis. *Am J Physiol Cell Physiol*, **294**, C189-96.
- Kobayashi, T. 2011. Cancer hyperthermia using magnetic nanoparticles. *Biotechnol J*, **6**, 1342-7.
- Leminea, O. M., Bououdinac, M., Sajieddinee, M., Al-Saiee, A. M., Shafib, M., Khatabb, A., *et al.* 2011. Synthesis, structural, magnetic and optical properties of nanocrystalline ZnFe₂O₄. *Physica B: Condensed Matter*, **406**, 1989-1994.
- Leonard, W. J. & O'Shea, J. J. 1998. Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol*, **16**, 293-322.
- Liu, K. D., Gaffen, S. L. & Goldsmith, M. A. 1998. JAK/STAT signaling by cytokine receptors. *Curr Opin Immunol*, **10**, 271-8.
- Lu, A. H., Salabas, E. L. & Schuth, F. 2007. Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. *Angew Chem Int Ed Engl*, **46**, 1222-44.
- Malek, T. R. 2008. The biology of interleukin-2. *Annu Rev Immunol*, **26**, 453-79.
- Malek, T. R. & Castro, I. 2010. Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity. *Immunity*, **33**, 153-65.
- Moghimi, S. M., Hunter, A. C. & Murray, J. C. 2005. Nanomedicine: current status and future prospects. *FASEB J*, **19**, 311-30.
- Moller, W., Barth, W., Kohlhaufl, M., Haussinger, K., Stahlhofen, W. & Heyder, J. 2001. Human alveolar long-term clearance of ferromagnetic iron oxide microparticles in healthy and diseased subjects. *Exp Lung Res*, **27**, 547-68.
- Oberdorster, G., Maynard, A., Donaldson, K., Castranova, V., Fitzpatrick, J., Ausman, K., *et al.* 2005. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Part Fibre Toxicol*, **2**, 8.
- Park, E. J., Kim, H., Kim, Y., Yi, J., Choi, K. & Park, K. 2010. Inflammatory responses may be induced by a single intratracheal instillation of iron nanoparticles in mice. *Toxicology*, **275**, 65-71.
- Pasquale, E. B. 2008. Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. *Cell*, **133**, 38-52.
- Qian, D. & Weiss, A. 1997. T cell antigen receptor signal transduction. *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 205-12.
- Ragin, M. J., Hu, J., Henderson, A. J. & August, A. 2005. A role for the Tec family kinase ITK in regulating SEB-induced interleukin-2 production in vivo via c-jun phosphorylation. *BMC Immunol*, **6**, 19.
- Reicher, B. & Barda-Saad, M. 2010. Multiple pathways leading from the T-cell antigen receptor to the actin cytoskeleton network. *FEBS Lett*, **584**, 4858-64.
- Rishikeshi, S. N., Joshi, S. S., Temgire, M. K. & Bellare, J. R. 2013. Chain length dependence of polyol synthesis of zinc ferrite nanoparticles: why is diethylene glycol so different? *Dalton Trans*, **42**, 5406-14.
- Sahu, N., Mueller, C., Fischer, A. & August, A. 2008. Differential sensitivity to Itk kinase signals for T helper 2 cytokine production and chemokine-mediated migration. *J Immunol*, **180**, 3833-8.

- Saito, Y. D., Jensen, A. R., Salgia, R. & Posadas, E. M. 2010. Fyn: a novel molecular target in cancer. *Cancer*, **116**, 1629-37.
- Salem, Y., Shpungin, S., Pasder, O., Pomp, O., Taler, M., Malovani, H., *et al.* 2005. Fer kinase sustains the activation level of ERK1/2 and increases the production of VEGF in hypoxic cells. *Cell Signal*, **17**, 341-53.
- Sangrar, W., Gao, Y., Scott, M., Truesdell, P. & Greer, P. A. 2007. Fer-mediated cortactin phosphorylation is associated with efficient fibroblast migration and is dependent on reactive oxygen species generation during integrin-mediated cell adhesion. *Mol Cell Biol*, **27**, 6140-52.
- Sepelák, V., Steinikeb, U., Ueckerb, D.-C., Trettinc, R., Wißmannd, S. & Beckerd, K. D. 1997. High-temperature reactivity of mechanosynthesized zinc ferrite. *Solid State Ionics*, **101-103**, 1343-1349.
- Setoguchi, R., Hori, S., Takahashi, T. & Sakaguchi, S. 2005. Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J Exp Med*, **201**, 723-35.
- Sharfe, N., Freywald, A., Toro, A., Dadi, H. & Roifman, C. 2002. Ephrin stimulation modulates T cell chemotaxis. *Eur J Immunol*, **32**, 3745-55.
- Sharfe, N., Nikolic, M., Cimpeon, L., Van De Kratts, A., Freywald, A. & Roifman, C. M. 2008. EphA and ephrin-A proteins regulate integrin-mediated T lymphocyte interactions. *Mol Immunol*, **45**, 1208-20.
- Shen, C. C., Liang, H. J., Wang, C. C., Liao, M. H. & Jan, T. R. 2012. Iron oxide nanoparticles suppressed T helper 1 cell-mediated immunity in a murine model of delayed-type hypersensitivity. *Int J Nanomedicine*, **7**, 2729-37.
- Shen, C. C., Wang, C. C., Liao, M. H. & Jan, T. R. 2011. A single exposure to iron oxide nanoparticles attenuates antigen-specific antibody production and T-cell reactivity in ovalbumin-sensitized BALB/c mice. *Int J Nanomedicine*, **6**, 1229-35.
- Sievers, S., Braun, K. F., Eberbeck, D., Gustafsson, S., Olsson, E., Schumacher, H. W., *et al.* 2012. Quantitative Measurement of the Magnetic Moment of Individual Magnetic Nanoparticles by Magnetic Force Microscopy. *Small*.
- Smith-Garvin, J. E., Koretzky, G. A. & Jordan, M. S. 2009. T cell activation. *Annu Rev Immunol*, **27**, 591-619.
- Song, W., Zhang, J., Guo, J., Ding, F., Li, L. & Sun, Z. 2010. Role of the dissolved zinc ion and reactive oxygen species in cytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Toxicol Lett*, **199**, 389-97.
- Sun, C., Lee, J. S. & Zhang, M. 2008. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, **60**, 1252-65.
- Sydlik, U., Bierhals, K., Soufi, M., Abel, J., Schins, R. P. & Unfried, K. 2006. Ultrafine carbon particles induce apoptosis and proliferation in rat lung epithelial cells via specific signaling pathways both using EGF-R. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **291**, L725-33.
- Tomitaka, A., Hirukawa, A., Yamada, T., Morishita, S. & Takemura, Y. 2009. Biocompatibility of various ferrite nanoparticles evaluated by in vitro cytotoxicity assays using HeLa cells. *J Magnetism Magnet. Mater.*, **321**, 1482-1484.
- Unfried, K., Sydlik, U., Bierhals, K., Weissenberg, A. & Abel, J. 2008. Carbon nanoparticle-induced lung epithelial cell proliferation is mediated by receptor-dependent Akt activation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **294**, L358-67.
- Vang, T., Abrahamsen, H., Myklebust, S., Enserink, J., Prydz, H., Mustelin, T., *et al.* 2004. Knockdown of C-terminal Src kinase by siRNA-mediated RNA interference augments T cell receptor signaling in mature T cells. *Eur J Immunol*, **34**, 2191-9.
- Vang, T., Liu, W. H., Delacroix, L., Wu, S., Vasile, S., Dahl, R., *et al.* 2012. LYP inhibits T-cell activation when dissociated from CSK. *Nat Chem Biol*, **8**, 437-46.

- Wahajuddin & Arora, S. 2012. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: magnetic nanoplatforms as drug carriers. *Int J Nanomedicine*, **7**, 3445-71.
- Walker, E., Leemhuis, T. & Roeder, W. 1988. Murine B lymphoma cell lines release functionally active interleukin 2 after stimulation with *Staphylococcus aureus*. *J Immunol*, **140**, 859-65.
- Wang, J., Chen, Y., Chen, B., Ding, J., Xia, G., Gao, C., *et al.* 2010. Pharmacokinetic parameters and tissue distribution of magnetic Fe(3)O(4) nanoparticles in mice. *Int J Nanomedicine*, **5**, 861-6.
- Willard, M. A., Kurihara, L. K., Carpenter, E. E., Calvin, S. & Harris, V. G. 2004. Chemically prepared magnetic nanoparticles. *International Materials Reviews*, **49**, 125-170.
- Wong, S. & Witte, O. N. 2004. The BCR-ABL story: bench to bedside and back. *Annu Rev Immunol*, **22**, 247-306.
- Yamane, H. & Paul, W. E. 2012. Cytokines of the gamma(c) family control CD4+ T cell differentiation and function. *Nat Immunol*, **13**, 1037-44.
- Yim, E. K., Peng, G., Dai, H., Hu, R., Li, K., Lu, Y., *et al.* 2009. Rak functions as a tumor suppressor by regulating PTEN protein stability and function. *Cancer Cell*, **15**, 304-14.
- Yu, G., Mao, J., Wu, Y., Luo, H. & Wu, J. 2006. Ephrin-B1 is critical in T-cell development. *J Biol Chem*, **281**, 10222-9.
- Zhang, Y., Crittenden, J. C., Hand, D. W. & Perram, D. L. 1994. Fixed-bed photocatalysts for solar decontamination of water. *Environ Sci Technol*, **28**, 435-42.
- Zhou, X., Hua, L., Zhang, W., Zhu, M., Shi, Q., Li, F., *et al.* 2012. FRK controls migration and invasion of human glioma cells by regulating JNK/c-Jun signaling. *J Neurooncol*, **110**, 9-19.

Table 3.1 Characterization of ZnFe₂O₄ NPs

Nanoparticles	Description	Average size ^a	Hydrodynamic diameter ^b	Zeta (ζ) potential
ZnFe ₂ O ₄	Zinc iron oxide nanopowder	<100 nm	602 ± 191 nm	-10,0 ± 0,7 mV

^aAccording to the manufacturer, using BET (Brunauer-Emmett-Teller) analysis

^bUsing dynamic light scattering

Table 3.2 ZnFe₂O₄ NPs dependant alterations on tyrosine kinase phosphorylation. The phosphorylation level of 71 tyrosine kinase was quantified using Human Phosphorylation Array. The assay have been performed once with separate membranes, one for control cells, and one for cells treated for 24h to 50 µg/ml of ZnFe₂O₄ NPs. Fold change is the intensity ratio, as measure by densitometry (average of two dots for each kinase) , of cells treated with ZnFe₂O₄ on control cells.

Protein	Fold change (vs control)	Functions	References
ABL1	1,27	DNA repair, cytoskeleton organization, adhesion, proliferation, apoptosis, proto-oncogen	(Deininger et al., 2000; Wong & Witte, 2004; Hagemeijer & Graux, 2010)
Csk	1,28	Inhibitor of TCR signaling	(Vang et al., 2004)
EphA5	1,96	Adhesion, migration, chemotaxis, cytokine production, maturation, proliferation.	(Sharfe et al., 2002; Aasheim et al., 2005; Yu et al., 2006; Alfaro et al., 2007; Kitamura et al., 2008; Sharfe et al., 2008; Holen et al., 2010; Funk & Orr, 2012)
EphA6	2,19		
EphB3	1,49		
EphB4	7,83		
EphB6	1,44		
Fer	2,10	Support cell growth under abnormal conditions, proto-oncogen	(Carmel et al., 2000; Sangrar et al., 2007)
FRK	1,27	Tumor suppressor, growth inhibitory effects	(Yim et al., 2009; Zhou et al., 2012)
Fyn	3,60	Cytoskeleton reorganization, adhesion	(Reicher & Barda-Saad, 2010; Chapman et al., 2012)
Itk	1,26	Proliferation, cytokine production, actin reorganization	(Fowell et al., 1999; Ragin et al., 2005; Sahu et al., 2008; Smith-Garvin et al., 2009)
Jak1	1,42	Proliferation, differentiation, cytokine production, survival	(Leonard & O'Shea, 1998)
Jak2	1,44		
Jak3	1,15		
Lck	0,73	proliferation, cytokine production, adhesion, inhibit T _H 2 differentiation	(Smith-Garvin et al., 2009; Chapman et al., 2012)
ROS	0,52	Cell growth, survival, proto-oncogen	(Acquaviva et al., 2009)
Syk	0,97	Cell growth, proliferation, cytokine production	(Chu et al., 1998; Smith-Garvin et al., 2009)
Tyk2	1,46	Proliferation, differentiation, cytokine production, survival	(Leonard & O'Shea, 1998)
ZAP70	0,73	Cell growth, proliferation, cytokine production	(Chu et al., 1998; Smith-Garvin et al., 2009)

3.3.9 Figure Caption

Figure 3.1 Changes in ROS generation in WE17/10 cells treated with 5 to 100 $\mu\text{g/ml}$ of ZnFe_2O_4 NPs for (A) 24h or (B) 48h. Total ROS was evaluated by FACS analysis as described in methods section. Values (means \pm SEM) are from three independent experiments. * $p < 0,05$ for difference in ROS generation between Ctr and NPs treatment.

Figure 3.2 Effect of ZnFe_2O_4 NPs on WE17/10 cells proliferation. WE17/10 were incubated with 5 to 100 $\mu\text{g/ml}$ of NPs for 72h. IL-2-dependent proliferation was determined by measuring CFDA fluorescence by FACS analysis as described in methods section. Values (means \pm SEM) are from three independent experiments. * $p < 0,05$ for difference between Ctr and NPs treatment.

Figure 3.3 Expression of IL-2R α in WE17/10 cells. WE17/10 were incubated with 50 $\mu\text{g/ml}$ of ZnFe_2O_4 NPs for 24h, 48h or 72h. IL-2R α expression was analysed by flow cytometry using Alexa Fluor 488-conjugated anti-human IL-2R α as described in methods section. Values (means \pm SEM) are from three independent experiments.

Figure 3.4 Interference in ERK1/2 signal transduction by ZnFe_2O_4 NPs. WE17/10 cells were treated with 50 $\mu\text{g/ml}$ of ZnFe_2O_4 NPs for 6h, 24h and 48. Lysates were separated by SDS-PAGE and analysed for phospho-ERK1/2 by Western blotting as described in methods section. Anti-ERK1/2 was used as an internal control to monitor for equal loading. Normalized values of phosphorylation levels (means \pm SEM) represent four independent experiments.

Figure 3.5 Interference in STAT5 signal transduction by ZnFe_2O_4 NPs. WE17/10 cells were treated with 50 $\mu\text{g/ml}$ of ZnFe_2O_4 NPs for 6h, 24h and 48. Lysates were separated by SDS-PAGE and analysed for phospho-STAT5 by Western blotting as described in methods section. Anti-STAT5 was used as an internal control to monitor for equal loading. Normalized values of phosphorylation levels (means \pm SEM) represent three to five independent experiments. * $p < 0,05$ for difference between Ctr and NPs treatment.

