Université du Québec INRS-Institut Armand-Frappier

RÔLE DES NANOPARTICULES D'ARGENT SUR LES FONCTIONS BIOLOGIQUES DES NEUTROPHILES HUMAINS

Par

Michelle Poirier

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

JURY D'ÉVALUATION

Président du jury et examinateur interne

Examinateur externe

Directeur de recherche

M. Jacques Bernier, PhD INRS-Institut Armand-Frappier

M. Martin Pelletier, PhD Université Laval

M. Denis Girard, PhD INRS-Institut Armand-Frappier

© Droits réservés de Michelle Poirier, 2014

Remerciements

Je tiens premièrement à remercier mon directeur de recherche, Denis Girard, qui a été d'un grand soutien tout au long de ma maîtrise, qui m'a guidée et encouragée pendant les deux dernières années. Je souhaite aussi remercier mes collègues de laboratoires : Valérie, Kim, Jean-Christophe, Francis V., Isabelle, Claudie, David, Rafael S., Rafael de Liz et spécialement Francis A. pour avoir partagé avec moi leurs conseils et leur expérience. Je voudrais aussi souligner l'apport amical des étudiants des autres laboratoires tout spécialement : Debbie, Gabe, Élyse, Nathasha et Mélanie.

Je tiens aussi à remercier mes parents, Charles et Clémence de m'avoir enseigné la discipline, la persévérance et l'organisation. Ces qualités m'ont été utiles tout au long de ma maîtrise. Je souhaite aussi remercier et souligner l'apport de lan qui m'a permis de continuer dans mes projets.

Liste des abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
Ag+	ions d'argent
AgNP	nanoparticules d'argent
AI	aluminium
AI_2O_3	oxyde d'aluminium
ATO	trioxyde d'arsenic
Au	or
Са	carbone
СВ	carbone noir
CD	« cluster of differentiation »
CeO ₂	dioxyde de cérium
CHX	cycloheximide
DAPI	4',6'-diamidino-2-phénylindole (agent intercalant de l'adénine/thymine)
DLS	diffusion dynamique de la lumière
DMEM	« Dulbecco's modified Eagle's medium » (milieu de culture)
FADD	« Fas-associated death domain »
FasL	« Fas ligand »
G-CSF	« granulocyte colony-stimulating factor »
GM-CSF	« granulocyte macrophage colony-stimulating factor »
HBSS	« Hank's Balanced Salt Solution »
IL	interleukine
JNK	« c-Jun N-terminal kinase »
LED	lupus érythémateux disséminé
MIP	« macrophage inflammatory protein »
MMP-9	métalloprotéinase matricielle 9
МО	moëlle osseuse
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NF-κB	« nuclear factor-kappa B »
NP	nanoparticule(s)
OLFM4	« olfactomedin 4 »

PCNA	« proliferating cell nuclear antigen »
PMN	neutrophile(s) polymorphonucléaire(s)
RA	l'arthrite rhumatoïde
ROS	« reactive oxygen species » (dérivé réactif de l'oxygène)
RPMI-1640	« Roswell Park memorial Institute medium » (milieu de culture)
SI	système immunitaire
Si	silice
SiO ₂	dioxyde de silicium
TiO ₂	dioxyde de titane
TNF	facteur de nécrose tumorale
TNFR	récepteur de facteur de nécrose tumorale
TRAIL	« tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand »
VAA-I	« Viscum album agglutinin-I »
ZnO	oxyde de zinc

Liste des figures et tableaux

Liste des figures

Figure 1 : Comportement des nanoparticules selon le potentiel zêta page 9
Figure 2: Sources d'exposition aux nanoparticules d'argent et leurs effets toxiques connus page 20
Figure 3 : L'importance de l'équilibre de la population de neutrophiles page 26
Figure 4 : Pourcentage de cellules apoptotiques après une exposition de 12 heures à 10µg/mL et 100µg/mL de nanoparticules d'argent page 68
Figure F. Deursentere de cellules enertetiques selen la miliou (UDSS versus DDM) eves