Figure 3.1 Changes in ROS generation in WE17/10 cells treated with ZnFe₂O₄ NPs

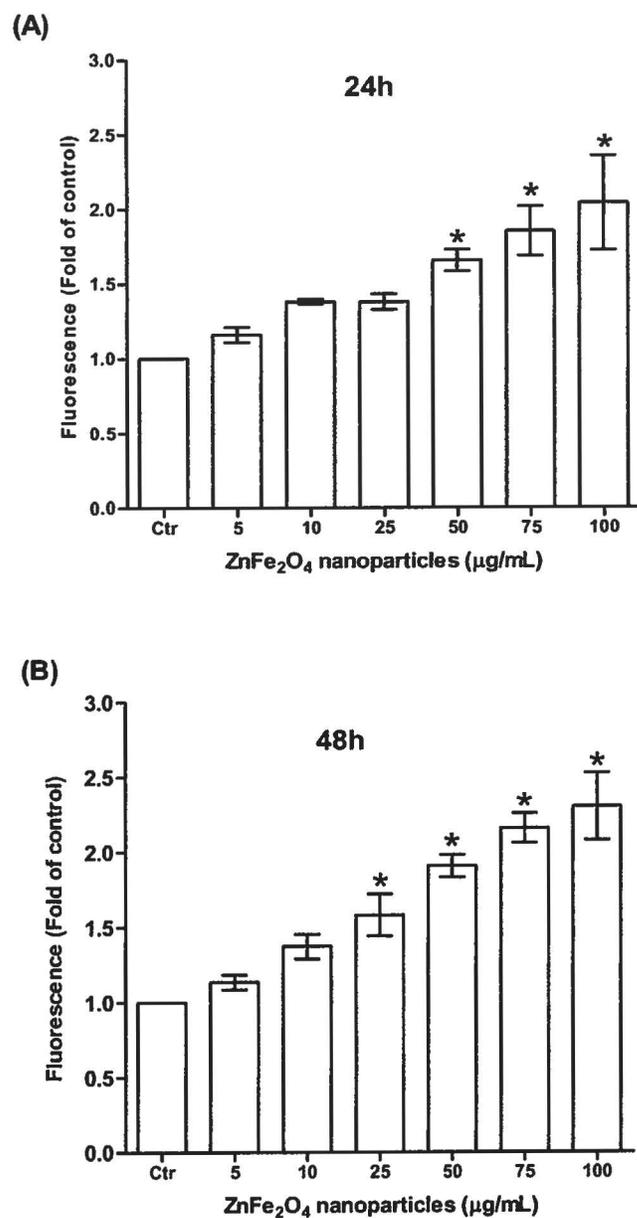


Figure 3.2 Effect of ZnFe₂O₄ NPs on WE17/10 cells proliferation

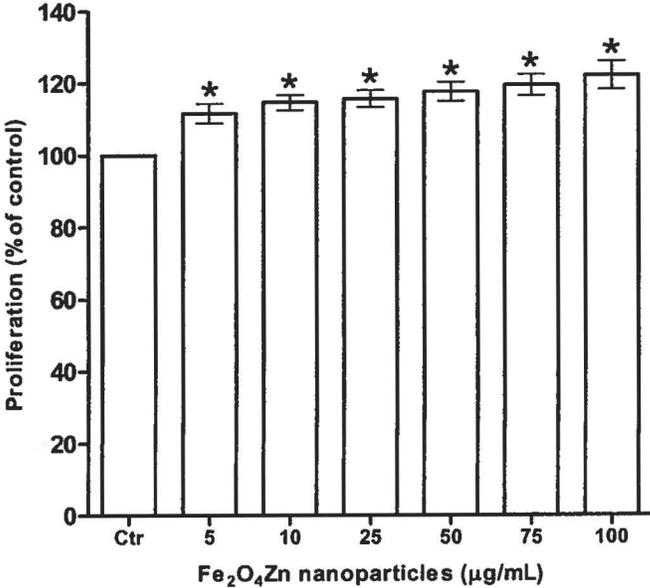


Figure 3.3 Expression of IL-2Ra in WE17/10 cells following ZnFe₂O₄ NPs treatment

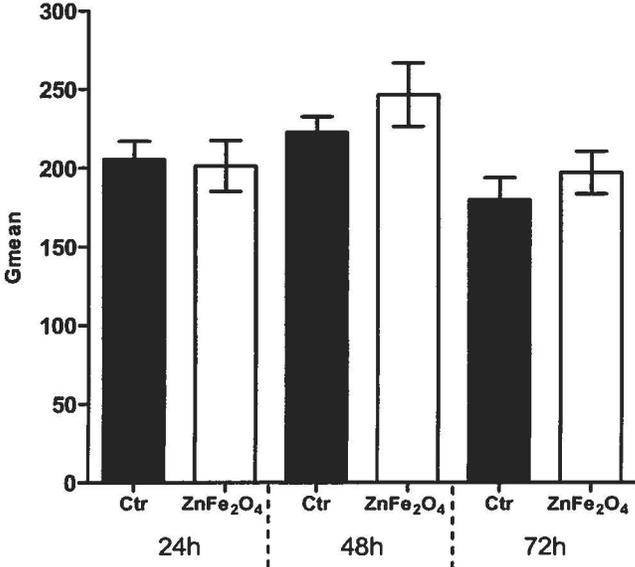


Figure 3.4 Interference in ERK1/2 signal transduction by ZnFe₂O₄ NPs

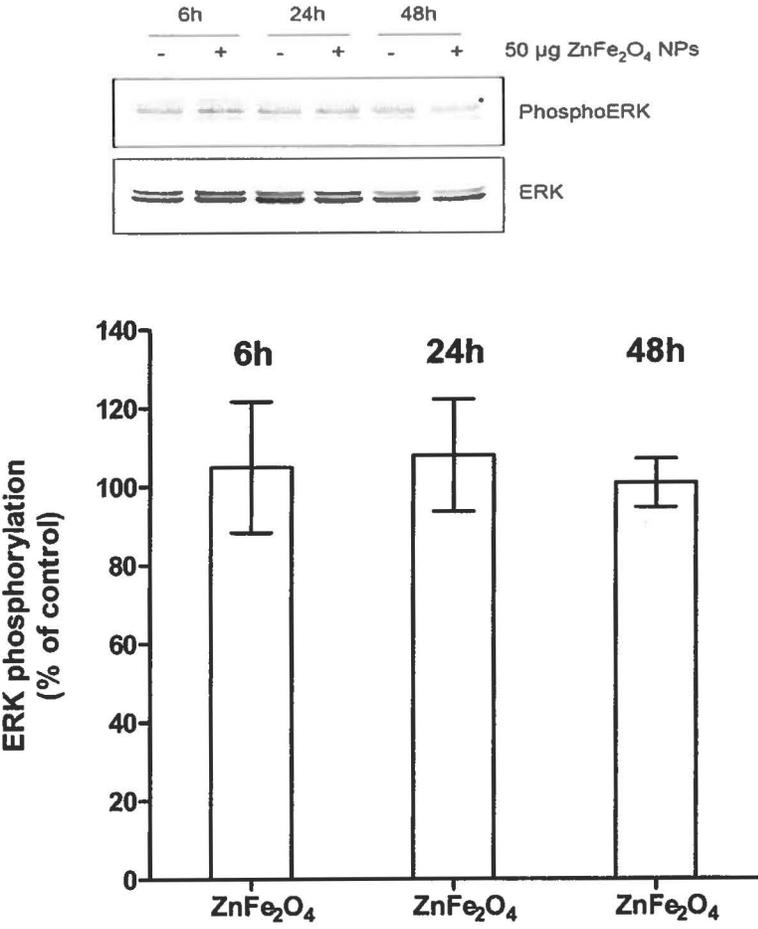
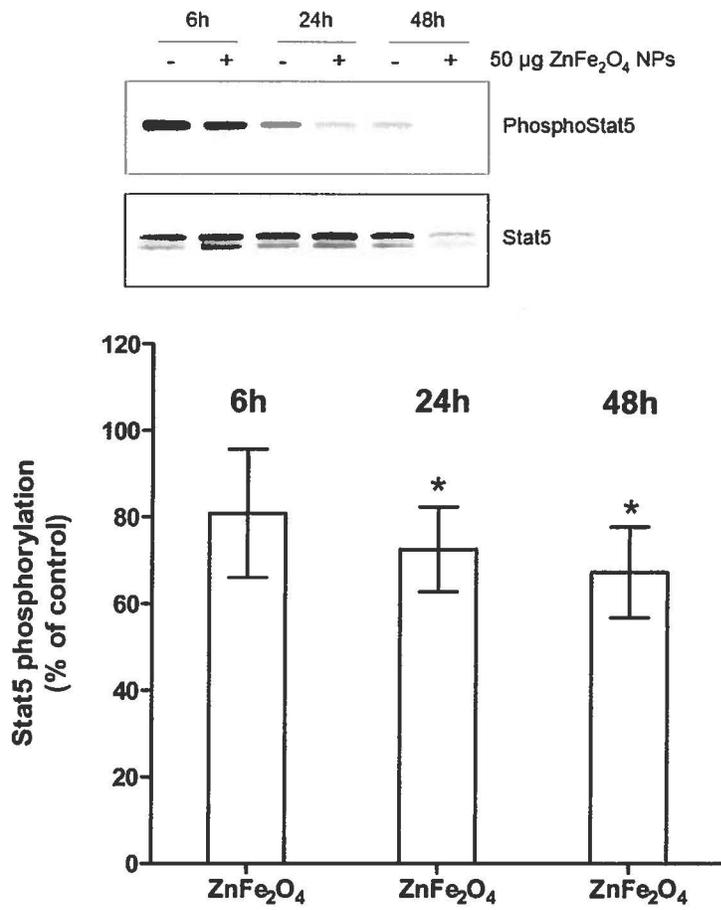


Figure 3.5 Interference in STAT5 signal transduction by ZnFe₂O₄ NPs



Chapitre 4 : Discussion générale et Conclusion

L'objectif central du projet était d'évaluer si trois types de NPs, soit les NPs d'Ag, C₆₀ et ZnFe₂O₄, interfèrent dans la réponse des lymphocytes T CD4 à l'IL-2. Ces trois NPs possèdent des propriétés très diverses. Les NPs d'Ag sont reconnues pour leur propriété antibactérienne, les NPs de C₆₀ pour leur capacité antioxydante et les NPs de ZnFe₂O₄ pour leur superparamagnétisme et leur biocompatibilité. Un système *in vitro* fut employé pour les expériences, soit la lignée WE17/10, une lignée de cellules T CD4 lymphoblastoïde IL-2-dépendante. Cela permet d'évaluer de façon plus spécifique l'effet des NPs, notamment au niveau des voies de signalisation.

La caractérisation des NPs à l'aide de la technique de diffusion de lumière dynamique (DLS) a permis de constater un écart important dans la tendance à l'agrégation en fonction du type de NP. Les NPs d'Ag se dispersaient davantage, probablement à cause du fait que le stock de NPs sous la forme de poudre contenait de la polyvinylpyrrolidone, alors que les NPs de C₆₀ et ZnFe₂O₄ formaient de très gros agrégats. Cela se traduisait par une entrée plus grande des NPs d'Ag à l'intérieur des cellules, tel que mesuré par cytométrie en flux en évaluant le changement de la granularité cellulaire en fonction de la concentration en NPs dans le milieu de culture. Une étude par Lankoff et al. a utilisé cette technique pour évaluer l'effet du niveau d'agrégation sur l'entrée des NPs à l'aide de trois types cellulaires différents (Lankoff et al., 2012). Pour ce faire, ils ont utilisés des NPs de TiO₂ et d'Ag. Ils ont observé que l'effet du niveau d'agrégation variait selon le type cellulaire exposé. Cela peut s'expliquer par le fait que les NPs entrent dans les cellules par différents mécanismes, comme par pinocytose, endocytose dépendante de la clathrine ou de la cavéoline, phagocytose ou encore par diffusion (Kunzmann et al., 2011). Le processus d'entrée des NPs à l'intérieur des cellules n'est donc pas en relation avec la taille des particules, mais plutôt une relation complexe entre les propriétés des particules et des cellules exposées.

La cytotoxicité des NPs fut évaluée pour des concentrations allant jusqu'à 100 µg/ml. Aucune diminution de la viabilité ne fut mesurée à la suite d'une exposition aux NPs de C₆₀ et ZnFe₂O₄, alors que les NPs d'Ag étaient significativement cytotoxiques à 100 µg/ml et diminuaient légèrement la viabilité cellulaire à partir de 50 µg/ml. Ces résultats concordent avec plusieurs études qui montrent que les NPs d'Ag possèdent une toxicité beaucoup plus grande que les autres types de NPs (Hussain et al., 2005; Soto et al., 2005). Une étude a évalué la toxicité des NPs de ZnFe₂O₄, mais sur les cellules HeLa

(Tomitaka et al., 2009). Contrairement à notre étude, une réduction importante de la viabilité cellulaire fut mesurée, mais à une concentration extrême de 500 µg/ml. Une concentration aussi élevée ne correspond aucunement à un niveau d'exposition réaliste pouvant résulter de l'utilisation des NPs en nanomédecine par exemple. Pour notre étude, en testant d'abord les effets sur la viabilité cellulaire, les concentrations de NPs utilisées pour la suite du projet étaient bien en deçà de plusieurs autres études en nanotoxicologie. Cela avait pour but de plutôt chercher à établir le mécanisme d'action des NPs, et à tester un niveau d'exposition se rapprochant davantage de l'utilisation potentiellement faite des NPs.

L'effet des NPs sur la prolifération des cellules WE17/10 fut déterminé à des concentrations n'affectant pas la viabilité cellulaire. Les NPs d'Ag inhibent fortement la prolifération, et ce, même à de faibles concentrations. À l'inverse, les NPs de C₆₀ et ZnFe₂O₄ augmentent légèrement, mais significativement, la prolifération, avec un effet plus important dans le cas des NPs de ZnFe₂O₄. D'autres études avaient évalué l'effet de la présence de NPs d'Ag sur la réponse proliférative de lymphocytes T CD4 de culture primaire, mais en réponse à des mitogènes. La prolifération était inhibée par les NPs d'Ag à la suite d'une stimulation à la PHA, alors qu'aucun effet n'a été mesuré à la suite d'une stimulation à la ConA (Shin et al., 2007; Greulich et al., 2011). L'action des NPs d'Ag semble donc dépendre de l'agent utilisé pour stimuler la prolifération.

L'expression de la chaîne α de l'IL-2R fut mesurée à la suite de l'exposition aux trois types de NPs pour établir si cela peut engendrer des changements phénotypiques. Son expression est notamment régulée par les voies de signalisation déclenchées par le récepteur à la suite de la liaison de l'IL-2. La présence des NPs de C₆₀ et ZnFe₂O₄ n'avaient aucun effet sur l'expression de la chaîne α aux temps d'incubation testés. Les NPs d'Ag ont un effet en augmentant le niveau d'expression. Il s'agit d'un résultat nouveau, puisqu'aucune étude publiée à ce jour n'avait cherché à établir si les NPs pouvaient modifier l'expression de la chaîne α de l'IL-2R. Une étude effectuée chez les cellules dendritiques a évalué si l'exposition aux NPs modifiait l'expression de certains récepteurs de l'activation. Mou et al. ont mesuré une augmentation de l'expression des molécules de costimulation CD80, CD86 et CMHII à la suite de l'exposition de cellules dendritiques à des NPs de Fe₃O₄ (Mou et al., 2011). L'effet des NPs sur l'expression des molécules de costimulation est probablement variable en fonction du type cellulaire exposé.

La suite du projet a consisté à déterminer les voies de signalisation via lesquelles les NPs interfèrent pour influencer la prolifération cellulaire. Les voies qui furent ciblées étaient celles jouant

un rôle important dans la signalisation de l'IL-2R. Cela permet de déterminer si les NPs agissent en influençant la réponse à l'IL-2, ou ont une influence sur des voies indépendantes. Le niveau d'activation de la MAPK ERK1/2 et du facteur de transcription Stat5 furent déterminés à la suite de l'exposition à chacune des trois NPs. Aucun effet ne fut mesuré sur les niveaux de phosphorylation de ERK1/2 à la suite de l'exposition aux NPs de C₆₀ et ZnFe₂O₄. Les NPs d'Ag augmentaient l'activation de ERK1/2 seulement au temps le plus court d'exposition, soit après 6h. Cet effet pourrait résulter d'une augmentation des niveaux de ROS plus importante à la suite d'une exposition aux NPs d'Ag. Les niveaux de ROS furent mesurés par cytométrie en flux à la suite de l'exposition aux NPs de ZnFe₂O₄, et l'augmentation était significative. Par contre, les NPs d'Ag inhibaient la fluorescence émise par la sonde réagissant avec les ROS, ce qui a empêché la lecture. L'exposition aux NPs d'Ag n'avait aucun effet sur la phosphorylation du facteur de transcription Stat5. Cela est en contradiction avec l'augmentation de l'expression de la chaîne α de l'IL-2R, dont la régulation se ferait via Stat5 (Malek, 2008), qui fut mesurée en présence des NPs d'Ag. L'expression de la chaîne α pourrait être influencée par une autre protéine de régulation, ou résulter d'une internalisation moins importante de l'IL-2R en présence des NPs d'Ag. L'exposition aux NPs de C₆₀ ne modifiait pas les niveaux de phosphorylation de Stat5, sauf après 48h d'incubation. Cette diminution de l'activation de Stat5 est associée à l'augmentation de la prolifération en présence des NPs de C₆₀, ce qui accentue la consommation d'IL-2 et réduit sa disponibilité à long terme. Le même effet s'observe à la suite de l'exposition aux NPs de ZnFe₂O₄. Par contre la diminution de la phosphorylation est significative dès une exposition de 24h, ce qui indique que les NPs de ZnFe₂O₄ réduisent l'activation de Stat5 sans que cela résulte d'une diminution de la quantité d'IL-2 disponible. L'augmentation de la prolifération mesurée à la suite d'une exposition aux NPs de ZnFe₂O₄ semble donc indépendante des voies de signalisation déclenchées par l'IL-2R.

Une étude plus approfondie fut effectuée à l'aide de réseaux d'anticorps pour cibler plus largement plusieurs tyrosine kinases dans le but d'identifier des cibles potentiellement influencées par la présence des NPs de ZnFe₂O₄. Le niveau de phosphorylation de plusieurs protéines était modifié. Parmi celles-ci, les kinases ABL1 et Fer sont activées à la suite de l'exposition aux NPs de ZnFe₂O₄. Ce sont deux protéines pouvant être activées par un stress cellulaire et augmenter la prolifération. Cela pourrait expliquer l'augmentation de la prolifération mesurée en présence des NPs de ZnFe₂O₄, indiquant un effet indépendant de l'IL-2R. Les tyrosine kinases Lck et ZAP-70, des protéines clés dans l'activation des cellules T CD4, ont inversement un niveau de phosphorylation moins élevé. Cet effet des NPs de ZnFe₂O₄ pourrait engendrer des dysfonctionnements autres chez les lymphocytes T, notamment au niveau de la production de cytokines. Par contre, d'autres kinases jouant un rôle dans

plusieurs processus de signalisation importants pour les fonctions des cellules T CD4 sont davantage activées. C'est le cas des différentes JAK (JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2) et de Fyn. Ces protéines pourraient compenser l'inhibition de Lck et ZAP-70. Mesurer la production de cytokines *in vitro* en présence des NPs de ZnFe₂O₄ pourrait permettre de déterminer plus précisément si ces NPs interfèrent dans les fonctions des cellules T CD4 via l'activation ou l'inhibition des kinases identifiées.

Kim et al. (2011) avaient émis l'hypothèse que l'augmentation de la croissance nerveuse qu'ils mesuraient en traitant des cellules PC12 au NGF en présence de NPs de Fe₃O₄ résultait d'une libération d'ions de fer par les NPs (Kim et al., 2011). En effet, les NPs peuvent générer graduellement et continuellement des ions dans un milieu aqueux. Les NPs de ZnFe₂O₄ pourraient donc libérer des ions de Zn²⁺ dans le milieu de culture durant leur incubation. Le zinc aurait un rôle important à jouer dans la médiation des signaux chez les cellules T (Csermely & Somogyi, 1989). Kaltenberg et al. ont évalué l'impact de la présence d'ions Zn²⁺ sur la réponse proliférative à l'IL-2 à l'aide de la lignée CTLL-2, une lignée murine de cellules T cytotoxiques (Kaltenberg et al., 2010). Ils ont mesuré une diminution de la prolifération cellulaire lorsqu'ils traitaient les cellules avec un agent chélateur des ions Zn²⁺. L'ajout d'ions Zn²⁺ permettaient d'accentuer la réponse à l'IL-2, telle que mesurée par une augmentation du niveau de phosphorylation de ERK1/2 en présence des ions Zn²⁺. L'absence d'un effet sur la phosphorylation de ERK1/2 à la suite de l'exposition aux NPs de ZnFe₂O₄ indique que l'augmentation de la prolifération mesurée ne semble pas résulter d'une libération d'ions Zn²⁺.

Plusieurs autres aspects doivent encore être analysés pour déterminer si ces trois types NPs interagissent avec la réponse à l'IL-2. Comfort et al. ont évalué l'effet de NPs d'Ag, Au et Fe₃O₄ sur la réponse au facteur de croissance épidermique (EGF) chez des cellules épidermiques. Ils ont établi que les trois types entravent la réponse à l'EGF, mais en agissant différemment. Les NPs d'Ag réduisent la signalisation via Akt et ERK1/2, les NPs d'Au diminuent les niveaux de phosphorylation de Akt et ERK1/2, et les NPs de Fe₃O₄ altèrent la transcription des gènes dépendants de l'EGF. Dans notre étude, aucune voie impliquée dans la signalisation de l'IL-2R n'a clairement été identifiée comme étant fortement affectée par les NPs. Les NPs d'Ag augmentent la phosphorylation de ERK1/2, mais seulement de façon transitoire. Les NPs de ZnFe₂O₄ réduisent l'activation de Stat5, mais cela est en opposition à l'augmentation de la prolifération mesurée. D'autres voies de signalisation pourraient être ciblées, notamment la voie Akt/PKB, et l'expression de gènes clés pourrait être analysée. Cela permettrait de confirmer si ces NPs interfèrent dans la réponse à l'IL-2, ce qui ne peut être fait à partir des résultats obtenus au cours du projet.

Les trois types de NPs étudiés au cours de ce projet présentent une structure chimique différente. De façon générale, l'effet toxique résultant d'une exposition aux NPs peut être attribuable à différentes caractéristiques. La taille, l'aire de surface, la cristallinité, la réactivité de surface, la solubilité, la forme et le niveau d'agrégation ont tous un rôle plus ou moins prépondérant à jouer dans l'effet qui sera observé (Nel et al., 2006). Les NPs de ZnFe_2O_4 , de par la présence de Fe dans leur composition, peuvent libérer des ions de Fe (Fe^{2+}) qui peuvent participer à la réaction de Fenton, qui implique la production d'un radical hydroxyle ($\bullet\text{OH}$) hautement toxique (Foy & Labhasetwar, 2011). La libération d'ions Zn^{2+} pourrait aussi se produire, ce qui pourrait expliquer l'augmentation de la prolifération en présence des NPs de ZnFe_2O_4 , dû à l'important rôle joué par les ions Zn^{2+} dans la réponse à l'IL-2. Les NPs de C_{60} présentent des propriétés de donneur ou d'accepteur d'électrons uniques, mais il reste à déterminer si elles ont un effet pro- ou anti-oxydant sur les systèmes biologiques (Park et al., 2010a). Une augmentation des ROS est mesurée suite à l'exposition aux NPs de C_{60} dans le système *in vitro* du projet, ce qui peut être attribuable à un fort niveau d'agrégation. Il serait intéressant de mesurer l'effet des NPs de fullerène sur la production de ROS et la prolifération dans les mêmes conditions, pour établir si un effet antioxydant serait mesuré, et la conséquence que cela aurait sur la prolifération. Les NPs de Ag possèdent, quant à elles, une surface qui facilite l'adsorption des protéines (Asharani et al., 2012). Une étude, effectuée à l'aide de fibroblastes pulmonaires humains, a montré que les NPs d'Ag au niveau intracellulaire peuvent lier des protéines cytosoliques, limitant ainsi la possibilité d'action de ces protéines (Asharani et al., 2012). Il serait important d'évaluer si les NPs d'Ag peuvent lier l'IL-2 dans le milieu extracellulaire, ce qui limiterait sa disponibilité et expliquerait la diminution de la prolifération mesurée. Cela pourrait se faire en incubant les NPs d'Ag dans du milieu de culture sans sérum en présence d'IL-2. Après incubation, le milieu serait centrifugé pour retirer les NPs, et le surnageant analysé à l'aide d'un kit ELISA contre l'IL-2 (Comfort et al., 2011b). La suspension de NPs d'Ag utilisée contenait aussi du PVP pour augmenter la stabilité des NPs dispersées. Il serait intéressant d'évaluer l'impact des NPs d'Ag seules, sans PVP, pour apprécier l'importance jouée par l'agent dispersant dans les effets mesurés. En favorisant la dispersion des NPs, le PVP permet d'augmenter l'aire de surface pour une même masse, donc la réactivité des NPs. Plusieurs aspects pouvant potentiellement jouer un rôle important dans les effets toxiques de ces trois types de NPs n'ont pas été évalués. Ainsi, en perspective, il serait essentiel pour la poursuite du projet d'effectuer une caractérisation plus précise. Cela permettrait d'établir la relation entre la structure des NPs et leur toxicité. L'analyse des NPs par microscopie électronique à balayage de champ (FESEM) permettrait de déterminer la morphologie des NPs, de même que la distribution de la taille des particules et leur aire de surface.

L'ensemble des expériences de ce projet étaient effectuées *in vitro* avec la lignée WE17/10. Il serait intéressant d'évaluer l'effet de ces NPs sur la réponse à l'IL-2 à l'aide de cultures primaires de lymphocytes T CD4 isolés du sang de donneurs sains. Toutefois, il est difficile d'extrapoler les résultats obtenus *in vitro* vers la situation *in vivo*. Les concentrations utilisées lors des expériences étaient relativement élevées, mais un effet significatif est mesuré sur la prolifération cellulaire à la plus faible concentration de 5 µg/ml dans le cas des NPs d'Ag et de ZnFe₂O₄. L'exposition humaine aux NPs est très variable, et dépend surtout du type d'utilisation. De façon générale, une exposition via les voies respiratoires ou gastro-intestinales devrait mener à peu d'absorption due à la tendance des NMs à s'agglomérer. Les expositions pouvant générer des concentrations plus importantes dans la circulation périphérique résultent principalement d'une utilisation dans le domaine de la nanomédecine. Les NPs d'Ag seraient donc le type de NP parmi les trois qui présente un risque potentiel pour la santé humaine.

En conclusion, le projet a permis d'établir que les NPs ont des effets différents en fonction de leur composition. Les NPs d'Ag présentent une cytotoxicité plus grande, alors que les NPs de C₆₀ et ZnFe₂O₄ ont une bonne biocompatibilité. Les mesures de prolifération cellulaire de la lignée IL-2-dépendante WE17/10 ont montré que les trois types de NPs interfèrent dans le processus de prolifération. Les NPs d'Ag ont un fort effet inhibiteur, alors que les NPs de C₆₀ et ZnFe₂O₄ ont un léger effet activateur. L'analyse des voies de signalisation n'a pas montré une interférence claire au niveau des protéines kinases impliquées dans la signalisation de l'IL-2R. Ce faisant, à partir des résultats obtenus au cours du projet, il n'est pas possible de conclure définitivement si l'une ou l'autre des NPs étudiées interfère ou non dans la réponse des lymphocytes T CD4 à l'IL-2. L'analyse par réseaux d'anticorps a par contre permis d'identifier de nouvelles cibles potentielles via lesquelles certains types de NPs pourraient agir pour modifier le métabolisme des cellules.

Références

- Aasheim, H. C., Delabie, J. et Finne, E. F. (2005). "Ephrin-A1 binding to CD4+ T lymphocytes stimulates migration and induces tyrosine phosphorylation of PYK2." Blood **105**(7): 2869-2876.
- Acquaviva, J., Wong, R. et Charest, A. (2009). "The multifaceted roles of the receptor tyrosine kinase ROS in development and cancer." Biochim Biophys Acta **1795**(1): 37-52.
- Akbar, A. N., Borthwick, N. J., Wickremasinghe, R. G., Panayoitidis, P., Pilling, D., Bofill, M., Krajewski, S., *et al.* (1996). "Interleukin-2 receptor common gamma-chain signaling cytokines regulate activated T cell apoptosis in response to growth factor withdrawal: selective induction of anti-apoptotic (bcl-2, bcl-xL) but not pro-apoptotic (bax, bcl-xS) gene expression." Eur J Immunol **26**(2): 294-299.
- Akbarzadeh, A., Samiei, M. et Davaran, S. (2012). "Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine." Nanoscale Res Lett **7**(1): 144.
- Alfaro, D., Garcia-Ceca, J. J., Cejalvo, T., Jimenez, E., Jenkinson, E. J., Anderson, G., Munoz, J. J., *et al.* (2007). "EphrinB1-EphB signaling regulates thymocyte-epithelium interactions involved in functional T cell development." Eur J Immunol **37**(9): 2596-2605.
- Algood, H. M., Lin, P. L. et Flynn, J. L. (2005). "Tumor necrosis factor and chemokine interactions in the formation and maintenance of granulomas in tuberculosis." Clin Infect Dis **41** **Suppl 3**: S189-193.
- Aoki, C. A., Roifman, C. M., Lian, Z. X., Bowlus, C. L., Norman, G. L., Shoenfeld, Y., Mackay, I. R., *et al.* (2006). "IL-2 receptor alpha deficiency and features of primary biliary cirrhosis." J Autoimmun **27**(1): 50-53.
- Arora, S., Jain, J., Rajwade, J. M. et Paknikar, K. M. (2008). "Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies." Toxicol Lett **179**(2): 93-100.
- Arora, S., Jain, J., Rajwade, J. M. et Paknikar, K. M. (2009). "Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells." Toxicol Appl Pharmacol **236**(3): 310-318.
- Arora, S., Rajwade, J. M. et Paknikar, K. M. (2012). "Nanotoxicology and in vitro studies: the need of the hour." Toxicol Appl Pharmacol **258**(2): 151-165.
- Aschberger, K., Johnston, H. J., Stone, V., Aitken, R. J., Tran, C. L., Hankin, S. M., Peters, S. A., *et al.* (2010). "Review of fullerene toxicity and exposure--appraisal of a human health risk assessment, based on open literature." Regul Toxicol Pharmacol **58**(3): 455-473.
- Asharani, P., Sethu, S., Lim, H. K., Balaji, G., Valiyaveetil, S. et Hande, M. P. (2012). "Differential regulation of intracellular factors mediating cell cycle, DNA repair and inflammation following exposure to silver nanoparticles in human cells." Genome Integr **3**(1): 2.
- AshaRani, P. V., Low Kah Mun, G., Hande, M. P. et Valiyaveetil, S. (2009). "Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells." ACS Nano **3**(2): 279-290.
- Asharani, P. V., Xinyi, N., Hande, M. P. et Valiyaveetil, S. (2010). "DNA damage and p53-mediated growth arrest in human cells treated with platinum nanoparticles." Nanomedicine (Lond) **5**(1): 51-64.
- Aslan, M. et Ozben, T. (2003). "Oxidants in receptor tyrosine kinase signal transduction pathways." Antioxid Redox Signal **5**(6): 781-788.
- Baek, M., Chung, H. E., Yu, J., Lee, J. A., Kim, T. H., Oh, J. M., Lee, W. J., *et al.* (2012). "Pharmacokinetics, tissue distribution, and excretion of zinc oxide nanoparticles." Int J Nanomedicine **7**: 3081-3097.