Figure 5 : Pourcentage de cellules apoptotiques selon le milieu (HBSS versus RPMI avec sérum autologue décomplémenté) lors d'une exposition de 20 heures à une concentration de 100µg/mL de nanoparticules d'argent page 69

Figure 6 : (A) Concentration d'IL-8 libérée par les neutrophiles après une exposition de 20 heures à 10µg/mL et à 100µg/mL de nanopartiocules d'argent, (B) Influence de la concentration d'IL-8 sur la modulation de l'apoptose des neutrophiles...... page 70

Liste des tableaux

Tableau consomm	I: atior	Utilisation	des	différentes	nanoparticules	dans	les	produits	et	biens	de 13
Tableau I dans les d	II:L différ	Itilisation de ents secteu	es nan Irs	oparticules o	d'argent dans les	s produ	its et	biens de	con	sommat page	tion 916

Tableau III : Effets des nanoparticules d'argent sur les cellules de mammifères page 23

Sommaire

nanoparticules (NP) d'argent (Ag) sont connues Les pour leurs caractéristiques antimicrobiennes. Elles permettent de modifier certaines caractéristiques des produits et sont utilisées dans plusieurs secteurs (alimentaire, domestique, cosmétique, hospitalier, etc.). Les voies d'expositions sont nombreuses et variées ce qui permet aux nanoparticules d'argent (AgNP) d'être absorbées, de rejoindre la circulation sanguine et d'être distribuées dans le corps. Elles pourront alors interagir avec les cellules et les organes pour y induire des changements physiologiques. Parmi les cibles potentielles, il y a les neutrophiles polymorphonucléaires (PMN), des cellules du système immunitaire inné. Ils sont la première ligne de défense de l'organisme et possèdent d'importantes fonctions qui leur permettent de détruire les pathogènes. Les PMN appartiennent à la lignée myéloïde et ne se divisent pas. Ils migrent quotidiennement de la moelle osseuse (MO) à la circulation sanguine et meurent par apoptose; assurant ainsi le taux équilibré et constant qui est nécessaire au maintien de l'homéostasie du corps. Grâce à leur petit diamètre, les AgNP peuvent être internalisées par les PMN induisant des changements physiologiques qui affectent leurs fonctions. Malheureusement, nous connaissons encore mal les mécanismes et les interactions dictés par les NP sur les PMN. Peu d'études ont été réalisées pour déterminer les effets des AgNP sur les PMN. Ce mémoire démontre que les AgNP n'endommagent pas la membrane des PMN humains mais qu'elles induisent l'apoptose de ceux-ci de manière significative dès douze heures. Aussi, les AgNP sont internalisées par les PMN après un temps très court (1minute) et entraînent plusieurs changements physiologiques dont une augmentation du volume et de la complexité interne après une exposition de trente minutes ainsi que la libération d'interleukine (IL) -8 et l'inhibition de la synthèse protéique à vingt heures. Les résultats de nos travaux viennent s'ajouter aux connaissances que l'on possède déjà sur les NP. Cependant, plus d'études doivent être faites dans le but de connaître les effets biologiques de ceux-ci.