- Baker, G. L., Gupta, A., Clark, M. L., Valenzuela, B. R., Staska, L. M., Harbo, S. J., Pierce, J. T., *et al.* (2008). "Inhalation toxicity and lung toxicokinetics of C60 fullerene nanoparticles and microparticles." Toxicol Sci **101**(1): 122-131.
- Ban, M., Langonne, I., Huguet, N. et Goutet, M. (2012). "Effect of submicron and nano-iron oxide particles on pulmonary immunity in mice." Toxicol Lett **210**(3): 267-275.
- Barbosa-Barros, L., Barba, C., Rodriguez, G., Cocera, M., Coderch, L., Lopez-Iglesias, C., de la Maza, A., *et al.* (2009). "Lipid nanostructures: self-assembly and effect on skin properties." Mol Pharm **6**(4): 1237-1245.
- Batista, F. D. et Harwood, N. E. (2009). "The who, how and where of antigen presentation to B cells." Nat Rev Immunol **9**(1): 15-27.
- Beji, Z., Hanini, A., Smiri, L. S., Gavard, J., Kacem, K., Villain, F., Grenèche, J.-M., *et al.* (2010). "Magnetic properties of Zn-substituted MnFe₂O₄ nanoparticles synthesized in polyol as potential heating agents for hyperthermia. Evaluation of their toxicity on endothelial cells." Chem. Mater. **22**(19): 5420-5429.
- Bennat, C. et Muller-Goymann, C. C. (2000). "Skin penetration and stabilization of formulations containing microfine titanium dioxide as physical UV filter." Int J Cosmet Sci **22**(4): 271-283.
- BeruBe, K., Balharry, D., Sexton, K., Koshy, L. et Jones, T. (2007). "Combustion-derived nanoparticles: mechanisms of pulmonary toxicity." Clin Exp Pharmacol Physiol **34**(10): 1044-1050.
- Bhol, K. C., Alroy, J. et Schechter, P. J. (2004). "Anti-inflammatory effect of topical nanocrystalline silver cream on allergic contact dermatitis in a guinea pig model." Clin Exp Dermatol **29**(3): 282-287.
- Bhol, K. C. et Schechter, P. J. (2005). "Topical nanocrystalline silver cream suppresses inflammatory cytokines and induces apoptosis of inflammatory cells in a murine model of allergic contact dermatitis." Br J Dermatol **152**(6): 1235-1242.
- Bihari, P., Vippola, M., Schultes, S., Praetner, M., Khandoga, A. G., Reichel, C. A., Coester, C., *et al.* (2008). "Optimized dispersion of nanoparticles for biological in vitro and in vivo studies." Part Fibre Toxicol **5**: 14.
- Boonstra, J. et Post, J. A. (2004). "Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells." Gene **337**: 1-13.
- Boyman, O. et Sprent, J. (2012). "The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system." Nat Rev Immunol **12**(3): 180-190.
- Brennan, P., Babbage, J. W., Burgering, B. M., Groner, B., Reif, K. et Cantrell, D. A. (1997). "Phosphatidylinositol 3-kinase couples the interleukin-2 receptor to the cell cycle regulator E2F." Immunity **7**(5): 679-689.
- Brunner, T., Mogil, R. J., LaFace, D., Yoo, N. J., Mahboubi, A., Echeverri, F., Martin, S. J., *et al.* (1995). "Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas." Nature **373**(6513): 441-444.
- Busse, D., de la Rosa, M., Hobiger, K., Thurley, K., Flossdorf, M., Scheffold, A. et Hofer, T. (2010). "Competing feedback loops shape IL-2 signaling between helper and regulatory T lymphocytes in cellular microenvironments." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(7): 3058-3063.
- Carlson, C., Hussain, S. M., Schrand, A. M., Braydich-Stolle, L. K., Hess, K. L., Jones, R. L. et Schlager, J. J. (2008). "Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species." J Phys Chem B **112**(43): 13608-13619.
- Carmel, M., Shpungin, S. et Nir, U. (2000). "Role of positive and negative regulation in modulation of the Fer promoter activity." Gene **241**(1): 87-99.
- Caudy, A. A., Reddy, S. T., Chatila, T., Atkinson, J. P. et Verbsky, J. W. (2007). "CD25 deficiency causes an immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked-like syndrome,

- and defective IL-10 expression from CD4 lymphocytes." J Allergy Clin Immunol **119**(2): 482-487.
- Cha, K., Hong, H. W., Choi, Y. G., Lee, M. J., Park, J. H., Chae, H. K., Ryu, G., *et al.* (2008). "Comparison of acute responses of mice livers to short-term exposure to nano-sized or micro-sized silver particles." Biotechnol Lett **30**(11): 1893-1899.
- Chapman, N. M., Yoder, A. N. et Houtman, J. C. (2012). "Non-catalytic functions of pyk2 and fyn regulate late stage adhesion in human T cells." PLoS One **7**(12): e53011.
- Chatila, T. A., Li, N., Garcia-Lloret, M., Kim, H. J. et Nel, A. E. (2008). "T-cell effector pathways in allergic diseases: transcriptional mechanisms and therapeutic targets." J Allergy Clin Immunol **121**(4): 812-823; quiz 824-815.
- Chen, B. A., Jin, N., Wang, J., Ding, J., Gao, C., Cheng, J., Xia, G., *et al.* (2010). "The effect of magnetic nanoparticles of Fe(3)O(4) on immune function in normal ICR mice." Int J Nanomedicine **5**: 593-599.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K. J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., *et al.* (2003). "Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3." J Exp Med **198**(12): 1875-1886.
- Chen, X. et Schluesener, H. J. (2008). "Nanosilver: a nanoparticle in medical application." Toxicol Lett **176**(1): 1-12.
- Choi, O. K. et Hu, Z. Q. (2009). "Nitrification inhibition by silver nanoparticles." Water Sci Technol **59**(9): 1699-1702.
- Christensen, F. M., Johnston, H. J., Stone, V., Aitken, R. J., Hankin, S., Peters, S. et Aschberger, K. (2011). "Nano-TiO(2) - feasibility and challenges for human health risk assessment based on open literature." Nanotoxicology **5**: 110-124.
- Chu, D. H., Morita, C. T. et Weiss, A. (1998). "The Syk family of protein tyrosine kinases in T-cell activation and development." Immunol Rev **165**: 167-180.
- Chung, I. S., Lee, M. Y., Shin, D. H. et Jung, H. R. (2010). "Three systemic argyria cases after ingestion of colloidal silver solution." Int J Dermatol **49**(10): 1175-1177.
- Clift, M. J., Gehr, P. et Rothen-Rutishauser, B. (2010). "Nanotoxicology: a perspective and discussion of whether or not in vitro testing is a valid alternative." Arch Toxicol.
- Comfort, K. K., Maurer, E. I., Braydich-Stolle, L. K. et Hussain, S. M. (2011a). "Interference of Silver, Gold, and Iron Oxide Nanoparticles on Epidermal Growth Factor Signal Transduction in Epithelial Cells." ACS Nano.
- Comfort, K. K., Maurer, E. I., Braydich-Stolle, L. K. et Hussain, S. M. (2011b). "Interference of silver, gold, and iron oxide nanoparticles on epidermal growth factor signal transduction in epithelial cells." ACS Nano **5**(12): 10000-10008.
- Costa, C. S., Ronconi, J. V., Daufenbach, J. F., Goncalves, C. L., Rezin, G. T., Streck, E. L. et Paula, M. M. (2010). "In vitro effects of silver nanoparticles on the mitochondrial respiratory chain." Mol Cell Biochem **342**(1-2): 51-56.
- Cote-Sierra, J., Foucras, G., Guo, L., Chiodetti, L., Young, H. A., Hu-Li, J., Zhu, J., *et al.* (2004). "Interleukin 2 plays a central role in Th2 differentiation." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(11): 3880-3885.
- Csermely, P. et Somogyi, J. (1989). "Zinc as a possible mediator of signal transduction in T lymphocytes." Acta Physiol Hung **74**(2): 195-199.
- Cumberland, S. A. et Lead, J. R. (2009). "Particle size distributions of silver nanoparticles at environmentally relevant conditions." J Chromatogr A **1216**(52): 9099-9105.
- Dardalhon, V., Awasthi, A., Kwon, H., Galileos, G., Gao, W., Sobel, R. A., Mitsdoerffer, M., *et al.* (2008). "IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells." Nat Immunol **9**(12): 1347-1355.

- De Jong, W. H., Hagens, W. I., Krystek, P., Burger, M. C., Sips, A. J. et Geertsma, R. E. (2008). "Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration." Biomaterials **29**(12): 1912-1919.
- Deininger, M. W., Goldman, J. M. et Melo, J. V. (2000). "The molecular biology of chronic myeloid leukemia." Blood **96**(10): 3343-3356.
- Desai, P., Patlolla, R. R. et Singh, M. (2010). "Interaction of nanoparticles and cell-penetrating peptides with skin for transdermal drug delivery." Mol Membr Biol **27**(7): 247-259.
- Dick, C. A., Brown, D. M., Donaldson, K. et Stone, V. (2003). "The role of free radicals in the toxic and inflammatory effects of four different ultrafine particle types." Inhal Toxicol **15**(1): 39-52.
- Djurisic, A. B. et Leung, Y. H. (2006). "Optical properties of ZnO nanostructures." Small **2**(8-9): 944-961.
- Donaldson, K., Borm, P. J., Castranova, V. et Gulumian, M. (2009). "The limits of testing particle-mediated oxidative stress in vitro in predicting diverse pathologies; relevance for testing of nanoparticles." Part Fibre Toxicol **6**: 13.
- Donaldson, K., Brown, D., Clouter, A., Duffin, R., MacNee, W., Renwick, L., Tran, L., et al. (2002). "The pulmonary toxicology of ultrafine particles." J Aerosol Med **15**(2): 213-220.
- Donaldson, K., Stone, V., Tran, C. L., Kreyling, W. et Borm, P. J. (2004). "Nanotoxicology." Occup Environ Med **61**(9): 727-728.
- Dooms, H. et Abbas, A. K. (2006). "Control of CD4+ T-cell memory by cytokines and costimulators." Immunol Rev **211**: 23-38.
- Dooms, H., Kahn, E., Knoechel, B. et Abbas, A. K. (2004). "IL-2 induces a competitive survival advantage in T lymphocytes." J Immunol **172**(10): 5973-5979.
- Dooms, H., Wolslegel, K., Lin, P. et Abbas, A. K. (2007). "Interleukin-2 enhances CD4+ T cell memory by promoting the generation of IL-7R alpha-expressing cells." J Exp Med **204**(3): 547-557.
- Dugan, L. L., Lovett, E. G., Quick, K. L., Lotharius, J., Lin, T. T. et O'Malley, K. L. (2001). "Fullerene-based antioxidants and neurodegenerative disorders." Parkinsonism Relat Disord **7**(3): 243-246.
- Dunford, R., Salinaro, A., Cai, L., Serpone, N., Horikoshi, S., Hidaka, H. et Knowland, J. (1997). "Chemical oxidation and DNA damage catalysed by inorganic sunscreen ingredients." FEBS Lett **418**(1-2): 87-90.
- Dunn, K. et Edwards-Jones, V. (2004). "The role of Acticoat with nanocrystalline silver in the management of burns." Burns **30** Suppl 1: S1-9.
- El-Achkar, T. M., McCracken, R., Rauchman, M., Heitmeier, M. R., Al-Aly, Z., Dagher, P. C. et Wu, X. R. (2011). "Tamm-Horsfall protein-deficient thick ascending limbs promote injury to neighboring S3 segments in an MIP-2-dependent mechanism." Am J Physiol Renal Physiol **300**(4): F999-1007.
- Eom, H. J. et Choi, J. (2010). "p38 MAPK activation, DNA damage, cell cycle arrest and apoptosis as mechanisms of toxicity of silver nanoparticles in Jurkat T cells." Environ Sci Technol **44**(21): 8337-8342.
- Fadeel, B. et Garcia-Bennett, A. E. (2010). "Better safe than sorry: Understanding the toxicological properties of inorganic nanoparticles manufactured for biomedical applications." Adv Drug Deliv Rev **62**(3): 362-374.
- Fan, Z. et Lu, J. G. (2005). "Zinc oxide nanostructures: synthesis and properties." J Nanosci Nanotechnol **5**(10): 1561-1573.
- Fehervari, Z., Yamaguchi, T. et Sakaguchi, S. (2006). "The dichotomous role of IL-2: tolerance versus immunity." Trends Immunol **27**(3): 109-111.
- Ferrari, M. (2005). "Cancer nanotechnology: opportunities and challenges." Nat Rev Cancer **5**(3): 161-171.

- Fiorito, S., Serafino, A., Andreola, F. et Bernier, P. (2006). "Effects of fullerenes and single-wall carbon nanotubes on murine and human macrophages." Carbon **44**(6): 1100-1105.
- Florence, A. T. (1997). "The oral absorption of micro- and nanoparticulates: neither exceptional nor unusual." Pharm Res **14**(3): 259-266.
- Florence, A. T. (2004). "Issues in oral nanoparticle drug carrier uptake and targeting." J Drug Target **12**(2): 65-70.
- Foldbjerg, R., Dang, D. A. et Autrup, H. (2011). "Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549." Arch Toxicol **85**(7): 743-750.
- Foldbjerg, R., Olesen, P., Hougaard, M., Dang, D. A., Hoffmann, H. J. et Autrup, H. (2009). "PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes." Toxicol Lett **190**(2): 156-162.
- Foley, S., Crowley, C., Smahi, M., Bonfils, C., Erlanger, B. F., Seta, P. et Larroque, C. (2002). "Cellular localisation of a water-soluble fullerene derivative." Biochem Biophys Res Commun **294**(1): 116-119.
- Fowell, D. J., Shinkai, K., Liao, X. C., Beebe, A. M., Coffman, R. L., Littman, D. R. et Locksley, R. M. (1999). "Impaired NFATc translocation and failure of Th2 development in Itk-deficient CD4+ T cells." Immunity **11**(4): 399-409.
- Foy, S. P. et Labhasetwar, V. (2011). "Oh the irony: Iron as a cancer cause or cure?" Biomaterials **32**(35): 9155-9158.
- Fulda, S., Gorman, A. M., Hori, O. et Samali, A. (2010). "Cellular stress responses: cell survival and cell death." Int J Cell Biol **2010**: 214074.
- Funakoshi-Tago, M., Nagata, T., Tago, K., Tsukada, M., Tanaka, K., Nakamura, S., Mashino, T., *et al.* (2012). "Fullerene derivative prevents cellular transformation induced by JAK2 V617F mutant through inhibiting c-Jun N-terminal kinase pathway." Cell Signal **24**(11): 2024-2034.
- Funk, S. D. et Orr, A. W. (2012). "Ephs and ephrins resurface in inflammation, immunity, and atherosclerosis." Pharmacol Res **67**(1): 42-52.
- Gaffen, S. L. (2001). "Signaling domains of the interleukin 2 receptor." Cytokine **14**(2): 63-77.
- Geiser, M., Rothen-Rutishauser, B., Kapp, N., Schurch, S., Kreyling, W., Schulz, H., Semmler, M., *et al.* (2005). "Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells." Environ Health Perspect **113**(11): 1555-1560.
- Geissmann, F., Manz, M. G., Jung, S., Sieweke, M. H., Merad, M. et Ley, K. (2010). "Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells." Science **327**(5966): 656-661.
- Gharbi, N., Pressac, M., Hadchouel, M., Szwarc, H., Wilson, S. R. et Moussa, F. (2005). "[60]fullerene is a powerful antioxidant in vivo with no acute or subacute toxicity." Nano Lett **5**(12): 2578-2585.
- Gillis, S., Mertelsmann, R. et Moore, M. A. (1981). "T-cell growth factor (interleukin 2) control of T-lymphocyte proliferation: possible involvement in leukemogenesis." Transplant Proc **13**(4): 1884-1890.
- Girgis, E., Wahsh, M. M., Othman, A. G., Bandhu, L. et Rao, K. (2011). "Synthesis, magnetic and optical properties of core/shell Co_{1-x}Zn_xFe₂O₄/SiO₂ nanoparticles." Nanoscale Res Lett **6**(1): 460.
- Gloire, G., Legrand-Poels, S. et Piette, J. (2006). "NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later." Biochem Pharmacol **72**(11): 1493-1505.
- Goesmann, H. et Feldmann, C. (2010). "Nanoparticulate functional materials." Angew Chem Int Ed Engl **49**(8): 1362-1395.
- Gong, D. et Malek, T. R. (2007). "Cytokine-dependent Blimp-1 expression in activated T cells inhibits IL-2 production." J Immunol **178**(1): 242-252.

- Greulich, C., Diendorf, J., Gessmann, J., Simon, T., Habijan, T., Eggeler, G., Schildhauer, T. A., *et al.* (2011). "Cell type-specific responses of peripheral blood mononuclear cells to silver nanoparticles." Acta Biomater **7**(9): 3505-3514.
- Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J. E. et Roncarolo, M. G. (1997). "A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis." Nature **389**(6652): 737-742.
- Gu, Y. J., Cheng, J., Lin, C. C., Lam, Y. W., Cheng, S. H. et Wong, W. T. (2009). "Nuclear penetration of surface functionalized gold nanoparticles." Toxicol Appl Pharmacol **237**(2): 196-204.
- Guo, D., Zhu, L., Huang, Z., Zhou, H., Ge, Y., Ma, W., Wu, J., *et al.* (2013). "Anti-leukemia activity of PVP-coated silver nanoparticles via generation of reactive oxygen species and release of silver ions." Biomaterials.
- Gurr, J. R., Wang, A. S., Chen, C. H. et Jan, K. Y. (2005). "Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells." Toxicology **213**(1-2): 66-73.
- Gurunathan, S., Lee, K. J., Kalishwaralal, K., Sheikpranbabu, S., Vaidyanathan, R. et Eom, S. H. (2009). "Antiangiogenic properties of silver nanoparticles." Biomaterials **30**(31): 6341-6350.
- Haase, H. et Rink, L. (2009). "Functional significance of zinc-related signaling pathways in immune cells." Annu Rev Nutr **29**: 133-152.
- Hagemeijer, A. et Graux, C. (2010). "ABL1 rearrangements in T-cell acute lymphoblastic leukemia." Genes Chromosomes Cancer **49**(4): 299-308.
- Hagens, W. I., Oomen, A. G., de Jong, W. H., Cassee, F. R. et Sips, A. J. (2007). "What do we (need to) know about the kinetic properties of nanoparticles in the body?" Regul Toxicol Pharmacol **49**(3): 217-229.
- Harhaji, L., Isakovic, A., Raicevic, N., Markovic, Z., Todorovic-Markovic, B., Nikolic, N., Vranjes-Djuric, S., *et al.* (2007). "Multiple mechanisms underlying the anticancer action of nanocrystalline fullerene." Eur J Pharmacol **568**(1-3): 89-98.
- Harrington, L. E., Hatton, R. D., Mangan, P. R., Turner, H., Murphy, T. L., Murphy, K. M. et Weaver, C. T. (2005). "Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages." Nat Immunol **6**(11): 1123-1132.
- Hatakeyama, M., Mori, H., Doi, T. et Taniguchi, T. (1989). "A restricted cytoplasmic region of IL-2 receptor beta chain is essential for growth signal transduction but not for ligand binding and internalization." Cell **59**(5): 837-845.
- Hayden, M. S. et Ghosh, S. (2004). "Signaling to NF-kappaB." Genes Dev **18**(18): 2195-2224.
- He, Y. W., Nakajima, H., Leonard, W. J., Adkins, B. et Malek, T. R. (1997). "The common gamma-chain of cytokine receptors regulates intrathymic T cell development at multiple stages." J Immunol **158**(6): 2592-2599.
- Hemler, M. E., Brenner, M. B., McLean, J. M. et Strominger, J. L. (1984). "Antigenic stimulation regulates the level of expression of interleukin 2 receptor on human T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(7): 2172-2175.
- Henderson, R. F. (2005). "Use of bronchoalveolar lavage to detect respiratory tract toxicity of inhaled material." Exp Toxicol Pathol **57 Suppl 1**: 155-159.
- Henry, T. B., Menn, F. M., Fleming, J. T., Wilgus, J., Compton, R. N. et Sayler, G. S. (2007). "Attributing effects of aqueous C60 nano-aggregates to tetrahydrofuran decomposition products in larval zebrafish by assessment of gene expression." Environ Health Perspect **115**(7): 1059-1065.
- Hensley, K., Robinson, K. A., Gabbita, S. P., Salsman, S. et Floyd, R. A. (2000). "Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury." Free Radic Biol Med **28**(10): 1456-1462.
- Hillyer, J. F. et Albrecht, R. M. (2001). "Gastrointestinal persorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles." J Pharm Sci **90**(12): 1927-1936.

- Hirakawa, K., Mori, M., Yoshida, M., Oikawa, S. et Kawanishi, S. (2004). "Photo-irradiated titanium dioxide catalyzes site specific DNA damage via generation of hydrogen peroxide." Free Radic Res **38**(5): 439-447.
- Holen, H. L., Nustad, K. et Aasheim, H. C. (2010). "Activation of EphA receptors on CD4+CD45RO+ memory cells stimulates migration." J Leukoc Biol **87**(6): 1059-1068.
- Horie, M., Nishio, K., Kato, H., Shinohara, N., Nakamura, A., Fujita, K., Kinugasa, S., *et al.* (2010). "In vitro evaluation of cellular responses induced by stable fullerene C60 medium dispersion." J Biochem **148**(3): 289-298.
- Hoyer, K. K., Dooms, H., Barron, L. et Abbas, A. K. (2008). "Interleukin-2 in the development and control of inflammatory disease." Immunol Rev **226**: 19-28.
- Hrebinyk, S. M., Hryniuk, II, Pryluts'ka, S. V. et Matyshevs'ka, O. P. (2012). "[Generation of active oxygen forms in rat thymocytes under action of hydrogen peroxide and fullerene C60]." Ukr Biokhim Zh **84**(2): 48-52.
- Hsiao, J. K., Chu, H. H., Wang, Y. H., Lai, C. W., Chou, P. T., Hsieh, S. T., Wang, J. L., *et al.* (2008). "Macrophage physiological function after superparamagnetic iron oxide labeling." NMR Biomed **21**(8): 820-829.
- Hsin, Y. H., Chen, C. F., Huang, S., Shih, T. S., Lai, P. S. et Chueh, P. J. (2008). "The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells." Toxicol Lett **179**(3): 130-139.
- Hubbs, A. F., Mercer, R. R., Benkovic, S. A., Harkema, J., Sriram, K., Schwegler-Berry, D., Goravanahally, M. P., *et al.* (2011). "Nanotoxicology--a pathologist's perspective." Toxicol Pathol **39**(2): 301-324.
- Hussain, N., Jaitley, V. et Florence, A. T. (2001). "Recent advances in the understanding of uptake of microparticulates across the gastrointestinal lymphatics." Adv Drug Deliv Rev **50**(1-2): 107-142.
- Hussain, S. M., Hess, K. L., Gearhart, J. M., Geiss, K. T. et Schlager, J. J. (2005). "In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells." Toxicol In Vitro **19**(7): 975-983.
- Isakovic, A., Markovic, Z., Todorovic-Markovic, B., Nikolic, N., Vranjes-Djuric, S., Mirkovic, M., Dramicanin, M., *et al.* (2006). "Distinct cytotoxic mechanisms of pristine versus hydroxylated fullerene." Toxicol Sci **91**(1): 173-183.
- Jacobsen, N. R., Pojana, G., White, P., Moller, P., Cohn, C. A., Korsholm, K. S., Vogel, U., *et al.* (2008). "Genotoxicity, cytotoxicity, and reactive oxygen species induced by single-walled carbon nanotubes and C(60) fullerenes in the FE1-Mutatrade markMouse lung epithelial cells." Environ Mol Mutagen **49**(6): 476-487.
- Jain, K. K. (2010). "Advances in the field of nanooncology." BMC Med **8**: 83.
- Jain, P. et Pradeep, T. (2005). "Potential of silver nanoparticle-coated polyurethane foam as an antibacterial water filter." Biotechnol Bioeng **90**(1): 59-63.
- Jain, T. K., Reddy, M. K., Morales, M. A., Leslie-Pelecky, D. L. et Labhassetwar, V. (2008). "Biodistribution, clearance, and biocompatibility of iron oxide magnetic nanoparticles in rats." Mol Pharm **5**(2): 316-327.
- Janes, K. A., Fresneau, M. P., Marazuela, A., Fabra, A. et Alonso, M. J. (2001). "Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin." J Control Release **73**(2-3): 255-267.
- Jani, P., Halbert, G. W., Langridge, J. et Florence, A. T. (1990). "Nanoparticle uptake by the rat gastrointestinal mucosa: quantitation and particle size dependency." J Pharm Pharmacol **42**(12): 821-826.
- Jelley-Gibbs, D. M., Lepak, N. M., Yen, M. et Swain, S. L. (2000). "Two distinct stages in the transition from naive CD4 T cells to effectors, early antigen-dependent and late cytokine-driven expansion and differentiation." J Immunol **165**(9): 5017-5026.

- Jia, G., Wang, H., Yan, L., Wang, X., Pei, R., Yan, T., Zhao, Y., *et al.* (2005). "Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene." Environ Sci Technol **39**(5): 1378-1383.
- Kagan, V. E., Konduru, N. V., Feng, W., Allen, B. L., Conroy, J., Volkov, Y., Vlasova, I., *et al.* (2010). "Carbon nanotubes degraded by neutrophil myeloperoxidase induce less pulmonary inflammation." Nat Nanotechnol **5**(5): 354-359.
- Kallies, A., Hawkins, E. D., Belz, G. T., Metcalf, D., Hommel, M., Corcoran, L. M., Hodgkin, P. D., *et al.* (2006). "Transcriptional repressor Blimp-1 is essential for T cell homeostasis and self-tolerance." Nat Immunol **7**(5): 466-474.
- Kaltenberg, J., Plum, L. M., Ober-Blobaum, J. L., Honscheid, A., Rink, L. et Haase, H. (2010). "Zinc signals promote IL-2-dependent proliferation of T cells." Eur J Immunol **40**(5): 1496-1503.
- Kang, S. J., Kim, B. M., Lee, Y. J. et Chung, H. W. (2008). "Titanium dioxide nanoparticles trigger p53-mediated damage response in peripheral blood lymphocytes." Environ Mol Mutagen **49**(5): 399-405.
- Kang, S. J., Kim, B. M., Lee, Y. J., Hong, S. H. et Chung, H. W. (2009). "Titanium dioxide nanoparticles induce apoptosis through the JNK/p38-caspase-8-Bid pathway in phytohemagglutinin-stimulated human lymphocytes." Biochem Biophys Res Commun **386**(4): 682-687.
- Karlsson, H. L., Cronholm, P., Gustafsson, J. et Moller, L. (2008). "Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes." Chem Res Toxicol **21**(9): 1726-1732.
- Kim, D., Hong, K. S. et Song, J. (2007). "The present status of cell tracking methods in animal models using magnetic resonance imaging technology." Mol Cells **23**(2): 132-137.
- Kim, J. A., Lee, N., Kim, B. H., Rhee, W. J., Yoon, S., Hyeon, T. et Park, T. H. (2011). "Enhancement of neurite outgrowth in PC12 cells by iron oxide nanoparticles." Biomaterials **32**(11): 2871-2877.
- Kim, S. et Ryu, D. Y. (2013). "Silver nanoparticle-induced oxidative stress, genotoxicity and apoptosis in cultured cells and animal tissues." J Appl Toxicol **33**(2): 78-89.
- Kirsch-Volders, M., Vanhauwaert, A., Eichenlaub-Ritter, U. et Decordier, I. (2003). "Indirect mechanisms of genotoxicity." Toxicol Lett **140-141**: 63-74.
- Kitamura, T., Kabuyama, Y., Kamataki, A., Homma, M. K., Kobayashi, H., Aota, S., Kikuchi, S., *et al.* (2008). "Enhancement of lymphocyte migration and cytokine production by ephrinB1 system in rheumatoid arthritis." Am J Physiol Cell Physiol **294**(1): C189-196.
- Kneitz, B., Herrmann, T., Yonehara, S. et Schimpl, A. (1995). "Normal clonal expansion but impaired Fas-mediated cell death and anergy induction in interleukin-2-deficient mice." Eur J Immunol **25**(9): 2572-2577.
- Kobayashi, T. (2011). "Cancer hyperthermia using magnetic nanoparticles." Biotechnol J **6**(11): 1342-1347.
- Kohli, A. K. et Alpar, H. O. (2004). "Potential use of nanoparticles for transcutaneous vaccine delivery: effect of particle size and charge." Int J Pharm **275**(1-2): 13-17.
- Kolaczowska, E. et Kubes, P. (2013). "Neutrophil recruitment and function in health and inflammation." Nat Rev Immunol **13**(3): 159-175.
- Konczol, M., Ebeling, S., Goldenberg, E., Treude, F., Gminski, R., Giere, R., Grobety, B., *et al.* (2011). "Cytotoxicity and genotoxicity of size-fractionated iron oxide (magnetite) in A549 human lung epithelial cells: role of ROS, JNK, and NF-kappaB." Chem Res Toxicol **24**(9): 1460-1475.
- Krug, H. F. et Wick, P. (2011). "Nanotoxicology: an interdisciplinary challenge." Angew Chem Int Ed Engl **50**(6): 1260-1278.
- Kuhns, M. S. et Badgandi, H. B. (2012). "Piecing together the family portrait of TCR-CD3 complexes." Immunol Rev **250**(1): 120-143.