Étudiant

Directeur de recherche

Table des matières

REMERCIEMENTS	II
LISTE DES ABRÉVIATIONS	III
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	v
SOMMAIRE	VI
TABLE DES MATIÈRES	VII
INTRODUCTION	1
SECTION 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE	3
CHAPITRE 1: LES NANOPARTICULES	4
1.1 LEUR COMPOSITION : NOYAU ET RECOUVREMENT	4
1.2 LA CORONA	5
1.4 LA CARACTÉRISATION DES NANOPARTICULES	
1.5 L'IMPORTANCE DU SÉRUM DANS LA CARACTÉRISATION DES NANOPARTICULES	8
1.6 LE POTENTIEL ZÊTA ET LE COMPORTEMENT DES NANOPARTICULES	9
1.7 LA REGLEMENTATION ET LES USAGES DES NANOPARTICULES	10
2 1 TOXICOCINÉTIQUE DES NANOPARTICULES	1 7
2.3 EFFETS DES NANOPARTICULES D'ARGENT	
CHAPITRE 3 : LE NEUTROPHILE ET LE SYSTÈME IMMUNITAIRE	24
3.1 L'ÉQUILIBRE DES NEUTROPHILES	
3.2 MEDIATEUR DE L'INFLAMMATION	
3.4 INFLAMMATION CHRONIQUE	
3.5 LES DIFFÉRENTS ÉTATS DU NEUTROPHILE	
3.6 PHYSIOLOGIE ET FONCTIONS DU NEUTROPHILE DANS UN CONTEXTE INFLAMMATOIRE 3.6.1 La production de cytokines	
3.6.2 La flambée oxydative et la création de réactifs oxygénés	
3.6.3 La dégranulation	
3.6.4 Les trappes extracellulaires (NETs)	
3.6.6 L'apoptose	
SECTION 2 : ARTICLE	37
TITRE ORIGINAL DE L'ARTICLE	
RÉSUMÉ DE L'ARTICLE EN FRANÇAIS	39
CONTRIBUTION DES AUTEURS DE L'ARTICLE	40
TEXTE ORIGINAL DE L'ARTICLE	41
DISCUSSION ET CONCLUSION	59
ANNEXE	67
LISTE DE RÉFÉRENCES	71

Introduction

Les NP sont des particules inférieures à 100nm dans les trois dimensions : largeur, longueur et hauteur. Elles sont composées d'un ou de plusieurs métaux et peuvent être recouvertes d'une enveloppe. Les NP améliorent ou modifient les propriétés des matériaux. C'est pourquoi elles sont intégrées dans plusieurs biens de consommation et que leurs usages augmentent à chaque année. Étant donné leur petit diamètre, les NP peuvent interagir avec les cellules, dont les PMN et moduler certaines de leurs fonctions. Les PMN sont des cellules du système immunitaire inné. Chez l'homme, ils sont les leucocytes les plus abondants de la circulation sanguine et jouent un rôle majeur dans la réponse immunitaire comme principal médiateur de l'inflammation. Ces cellules différenciées, qui ne se divisent pas, migrent quotidiennement de leur lieu de maturation la MO. Le renouvellement de la population de PMN se fait grâce à cette migration continue et le taux est maintenu constant grâce à leur apoptose. L'apoptose est une mort cellulaire saine et sans conséquences inflammatoires ou néfastes. Ce type de mort revêt donc une importance particulière et doit être hautement régulée.

Sachant que certaines NP peuvent retarder l'apoptose des PMN et induire des effets inflammatoires, **nous émettons l'hypothèse que les AgNP peuvent induire des changements physiologiques et altérer l'apoptose des PMN humains.** Nous avons deux objectifs principaux auxquels nous tenterons de répondre. Le premier est de déterminer si les AgNP peuvent altérer le taux d'apoptose des PMN humains. Le deuxième objectif est d'identifier si ces AgNP induisent d'autres changements physiologiques chez ces derniers. Pour ce faire, nous avons observé les effets de différentes concentrations variant entre 10µg/mL à 100µg/mL. Les AgNP utilisées ont un diamètre de 20 nm, sont composées d'un noyau d'argent et recouvertes de citrate. Aussi, elles sont conservées dans un tampon citrate à concentration de 2mM et à un pH de 7.4.

Ce mémoire comporte deux sections. La première section est composée de trois chapitres dont le premier est une revue de littérature qui porte sur les NP, le deuxième présente leurs effets toxicologiques et le troisième porte sur les rôles et fonctions des PMN. La deuxième section du mémoire contient l'article présentant les résultats des effets observés des AgNP sur les PMN. Finalement, la discussion présente la valeur et la place occupée par les résultats obtenus lors de la maîtrise. Ces connaissances viennent s'ajouter à celles que l'on a déjà sur les impacts

1

biologiques des NP et s'inscrivent dans la perspective d'une classification des effets nocifs ou de l'innocuité des NP sur la santé.