- Kunkel, S. L., Standiford, T., Kasahara, K. et Strieter, R. M. (1991). "Interleukin-8 (IL-8): the major neutrophil chemotactic factor in the lung." Exp Lung Res **17**(1): 17-23.
- Kunzmann, A., Andersson, B., Thurnherr, T., Krug, H., Scheynius, A. et Fadeel, B. (2011). "Toxicology of engineered nanomaterials: focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation." Biochim Biophys Acta **1810**(3): 361-373.
- Lademann, J., Weigmann, H., Rickmeyer, C., Barthelmes, H., Schaefer, H., Mueller, G. et Sterry, W. (1999). "Penetration of titanium dioxide microparticles in a sunscreen formulation into the horny layer and the follicular orifice." Skin Pharmacol Appl Skin Physiol **12**(5): 247-256.
- Lander, H. M. (1997). "An essential role for free radicals and derived species in signal transduction." FASEB J **11**(2): 118-124.
- Lankoff, A., Sandberg, W. J., Wegierek-Ciuk, A., Lisowska, H., Refsnes, M., Sartowska, B., Schwarze, P. E., *et al.* (2012). "The effect of agglomeration state of silver and titanium dioxide nanoparticles on cellular response of HepG2, A549 and THP-1 cells." Toxicol Lett **208**(3): 197-213.
- Lansdown, A. B. et Taylor, A. (1997). "Zinc and titanium oxides: promising UV-absorbers but what influence do they have on the intact skin?" Int J Cosmet Sci **19**(4): 167-172.
- Lao, F., Chen, L., Li, W., Ge, C., Qu, Y., Sun, Q., Zhao, Y., *et al.* (2009). "Fullerene nanoparticles selectively enter oxidation-damaged cerebral microvessel endothelial cells and inhibit JNK-related apoptosis." ACS Nano **3**(11): 3358-3368.
- Lee, H. J., Yeo, S. Y. et Jeong, S. H. (2003). "Antibacterial effect of nanosized silver colloidal solution on textile fabrics." J. Mater. Sci. **38**: 2199-2204.
- Lee, R. W., Creed, T. J., Schewitz, L. P., Newcomb, P. V., Nicholson, L. B., Dick, A. D. et Dayan, C. M. (2007). "CD4+CD25(int) T cells in inflammatory diseases refractory to treatment with glucocorticoids." J Immunol **179**(11): 7941-7948.
- Leminea, O. M., Bououdinac, M., Sajieddinee, M., Al-Saiee, A. M., Shafib, M., Khatabb, A., Al-hilalia, M., *et al.* (2011). "Synthesis, structural, magnetic and optical properties of nanocrystalline ZnFe₂O₄." Physica B: Condensed Matter **406**(10): 1989-1994.
- Lenardo, M. J. (1991). "Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis." Nature **353**(6347): 858-861.
- Leonard, W. J. (2001). "Cytokines and immunodeficiency diseases." Nat Rev Immunol **1**(3): 200-208.
- Leonard, W. J. et O'Shea, J. J. (1998). "Jaks and STATs: biological implications." Annu Rev Immunol **16**: 293-322.
- Lewinski, N., Colvin, V. et Drezek, R. (2008). "Cytotoxicity of nanoparticles." Small **4**(1): 26-49.
- Li, N., Sioutas, C., Cho, A., Schmitz, D., Misra, C., Sempf, J., Wang, M., *et al.* (2003). "Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage." Environ Health Perspect **111**(4): 455-460.
- Li, Q., Mahendra, S., Lyon, D. Y., Brunet, L., Liga, M. V., Li, D. et Alvarez, P. J. (2008). "Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potential applications and implications." Water Res **42**(18): 4591-4602.
- Li, S. D. et Huang, L. (2008). "Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles." Mol Pharm **5**(4): 496-504.
- Liang, X. J., Chen, C., Zhao, Y., Jia, L. et Wang, P. C. (2008). "Biopharmaceutics and therapeutic potential of engineered nanomaterials." Curr Drug Metab **9**(8): 697-709.
- Liao, W., Lin, J. X., Wang, L., Li, P. et Leonard, W. J. (2011). "Modulation of cytokine receptors by IL-2 broadly regulates differentiation into helper T cell lineages." Nat Immunol **12**(6): 551-559.
- Linse, S., Cabaleiro-Lago, C., Xue, W. F., Lynch, I., Lindman, S., Thulin, E., Radford, S. E., *et al.* (2007). "Nucleation of protein fibrillation by nanoparticles." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(21): 8691-8696.

- Littman, D. R. et Rudensky, A. Y. (2010). "Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation." *Cell* **140**(6): 845-858.
- Liu, K. D., Gaffen, S. L. et Goldsmith, M. A. (1998). "JAK/STAT signaling by cytokine receptors." *Curr Opin Immunol* **10**(3): 271-278.
- Liu, Y., Jiao, F., Qiu, Y., Li, W., Qu, Y., Tian, C., Li, Y., *et al.* (2009). "Immunostimulatory properties and enhanced TNF- alpha mediated cellular immunity for tumor therapy by C60(OH)20 nanoparticles." *Nanotechnology* **20**(41): 415102.
- Lok, C. N., Ho, C. M., Chen, R., He, Q. Y., Yu, W. Y., Sun, H., Tam, P. K., *et al.* (2007). "Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities." *J Biol Inorg Chem* **12**(4): 527-534.
- London, C. A., Lodge, M. P. et Abbas, A. K. (2000). "Functional responses and costimulator dependence of memory CD4+ T cells." *J Immunol* **164**(1): 265-272.
- Lu, A. H., Salabas, E. L. et Schuth, F. (2007). "Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application." *Angew Chem Int Ed Engl* **46**(8): 1222-1244.
- Malek, T. R. (2008). "The biology of interleukin-2." *Annu Rev Immunol* **26**: 453-479.
- Malek, T. R. et Bayer, A. L. (2004). "Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2." *Nat Rev Immunol* **4**(9): 665-674.
- Malek, T. R. et Castro, I. (2010). "Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity." *Immunity* **33**(2): 153-165.
- Markovic, Z. et Trajkovic, V. (2008). "Biomedical potential of the reactive oxygen species generation and quenching by fullerenes (C60)." *Biomaterials* **29**(26): 3561-3573.
- Martin, L. D., Krunkosky, T. M., Dye, J. A., Fischer, B. M., Jiang, N. F., Rochelle, L. G., Akley, N. J., *et al.* (1997). "The role of reactive oxygen and nitrogen species in the response of airway epithelium to particulates." *Environ Health Perspect* **105 Suppl 5**: 1301-1307.
- Martins, G. A., Cimmino, L., Shapiro-Shelef, M., Szabolcs, M., Herron, A., Magnusdottir, E. et Calame, K. (2006). "Transcriptional repressor Blimp-1 regulates T cell homeostasis and function." *Nat Immunol* **7**(5): 457-465.
- Maynard, A. D. (2007). "Nanotechnology: the next big thing, or much ado about nothing?" *Ann Occup Hyg* **51**(1): 1-12.
- Maynard, A. D., Baron, P. A., Foley, M., Shvedova, A. A., Kisin, E. R. et Castranova, V. (2004). "Exposure to carbon nanotube material: aerosol release during the handling of unrefined single-walled carbon nanotube material." *J Toxicol Environ Health A* **67**(1): 87-107.
- McKinstry, K. K., Strutt, T. M. et Swain, S. L. (2010). "Regulation of CD4+ T-cell contraction during pathogen challenge." *Immunol Rev* **236**: 110-124.
- Mier, J. W. et Gallo, R. C. (1980). "Purification and some characteristics of human T-cell growth factor from phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte-conditioned media." *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(10): 6134-6138.
- Moghimi, S. M., Hunter, A. C. et Murray, J. C. (2005). "Nanomedicine: current status and future prospects." *FASEB J* **19**(3): 311-330.
- Moller, W., Barth, W., Kohlhaufl, M., Haussinger, K., Stahlhofen, W. et Heyder, J. (2001). "Human alveolar long-term clearance of ferromagnetic iron oxide microparticles in healthy and diseased subjects." *Exp Lung Res* **27**(7): 547-568.
- Monti, D., Moretti, L., Salvioli, S., Straface, E., Malorni, W., Pellicciari, R., Schettini, G., *et al.* (2000). "C60 carboxyfullerene exerts a protective activity against oxidative stress-induced apoptosis in human peripheral blood mononuclear cells." *Biochem Biophys Res Commun* **277**(3): 711-717.
- Mor, F. et Cohen, I. R. (1996). "IL-2 rescues antigen-specific T cells from radiation or dexamethasone-induced apoptosis. Correlation with induction of Bcl-2." *J Immunol* **156**(2): 515-522.
- Mori, T., Takada, H., Ito, S., Matsubayashi, K., Miwa, N. et Sawaguchi, T. (2006). "Preclinical studies on safety of fullerene upon acute oral administration and evaluation for no mutagenesis." *Toxicology* **225**(1): 48-54.

- Moriggl, R., Topham, D. J., Teglund, S., Sexl, V., McKay, C., Wang, D., Hoffmeyer, A., *et al.* (1999). "Stat5 is required for IL-2-induced cell cycle progression of peripheral T cells." Immunity **10**(2): 249-259.
- Morimoto, Y., Hirohashi, M., Ogami, A., Oyabu, T., Myojo, T., Nishi, K., Kadoya, C., *et al.* (2010). "Inflammogenic effect of well-characterized fullerenes in inhalation and intratracheal instillation studies." Part Fibre Toxicol **7**: 4.
- Mou, Y., Chen, B., Zhang, Y., Hou, Y., Xie, H., Xia, G., Tang, M., *et al.* (2011). "Influence of synthetic superparamagnetic iron oxide on dendritic cells." Int J Nanomedicine **6**: 1779-1786.
- Murdock, R. C., Braydich-Stolle, L., Schrand, A. M., Schlager, J. J. et Hussain, S. M. (2008). "Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique." Toxicol Sci **101**(2): 239-253.
- Murray, P. J. et Wynn, T. A. (2011). "Protective and pathogenic functions of macrophage subsets." Nat Rev Immunol **11**(11): 723-737.
- Nadworny, P. L., Wang, J., Tredget, E. E. et Burrell, R. E. (2008). "Anti-inflammatory activity of nanocrystalline silver in a porcine contact dermatitis model." Nanomedicine **4**(3): 241-251.
- Nadworny, P. L., Wang, J., Tredget, E. E. et Burrell, R. E. (2010). "Anti-inflammatory activity of nanocrystalline silver-derived solutions in porcine contact dermatitis." J Inflamm (Lond) **7**: 13.
- Naqvi, S., Samim, M., Abdin, M., Ahmed, F. J., Maitra, A., Prashant, C. et Dinda, A. K. (2010). "Concentration-dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by increased oxidative stress." Int J Nanomedicine **5**: 983-989.
- Nel, A. (2005). "Atmosphere. Air pollution-related illness: effects of particles." Science **308**(5723): 804-806.
- Nel, A., Xia, T., Madler, L. et Li, N. (2006). "Toxic potential of materials at the nanolevel." Science **311**(5761): 622-627.
- Nelson, B. H. et Willerford, D. M. (1998). "Biology of the interleukin-2 receptor." Adv Immunol **70**: 1-81.
- Nikolic, N., Vranjes-Ethuric, S., Jankovic, D., Ethokic, D., Mirkovic, M., Bibic, N. et Trajkovic, V. (2009). "Preparation and biodistribution of radiolabeled fullerene C60 nanocrystals." Nanotechnology **20**(38): 385102.
- Nishigori, C., Yarosh, D. B., Ullrich, S. E., Vink, A. A., Bucana, C. D., Roza, L. et Kripke, M. L. (1996). "Evidence that DNA damage triggers interleukin 10 cytokine production in UV-irradiated murine keratinocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(19): 10354-10359.
- Nurieva, R. I., Chung, Y., Hwang, D., Yang, X. O., Kang, H. S., Ma, L., Wang, Y. H., *et al.* (2008). "Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages." Immunity **29**(1): 138-149.
- O'Connor, A., Nishigori, C., Yarosh, D., Alas, L., Kibitel, J., Burley, L., Cox, P., *et al.* (1996). "DNA double strand breaks in epidermal cells cause immune suppression in vivo and cytokine production in vitro." J Immunol **157**(1): 271-278.
- Oberdorster, G. (2000). "Toxicology of ultrafine particles: in vivo studies." Philos Trans R Soc Lond A **358**: 2719-2740.
- Oberdorster, G. (2010). "Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology." J Intern Med **267**(1): 89-105.
- Oberdorster, G., Maynard, A., Donaldson, K., Castranova, V., Fitzpatrick, J., Ausman, K., Carter, J., *et al.* (2005a). "Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy." Part Fibre Toxicol **2**: 8.
- Oberdorster, G., Oberdorster, E. et Oberdorster, J. (2005b). "Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles." Environ Health Perspect **113**(7): 823-839.
- Oberdorster, G., Oberdorster, E. et Oberdorster, J. (2007). "Concepts of nanoparticle dose metric and response metric." Environ Health Perspect **115**(6): A290.

- Oberdorster, G., Sharp, Z., Atudorei, V., Elder, A., Gelein, R., Lunts, A., Kreyling, W., *et al.* (2002). "Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats." J Toxicol Environ Health A **65**(20): 1531-1543.
- Ono, M., Yaguchi, H., Ohkura, N., Kitabayashi, I., Nagamura, Y., Nomura, T., Miyachi, Y., *et al.* (2007). "Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1." Nature **446**(7136): 685-689.
- Pan, J. S., Hong, M. Z. et Ren, J. L. (2009). "Reactive oxygen species: a double-edged sword in oncogenesis." World J Gastroenterol **15**(14): 1702-1707.
- Park, E. J., Kim, H., Kim, Y., Yi, J., Choi, K. et Park, K. (2010a). "Carbon fullerenes (C60s) can induce inflammatory responses in the lung of mice." Toxicol Appl Pharmacol **244**(2): 226-233.
- Park, E. J., Kim, H., Kim, Y., Yi, J., Choi, K. et Park, K. (2010b). "Inflammatory responses may be induced by a single intratracheal instillation of iron nanoparticles in mice." Toxicology **275**(1-3): 65-71.
- Park, E. J., Yi, J., Chung, K. H., Ryu, D. Y., Choi, J. et Park, K. (2008). "Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells." Toxicol Lett **180**(3): 222-229.
- Park, E. J., Yi, J., Kim, Y., Choi, K. et Park, K. (2010c). "Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism." Toxicol In Vitro **24**(3): 872-878.
- Pasquale, E. B. (2008). "Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease." Cell **133**(1): 38-52.
- Porter, A. E., Muller, K., Skepper, J., Midgley, P. et Welland, M. (2006). "Uptake of C60 by human monocyte macrophages, its localization and implications for toxicity: studied by high resolution electron microscopy and electron tomography." Acta Biomater **2**(4): 409-419.
- Posgai, R., Cipolla-McCulloch, C. B., Murphy, K. R., Hussain, S. M., Rowe, J. J. et Nielsen, M. G. (2011). "Differential toxicity of silver and titanium dioxide nanoparticles on *Drosophila melanogaster* development, reproductive effort, and viability: size, coatings and antioxidants matter." Chemosphere **85**(1): 34-42.
- Prasad, R. Y., McGee, J. K., Killius, M. G., Ackerman, D., Blackman, C. F., Demarini, D. M. et Simmons, S. O. (2013). "Investigating oxidative stress and inflammatory responses elicited by silver nanoparticles using high-throughput reporter genes in HepG2 cells: Effect of size, surface coating, and intracellular uptake." Toxicol In Vitro.
- Puntarulo, S. (2005). "Iron, oxidative stress and human health." Mol Aspects Med **26**(4-5): 299-312.
- Qian, D. et Weiss, A. (1997). "T cell antigen receptor signal transduction." Curr Opin Cell Biol **9**(2): 205-212.
- Ragin, M. J., Hu, J., Henderson, A. J. et August, A. (2005). "A role for the Tec family kinase ITK in regulating SEB-induced interleukin-2 production in vivo via c-jun phosphorylation." BMC Immunol **6**: 19.
- Rallo, R., France, B., Liu, R., Nair, S., George, S., Damoiseaux, R., Giralt, F., *et al.* (2011). "Self-Organizing Map Analysis of Toxicity-Related Cell Signaling Pathways for Metal and Metal Oxide Nanoparticles." Environ Sci Technol.
- Rebollo, A., Pitton, C., Garcia, A., Gomez, J. et Silva, A. (1995). "A role for the intermediate affinity IL-2R in the protection against glucocorticoid-induced apoptosis." Immunology **84**(3): 388-395.
- Reddy, K. B., Nabha, S. M. et Atanaskova, N. (2003). "Role of MAP kinase in tumor progression and invasion." Cancer Metastasis Rev **22**(4): 395-403.
- Refaeli, Y., Van Parijs, L., London, C. A., Tschopp, J. et Abbas, A. K. (1998). "Biochemical mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis." Immunity **8**(5): 615-623.
- Reicher, B. et Barda-Saad, M. (2010). "Multiple pathways leading from the T-cell antigen receptor to the actin cytoskeleton network." FEBS Lett **584**(24): 4858-4864.

- Riehemann, K., Schneider, S. W., Luger, T. A., Godin, B., Ferrari, M. et Fuchs, H. (2009). "Nanomedicine--challenge and perspectives." Angew Chem Int Ed Engl **48**(5): 872-897.
- Rishikeshi, S. N., Joshi, S. S., Temgire, M. K. et Bellare, J. R. (2013). "Chain length dependence of polyol synthesis of zinc ferrite nanoparticles: why is diethylene glycol so different?" Dalton Trans **42**(15): 5406-5414.
- Romoser, A. A., Figueroa, D. E., Sooresh, A., Scribner, K., Chen, P. L., Porter, W., Criscitiello, M. F., *et al.* (2012). "Distinct immunomodulatory effects of a panel of nanomaterials in human dermal fibroblasts." Toxicol Lett **210**(3): 293-301.
- Rossi, E. M., Pylkkanen, L., Koivisto, A. J., Nykasenoja, H., Wolff, H., Savolainen, K. et Alenius, H. (2010a). "Inhalation exposure to nanosized and fine TiO₂ particles inhibits features of allergic asthma in a murine model." Part Fibre Toxicol **7**: 35.
- Rossi, E. M., Pylkkanen, L., Koivisto, A. J., Vippola, M., Jensen, K. A., Miettinen, M., Sirola, K., *et al.* (2010b). "Airway exposure to silica-coated TiO₂ nanoparticles induces pulmonary neutrophilia in mice." Toxicol Sci **113**(2): 422-433.
- Rothen-Rutishauser, B. M., Schurch, S., Haenni, B., Kapp, N. et Gehr, P. (2006). "Interaction of fine particles and nanoparticles with red blood cells visualized with advanced microscopic techniques." Environ Sci Technol **40**(14): 4353-4359.
- Roursgaard, M., Poulsen, S. S., Kepley, C. L., Hammer, M., Nielsen, G. D. et Larsen, S. T. (2008). "Polyhydroxylated C60 fullerene (fullerenol) attenuates neutrophilic lung inflammation in mice." Basic Clin Pharmacol Toxicol **103**(4): 386-388.
- Rouse, J. G., Yang, J., Ryman-Rasmussen, J. P., Barron, A. R. et Monteiro-Riviere, N. A. (2007). "Effects of mechanical flexion on the penetration of fullerene amino acid-derivatized peptide nanoparticles through skin." Nano Lett **7**(1): 155-160.
- Rubtsov, Y. P., Niec, R. E., Josefowicz, S., Li, L., Darce, J., Mathis, D., Benoist, C., *et al.* (2010). "Stability of the regulatory T cell lineage in vivo." Science **329**(5999): 1667-1671.
- Ruoff, R. S., Tse, D. S., Malhotra, R. et Lorents, D. C. (1993). "Solubility of fullerene (C60) in a variety of solvents." J. Phys. Chem. **97**: 3379-3383.
- Rutishauser, R. L., Martins, G. A., Kalachikov, S., Chandele, A., Parish, I. A., Meffre, E., Jacob, J., *et al.* (2009). "Transcriptional repressor Blimp-1 promotes CD8(+) T cell terminal differentiation and represses the acquisition of central memory T cell properties." Immunity **31**(2): 296-308.
- Ryan, J. J., Bateman, H. R., Stover, A., Gomez, G., Norton, S. K., Zhao, W., Schwartz, L. B., *et al.* (2007). "Fullerene nanomaterials inhibit the allergic response." J Immunol **179**(1): 665-672.
- Ryman-Rasmussen, J. P., Riviere, J. E. et Monteiro-Riviere, N. A. (2006). "Penetration of intact skin by quantum dots with diverse physicochemical properties." Toxicol Sci **91**(1): 159-165.
- Sadlack, B., Merz, H., Schorle, H., Schimpl, A., Feller, A. C. et Horak, I. (1993). "Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene." Cell **75**(2): 253-261.
- Sadowska, A. M., Verbraecken, J., Darquennes, K. et De Backer, W. A. (2006). "Role of N-acetylcysteine in the management of COPD." Int J Chron Obstruct Pulmon Dis **1**(4): 425-434.
- Sadrieh, N., Wokovich, A. M., Gopee, N. V., Zheng, J., Haines, D., Parmiter, D., Siitonen, P. H., *et al.* (2010). "Lack of significant dermal penetration of titanium dioxide from sunscreen formulations containing nano- and submicron-size TiO₂ particles." Toxicol Sci **115**(1): 156-166.
- Sahu, N., Mueller, C., Fischer, A. et August, A. (2008). "Differential sensitivity to Itk kinase signals for T helper 2 cytokine production and chemokine-mediated migration." J Immunol **180**(6): 3833-3838.
- Saito, Y. D., Jensen, A. R., Salgia, R. et Posadas, E. M. (2010). "Fyn: a novel molecular target in cancer." Cancer **116**(7): 1629-1637.
- Sakaguchi, S. (2004). "Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses." Annu Rev Immunol **22**: 531-562.

- Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T. et Ono, M. (2008). "Regulatory T cells and immune tolerance." Cell **133**(5): 775-787.
- Salem, Y., Shpungin, S., Pasder, O., Pomp, O., Taler, M., Malovani, H. et Nir, U. (2005). "Fer kinase sustains the activation level of ERK1/2 and increases the production of VEGF in hypoxic cells." Cell Signal **17**(3): 341-353.
- Samberg, M. E., Oldenburg, S. J. et Monteiro-Riviere, N. A. (2010). "Evaluation of silver nanoparticle toxicity in skin in vivo and keratinocytes in vitro." Environ Health Perspect **118**(3): 407-413.
- Sangrar, W., Gao, Y., Scott, M., Truesdell, P. et Greer, P. A. (2007). "Fer-mediated cortactin phosphorylation is associated with efficient fibroblast migration and is dependent on reactive oxygen species generation during integrin-mediated cell adhesion." Mol Cell Biol **27**(17): 6140-6152.
- Savic, R., Luo, L., Eisenberg, A. et Maysinger, D. (2003). "Micellar nanocontainers distribute to defined cytoplasmic organelles." Science **300**(5619): 615-618.
- Sayes, C. M., Fortner, J., Lyon, D., Boyd, A., Ausman, K., Tao, Y., Sitharaman, B., *et al.* (2004). "The differential cytotoxicity of water soluble fullerenes." Nano Letters **4**(10): 1881-1887.
- Sayes, C. M., Gobin, A. M., Ausman, K. D., Mendez, J., West, J. L. et Colvin, V. L. (2005). "Nano-C60 cytotoxicity is due to lipid peroxidation." Biomaterials **26**(36): 7587-7595.
- Sayes, C. M., Marchione, A. A., Reed, K. L. et Warheit, D. B. (2007). "Comparative pulmonary toxicity assessments of C60 water suspensions in rats: few differences in fullerene toxicity in vivo in contrast to in vitro profiles." Nano Lett **7**(8): 2399-2406.
- Sayes, C. M., Wahi, R., Kurian, P. A., Liu, Y., West, J. L., Ausman, K. D., Warheit, D. B., *et al.* (2006). "Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells." Toxicol Sci **92**(1): 174-185.
- Scheffold, A., Huhn, J. et Hofer, T. (2005). "Regulation of CD4+CD25+ regulatory T cell activity: it takes (IL-)two to tango." Eur J Immunol **35**(5): 1336-1341.
- Schins, R. P., McAlinden, A., MacNee, W., Jimenez, L. A., Ross, J. A., Guy, K., Faux, S. P., *et al.* (2000). "Persistent depletion of I kappa B alpha and interleukin-8 expression in human pulmonary epithelial cells exposed to quartz particles." Toxicol Appl Pharmacol **167**(2): 107-117.
- Schramm, L. L. (2008). "Dictionary of Nanotechnology, Colloid and Interface Science." John Wiley & Sons Ltd: page 308.
- Schreck, R., Rieber, P. et Baeuerle, P. A. (1991). "Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1." EMBO J **10**(8): 2247-2258.
- Schulz, J., Hohenberg, H., Pflucker, F., Gartner, E., Will, T., Pfeiffer, S., Wepf, R., *et al.* (2002). "Distribution of sunscreens on skin." Adv Drug Deliv Rev **54 Suppl 1**: S157-163.
- Sepelák, V., Steinikeb, U., Ueckerb, D.-C., Trettinc, R., Wißmannd, S. et Beckerd, K. D. (1997). "High-temperature reactivity of mechanosynthesized zinc ferrite." Solid State Ionics **101-103**(Part 2): 1343-1349.
- Setoguchi, R., Hori, S., Takahashi, T. et Sakaguchi, S. (2005). "Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization." J Exp Med **201**(5): 723-735.
- Sharfe, N., Freywald, A., Toro, A., Dadi, H. et Roifman, C. (2002). "Ephrin stimulation modulates T cell chemotaxis." Eur J Immunol **32**(12): 3745-3755.
- Sharfe, N., Nikolic, M., Cimpeon, L., Van De Kratts, A., Freywald, A. et Roifman, C. M. (2008). "EphA and ephrin-A proteins regulate integrin-mediated T lymphocyte interactions." Mol Immunol **45**(5): 1208-1220.

- Sharma, V., Shukla, R. K., Saxena, N., Parmar, D., Das, M. et Dhawan, A. (2009). "DNA damaging potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells." Toxicol Lett **185**(3): 211-218.
- Shen, C. C., Liang, H. J., Wang, C. C., Liao, M. H. et Jan, T. R. (2012). "Iron oxide nanoparticles suppressed T helper 1 cell-mediated immunity in a murine model of delayed-type hypersensitivity." Int J Nanomedicine **7**: 2729-2737.
- Shen, C. C., Wang, C. C., Liao, M. H. et Jan, T. R. (2011). "A single exposure to iron oxide nanoparticles attenuates antigen-specific antibody production and T-cell reactivity in ovalbumin-sensitized BALB/c mice." Int J Nanomedicine **6**: 1229-1235.
- Shi, Y., Wang, F., He, J., Yadav, S. et Wang, H. (2010). "Titanium dioxide nanoparticles cause apoptosis in BEAS-2B cells through the caspase 8/t-Bid-independent mitochondrial pathway." Toxicol Lett **196**(1): 21-27.
- Shin, H., Blackburn, S. D., Intlekofer, A. M., Kao, C., Angelosanto, J. M., Reiner, S. L. et Wherry, E. J. (2009). "A role for the transcriptional repressor Blimp-1 in CD8(+) T cell exhaustion during chronic viral infection." Immunity **31**(2): 309-320.
- Shin, S. H., Ye, M. K., Kim, H. S. et Kang, H. S. (2007). "The effects of nano-silver on the proliferation and cytokine expression by peripheral blood mononuclear cells." International Immunopharmacology **7**(13): 1813-1818.
- Sievers, S., Braun, K. F., Eberbeck, D., Gustafsson, S., Olsson, E., Schumacher, H. W. et Siegner, U. (2012). "Quantitative Measurement of the Magnetic Moment of Individual Magnetic Nanoparticles by Magnetic Force Microscopy." Small.
- Siglienti, I., Bendszus, M., Kleinschnitz, C. et Stoll, G. (2006). "Cytokine profile of iron-laden macrophages: implications for cellular magnetic resonance imaging." J Neuroimmunol **173**(1-2): 166-173.
- Singh, R., Pantarotto, D., Lacerda, L., Pastorin, G., Klumpp, C., Prato, M., Bianco, A., *et al.* (2006). "Tissue biodistribution and blood clearance rates of intravenously administered carbon nanotube radiotracers." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(9): 3357-3362.
- Singh, R. P. et Ramarao, P. (2012). "Cellular uptake, intracellular trafficking and cytotoxicity of silver nanoparticles." Toxicol Lett.
- Singh, S., Shi, T., Duffin, R., Albrecht, C., van Berlo, D., Hohr, D., Fubini, B., *et al.* (2007). "Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO₂: role of the specific surface area and of surface methylation of the particles." Toxicol Appl Pharmacol **222**(2): 141-151.
- Slawson, R. M., Lee, H. et Trevors, J. T. (1990). "Bacterial interactions with silver." Biol Met **3**(3-4): 151-154.
- Smith-Garvin, J. E., Koretzky, G. A. et Jordan, M. S. (2009). "T cell activation." Annu Rev Immunol **27**: 591-619.
- Smith, K. A. (1988). "Interleukin-2: inception, impact, and implications." Science **240**(4856): 1169-1176.
- Sohaebuddin, S. K., Thevenot, P. T., Baker, D., Eaton, J. W. et Tang, L. (2010). "Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent." Part Fibre Toxicol **7**: 22.
- Sojka, D. K., Bruniquel, D., Schwartz, R. H. et Singh, N. J. (2004). "IL-2 secretion by CD4+ T cells in vivo is rapid, transient, and influenced by TCR-specific competition." J Immunol **172**(10): 6136-6143.
- Song, W., Zhang, J., Guo, J., Ding, F., Li, L. et Sun, Z. (2010). "Role of the dissolved zinc ion and reactive oxygen species in cytotoxicity of ZnO nanoparticles." Toxicol Lett **199**(3): 389-397.
- Sonnichsen, C., Franzl, T., Wilk, T., von Plessen, G., Feldmann, J., Wilson, O. et Mulvaney, P. (2002). "Drastic reduction of plasmon damping in gold nanorods." Phys Rev Lett **88**(7): 077402.