SECTION 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE

CHAPITRE 1: Les nanoparticules

Les NP sont des particules ultra-fines qui peuvent être composées d'un ou de différents métaux. Elles peuvent être synthétisées ou, telles des particules volcaniques, être le fruit d'un processus naturel (Buzea *et al.*, 2007). Les NP possèdent des caractéristiques particulières dues à leur composition et à leur rapport surface/volume (Kholoud M.M. Abou El-Nour, 2008). En effet, elles peuvent être photostables, antimicrobiennes, conductrices, émulsifiantes, épaissisantes, etc. L'addition des NP aux biens de consommation modifiera donc les caractéristiques des produits. Pour cette raison, on les retrouve dans plusieurs produits issus de différents secteurs (alimentaire, textile, industriel, hospitalier, cosmétiques, etc.) (Ahamed *et al.*, 2010, Chatterjee *et al.*, 2014, Murdock *et al.*, 2008). Puisque l'usage des NP est en progression constante, on constate que leur empreinte environnementale augmente elle aussi (Roy *et al.*, 2014, Suresh *et al.*, 2012)

1.1 Leur composition : noyau et recouvrement

Les NP possèdent un noyau ou un coeur actif composé d'un seul ou d'un alliage de plusieurs métaux. On verra souvent l'utilisation d'argent (Ag), d'or (Au), de silice (Si), de carbone (C), de titane (Ti) ou d'oxyde de zinc (ZnO). Les NP ont des propriétés différentes les unes des autres et la constitution du noyau a une influence sur ses propriétés. Par exemple, il a été observé que des AgNP possèderont des caractéristiques antivirales (Mohammed Fayaz et al., 2012, Speshock et al., 2010) alors que des NP de ZnO seront photostables (Beasley et al., 2010). La composition du novau peut aussi déterminer le niveau de toxicité des NP. Ainsi, on sait que les NP de ZnO seront plus cytotoxiques que les NP formées avec d'autres oxydes ou encore avec du carbone (Hsiao et al., 2013). Toutefois, la composition du noyau détermine seulement en partie les propriétés de la NP. En effet, certaines d'entre elles peuvent être recouvertes d'une enveloppe et d'autres non. Cette enveloppe peut être un polymère composé de polyvinyle, de pyrrolidone, de polyvinylpyrrolidone, de polysaccharide ou tout simplement d'un alliage de métaux (Kholoud M.M. Abou El-Nour, 2008). Ce recouvrement stabilise la NP tout en lui attribuant des avantages qu'elle n'aurait pas autrement. Ainsi, il a été noté qu'un recouvrement d'argent conférait aux NP des caractéristiques bactéricides (Devi et al., 2014) et qu'une enveloppe de TiO₂ offrait un effet protecteur aux cellules de mammifère (Hsiao et al., 2013). Il a aussi été remarqué, dans le cas des AgNP combinées à un antibiotique, que le recouvrement de polyvinylpyrrolidone permet une meilleure activitée antibactérienne que celui de citrate ou de dodécylsulfate de sodium (Kora *et al.*, 2013). Celui-ci peut aussi être utilisé dans un but précis. En effet, celui-ci peut être associé à des médicaments, des anticorps ou à des groupements fonctionnels, permettant la liaison à des récepteurs cellulaires pour du marquage ciblé (Monopoli *et al.*, 2012). De plus, dépendamment de sa composition, l'enveloppe peut diminuer ou augmenter les effets biologiques des interactions avec les cellules (Chatterjee *et al.*, 2014, Mailander *et al.*, 2009) Les matériaux qui sont utilisés tant pour la composition du noyau que pour le recouvrement sont donc choisis dans le but de conférer des caractéristiques spécifiques aux NP. Bref, ces propriétés sont dictées par l'ensemble de ses caractéristiques.