- Soto, K. F., Carrasco, A., Powell, T. G., Garza, K. M. et Murr, L. E. (2005). "Comparative in vitro cytotoxicity assessment of some manufactured nanoparticulate materials characterized by transmission electron microscopy." J. Nanopart. Res. 7: 145-169.
- Sperling, R. A., Rivera Gil, P., Zhang, F., Zanella, M. et Parak, W. J. (2008). "Biological applications of gold nanoparticles." Chem Soc Rev 37(9): 1896-1908.
- Srinivas, A., Jaganmohan Rao, P., Selvam, G., Goparaju, A., Balakrishna Murthy, P. et Neelakanta Reddy, P. (2012). "Oxidative stress and inflammatory responses of rat following acute inhalation exposure to iron oxide nanoparticles." Hum Exp Toxicol.
- Stensberg, M. C., Wei, Q., McLamore, E. S., Porterfield, D. M., Wei, A. et Sepulveda, M. S. (2011). "Toxicological studies on silver nanoparticles: challenges and opportunities in assessment, monitoring and imaging." Nanomedicine (Lond) 6(5): 879-898.
- Strasser, A., Jost, P. J. et Nagata, S. (2009). "The many roles of FAS receptor signaling in the immune system." Immunity 30(2): 180-192.
- Sun, C., Lee, J. S. et Zhang, M. (2008). "Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery." Adv Drug Deliv Rev 60(11): 1252-1265.
- Sung, J. H., Ji, J. H., Park, J. D., Song, M. Y., Song, K. S., Ryu, H. R., Yoon, J. U., *et al.* (2011). "Subchronic inhalation toxicity of gold nanoparticles." Part Fibre Toxicol 8: 16.
- Sung, J. H., Ji, J. H., Park, J. D., Yoon, J. U., Kim, D. S., Jeon, K. S., Song, M. Y., *et al.* (2009). "Subchronic inhalation toxicity of silver nanoparticles." Toxicol Sci 108(2): 452-461.
- Suzuki, H., Toyooka, T. et Ibuki, Y. (2007). "Simple and easy method to evaluate uptake potential of nanoparticles in mammalian cells using a flow cytometric light scatter analysis." Environ Sci Technol 41(8): 3018-3024.
- Sydlik, U., Bierhals, K., Soufi, M., Abel, J., Schins, R. P. et Unfried, K. (2006). "Ultrafine carbon particles induce apoptosis and proliferation in rat lung epithelial cells via specific signaling pathways both using EGF-R." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 291(4): L725-733.
- Takenaka, S., Karg, E., Roth, C., Schulz, H., Ziesenis, A., Heinzmann, U., Schramel, P., *et al.* (2001). "Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats." Environ Health Perspect 109 Suppl 4: 547-551.
- Thevenot, P., Cho, J., Wavhal, D., Timmons, R. B. et Tang, L. (2008). "Surface chemistry influences cancer killing effect of TiO₂ nanoparticles." Nanomedicine 4(3): 226-236.
- Thibodeau, M., Giardina, C. et Hubbard, A. K. (2003). "Silica-induced caspase activation in mouse alveolar macrophages is dependent upon mitochondrial integrity and aspartic proteolysis." Toxicol Sci 76(1): 91-101.
- Tian, J., Wong, K. K., Ho, C. M., Lok, C. N., Yu, W. Y., Che, C. M., Chiu, J. F., *et al.* (2007). "Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing." ChemMedChem 2(1): 129-136.
- Tinkle, S. S., Antonini, J. M., Rich, B. A., Roberts, J. R., Salmen, R., DePree, K. et Adkins, E. J. (2003). "Skin as a route of exposure and sensitization in chronic beryllium disease." Environ Health Perspect 111(9): 1202-1208.
- Toll, R., Jacobi, U., Richter, H., Lademann, J., Schaefer, H. et Blume-Peytavi, U. (2004). "Penetration profile of microspheres in follicular targeting of terminal hair follicles." J Invest Dermatol 123(1): 168-176.
- Tomitaka, A., Hirukawa, A., Yamada, T., Morishita, S. et Takemura, Y. (2009). "Biocompatibility of various ferrite nanoparticles evaluated by in vitro cytotoxicity assays using HeLa cells." J. Magnetism Magnet. Mater. 321(10): 1482-1484.
- Tonks, N. K. (2005). "Redox redux: revisiting PTPs and the control of cell signaling." Cell 121(5): 667-670.
- Torres, M. et Forman, H. J. (2003). "Redox signaling and the MAP kinase pathways." Biofactors 17(1-4): 287-296.

- Triplett, T. A., Curti, B. D., Bonafede, P. R., Miller, W. L., Walker, E. B. et Weinberg, A. D. (2012). "Defining a functionally distinct subset of human memory CD4(+) T cells that are CD25(POS) and FOXP3(NEG)." Eur J Immunol **42**(7): 1893-1905.
- Trop, M. (2006). "Silver-coated dressing acticoat caused raised liver enzymes and argyria-like symptoms in burn patient." J Trauma **61**(4): 1024.
- Tsuji, J. S., Maynard, A. D., Howard, P. C., James, J. T., Lam, C. W., Warheit, D. B. et Santamaria, A. B. (2006). "Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part IV: risk assessment of nanoparticles." Toxicol Sci **89**(1): 42-50.
- Turrens, J. F. (2003). "Mitochondrial formation of reactive oxygen species." J Physiol **552**(Pt 2): 335-344.
- Underhill, D. M. et Goodridge, H. S. (2012). "Information processing during phagocytosis." Nat Rev Immunol **12**(7): 492-502.
- Unfried, K., Sydlik, U., Bierhals, K., Weissenberg, A. et Abel, J. (2008). "Carbon nanoparticle-induced lung epithelial cell proliferation is mediated by receptor-dependent Akt activation." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **294**(2): L358-367.
- Van de Voorde, K., Nijsten, T., Schelfhout, K., Moorkens, G. et Lambert, J. (2005). "Long-term use of silver containing nose-drops resulting in systemic argyria." Acta Clin Belg **60**(1): 33-35.
- Van Parijs, L., Biuckians, A., Ibragimov, A., Alt, F. W., Willerford, D. M. et Abbas, A. K. (1997). "Functional responses and apoptosis of CD25 (IL-2R alpha)-deficient T cells expressing a transgenic antigen receptor." J Immunol **158**(8): 3738-3745.
- Vang, T., Abrahamsen, H., Myklebust, S., Enserink, J., Prydz, H., Mustelin, T., Amarzguioui, M., *et al.* (2004). "Knockdown of C-terminal Src kinase by siRNA-mediated RNA interference augments T cell receptor signaling in mature T cells." Eur J Immunol **34**(8): 2191-2199.
- Vang, T., Liu, W. H., Delacroix, L., Wu, S., Vasile, S., Dahl, R., Yang, L., *et al.* (2012). "LYP inhibits T-cell activation when dissociated from CSK." Nat Chem Biol **8**(5): 437-446.
- Vivier, E., Ugolini, S., Blaise, D., Chabannon, C. et Brossay, L. (2012). "Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer." Nat Rev Immunol **12**(4): 239-252.
- Vogelzang, A., McGuire, H. M., Yu, D., Sprent, J., Mackay, C. R. et King, C. (2008). "A fundamental role for interleukin-21 in the generation of T follicular helper cells." Immunity **29**(1): 127-137.
- Wahajuddin et Arora, S. (2012). "Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: magnetic nanoplatforms as drug carriers." Int J Nanomedicine **7**: 3445-3471.
- Walker, E., Leemhuis, T. et Roeder, W. (1988). "Murine B lymphoma cell lines release functionally active interleukin 2 after stimulation with Staphylococcus aureus." J Immunol **140**(3): 859-865.
- Walker, N. J. et Bucher, J. R. (2009). "A 21st century paradigm for evaluating the health hazards of nanoscale materials?" Toxicol Sci **110**(2): 251-254.
- Walsh, P. T., Buckler, J. L., Zhang, J., Gelman, A. E., Dalton, N. M., Taylor, D. K., Bensinger, S. J., *et al.* (2006). "PTEN inhibits IL-2 receptor-mediated expansion of CD4+ CD25+ Tregs." J Clin Invest **116**(9): 2521-2531.
- Wamer, W. G., Yin, J. J. et Wei, R. R. (1997). "Oxidative damage to nucleic acids photosensitized by titanium dioxide." Free Radic Biol Med **23**(6): 851-858.
- Wang, J., Chen, B., Jin, N., Xia, G., Chen, Y., Zhou, Y., Cai, X., *et al.* (2011). "The changes of T lymphocytes and cytokines in ICR mice fed with Fe₃O₄ magnetic nanoparticles." Int J Nanomedicine **6**: 605-610.
- Wang, J., Chen, Y., Chen, B., Ding, J., Xia, G., Gao, C., Cheng, J., *et al.* (2010). "Pharmacokinetic parameters and tissue distribution of magnetic Fe₃O₄ nanoparticles in mice." Int J Nanomedicine **5**: 861-866.
- Warheit, D. B. (2008). "How meaningful are the results of nanotoxicity studies in the absence of adequate material characterization?" Toxicol Sci **101**(2): 183-185.

- Weaver, C. T., Hatton, R. D., Mangan, P. R. et Harrington, L. E. (2007). "IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages." Annu Rev Immunol **25**: 821-852.
- Weiner, H. L. (2001). "Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells." Immunol Rev **182**: 207-214.
- Wesselkamper, S. C., Chen, L. C. et Gordon, T. (2001). "Development of pulmonary tolerance in mice exposed to zinc oxide fumes." Toxicol Sci **60**(1): 144-151.
- Wijnhoven, S. W. P., Dekkers, S., Hagens, W. I. et de Jong, W. H. (2009). "Exposure to nanomaterials in consumer products." Letter Report 340370001.
- Willard, M. A., Kurihara, L. K., Carpenter, E. E., Calvin, S. et Harris, V. G. (2004). "Chemically prepared magnetic nanoparticles." International Materials Reviews **49**(3-4): 125-170.
- Willerford, D. M., Chen, J., Ferry, J. A., Davidson, L., Ma, A. et Alt, F. W. (1995). "Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment." Immunity **3**(4): 521-530.
- Williams, M. A., Tyznik, A. J. et Bevan, M. J. (2006). "Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells." Nature **441**(7095): 890-893.
- Witte, M. B. et Barbul, A. (1997). "General principles of wound healing." Surg Clin North Am **77**(3): 509-528.
- Wong, K. K., Cheung, S. O., Huang, L., Niu, J., Tao, C., Ho, C. M., Che, C. M., *et al.* (2009). "Further evidence of the anti-inflammatory effects of silver nanoparticles." ChemMedChem **4**(7): 1129-1135.
- Wong, S. et Witte, O. N. (2004). "The BCR-ABL story: bench to bedside and back." Annu Rev Immunol **22**: 247-306.
- Wu, Y., Borde, M., Heissmeyer, V., Feuerer, M., Lapan, A. D., Stroud, J. C., Bates, D. L., *et al.* (2006). "FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT." Cell **126**(2): 375-387.
- Xia, J., Zhang, S., Zhang, Y., Ma, M., Xu, K., Tang, M. et Gu, N. (2008a). "The relationship between internalization of magnetic nanoparticles and changes of cellular optical scatter signal." J Nanosci Nanotechnol **8**(12): 6310-6315.
- Xia, T., Kovoichich, M., Liong, M., Madler, L., Gilbert, B., Shi, H., Yeh, J. I., *et al.* (2008b). "Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties." ACS Nano **2**(10): 2121-2134.
- Xia, X. R., Monteiro-Riviere, N. A. et Riviere, J. E. (2010). "Skin penetration and kinetics of pristine fullerenes (C60) topically exposed in industrial organic solvents." Toxicol Appl Pharmacol **242**(1): 29-37.
- Xiao, G. G., Wang, M., Li, N., Loo, J. A. et Nel, A. E. (2003). "Use of proteomics to demonstrate a hierarchical oxidative stress response to diesel exhaust particle chemicals in a macrophage cell line." J Biol Chem **278**(50): 50781-50790.
- Xiao, L., Takada, H., Gan, X. et Miwa, N. (2006). "The water-soluble fullerene derivative "Radical Sponge" exerts cytoprotective action against UVA irradiation but not visible-light-catalyzed cytotoxicity in human skin keratinocytes." Bioorg Med Chem Lett **16**(6): 1590-1595.
- Yamago, S., Tokuyama, H., Nakamura, E., Kikuchi, K., Kananishi, S., Sueki, K., Nakahara, H., *et al.* (1995). "In vivo biological behavior of a water-miscible fullerene: ¹⁴C labeling, absorption, distribution, excretion and acute toxicity." Chem Biol **2**(6): 385-389.
- Yamane, H. et Paul, W. E. (2012). "Cytokines of the gamma(c) family control CD4+ T cell differentiation and function." Nat Immunol **13**(11): 1037-1044.
- Yamashita, K., Sakai, M., Takemoto, N., Tsukimoto, M., Uchida, K., Yajima, H., Oshio, S., *et al.* (2009). "Attenuation of delayed-type hypersensitivity by fullerene treatment." Toxicology **261**(1-2): 19-24.

- Yang, H., Liu, C., Yang, D., Zhang, H. et Xi, Z. (2009). "Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition." J Appl Toxicol **29**(1): 69-78.
- Yang, X. P., Ghoreschi, K., Steward-Tharp, S. M., Rodriguez-Canales, J., Zhu, J., Grainger, J. R., Hirahara, K., *et al.* (2011). "Opposing regulation of the locus encoding IL-17 through direct, reciprocal actions of STAT3 and STAT5." Nat Immunol **12**(3): 247-254.
- Yeh, C. H., Hsiao, J. K., Wang, J. L. et Sheu, F. (2010). "Immunological impact of magnetic nanoparticles (Ferucarbotran) on murine peritoneal macrophages." J Nanopart Res. **12**(1): 151-160.
- Yen, H. J., Hsu, S. H. et Tsai, C. L. (2009). "Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes." Small **5**(13): 1553-1561.
- Yim, E. K., Peng, G., Dai, H., Hu, R., Li, K., Lu, Y., Mills, G. B., *et al.* (2009). "Rak functions as a tumor suppressor by regulating PTEN protein stability and function." Cancer Cell **15**(4): 304-314.
- Yin, J. J., Lao, F., Fu, P. P., Wamer, W. G., Zhao, Y., Wang, P. C., Qiu, Y., *et al.* (2009). "The scavenging of reactive oxygen species and the potential for cell protection by functionalized fullerene materials." Biomaterials **30**(4): 611-621.
- You, C., Han, C., Wang, X., Zheng, Y., Li, Q., Hu, X. et Sun, H. (2012). "The progress of silver nanoparticles in the antibacterial mechanism, clinical application and cytotoxicity." Mol Biol Rep.
- Yu, G., Mao, J., Wu, Y., Luo, H. et Wu, J. (2006). "Ephrin-B1 is critical in T-cell development." J Biol Chem **281**(15): 10222-10229.
- Zhai, H. J., Sun, D. W. et Wang, H. S. (2006). "Catalytic properties of silica/silver nanocomposites." J Nanosci Nanotechnol **6**(7): 1968-1972.
- Zhang, Y., Crittenden, J. C., Hand, D. W. et Perram, D. L. (1994). "Fixed-bed photocatalysts for solar decontamination of water." Environ Sci Technol **28**(3): 435-442.
- Zhou, X., Hua, L., Zhang, W., Zhu, M., Shi, Q., Li, F., Zhang, L., *et al.* (2012). "FRK controls migration and invasion of human glioma cells by regulating JNK/c-Jun signaling." J Neurooncol **110**(1): 9-19.
- Zhu, J. et Paul, W. E. (2010). "Heterogeneity and plasticity of T helper cells." Cell Res **20**(1): 4-12.
- Zhu, J., Yamane, H. et Paul, W. E. (2010). "Differentiation of effector CD4 T cell populations (*)." Annu Rev Immunol **28**: 445-489.
- Zimmer, A. T. et Maynard, A. D. (2002). "Investigation of the aerosols produced by a high-speed, hand-held grinder using various substrates." Ann Occup Hyg **46**(8): 663-672.
- Zucker, R. M., Massaro, E. J., Sanders, K. M., Degn, L. L. et Boyes, W. K. (2010). "Detection of TiO₂ nanoparticles in cells by flow cytometry." Cytometry A **77**(7): 677-685.