1.2 La corona

On définit la corona comme la couronne de protéines qui entoure la NP. Ces protéines s'y sont associées grâce aux forces fondamentales : les interactions électrostatiques, les ponts hydrogènes, les interactions hydrophobes, etc. et y sont demeurées liées grâce à l'instabilité de celle-ci (Pearson et al., 2014). En effet, en créant la couronne, les protéines stabilisent la NP. II a été publié que la stabilité des NP de TiO₂ est corrélée à l'ajout des protéines (dans le cas présenté, il s'agissait de celles présentes dans le sérum de veau fœtal) (Allouni et al., 2009). La présence de cette corona, créée à partir des protéines, change le potentiel zêta initial de la NP (Hsiao et al., 2013, Monopoli et al., 2012). Le potentiel zêta peut être défini comme la charge électrique que possède une NP. Ces protéines auraient comme rôle de bâtir l'identité biologique de la NP (Albanese et al., 2014, Monopoli et al., 2012). De plus, la corona est composée de deux parties. La première partie se nomme «corona primaire», elle se retrouve en périphérie et est en contact direct avec la NP. Elle est composée d'une monocouche de biomolécules associées fortement à celle-ci, mais pas de manière irréversible. La deuxième partie est la «corona superficielle» et est située au-dessus de la première. Interagissant avec les récepteurs cellulaires et également composée des protéines présentes dans le milieu, elle est aussi composée de biomolécules, mais dont les associations seraient plus faibles (Monopoli et al., 2012). La corona primaire est relativement stable, mais si la NP est en contact avec de nouvelles biomolécules qui viennent se joindre à la corona superficielle, celles-ci pourront les remplacer. Il y aura ainsi certains échanges protéiques entre la corona primaire et superficielle. La couronne sera donc appelée à changer et à évoluer dépendamment du nouvel environnement. Cela ajoute une problématique puisque deux NP de même nature peuvent avoir des couronnes différentes et donc des interactions différentes avec les cellules dépendamment du milieu dans lequel elles auront été en contexte (Monopoli et al., 2012). Il y a ainsi deux

5

variables qui dictent la composition de la corona; la première est la composition même de la NP qui détermine son potentiel zêta initial et la deuxième constitue les protéines environnementales qu'elle a rencontrées. Cette corona, qui influence la stabilité de la NP, détermine aussi ses comportements tels que la distribution, la sédimentation et l'agglomération. Ceux-ci influencent grandement les interactions entre les cellules et les NP. La corona ne possède pas un rôle négligeable (Albanese *et al.*, 2014).

La corona peut aussi avoir un effet protecteur. En effet, il a été observé que sa présence pouvait diminuer la toxicité et l'internalisation des NP par les cellules (Monopoli *et al.*, 2012). Par exemple, Hsiao a démontré que la toxicité des NP de ZnO diminue lorsque celle-ci est en présence de 5 ou 10% de sérum de veau fœtal. Il en résulte que la toxicité de celle-ci est à son plus fort lorsqu'elle est exposée à un environnement sans sérum (Hsiao *et al.*, 2013). Il a été proposé que des protéines présentes dans celui-ci, telles que l'albumine, enroberaient la NP et la stabiliseraient tout en diminuant la quantité d'ions libérés. La corona offrirait donc une protection au même titre que le recouvrement dont il a été mention plus haut. On croit aussi que l'effet protecteur de la corona agirait sur plusieurs facteurs tels qu'un faible ratio nanoparticules/cellule, une répartition homogène des NP, un faible taux de sédimentation et d'agglomération. Toutefois, des résultats contradictoires ont été publiés, notamment dans le cas des NP d'aluminium (Al et Al_2O_3) où l'addition de sérum induit des agrégats (Murdock *et al.*, 2008).

1.3 Synthèse des nanoparticules

Plusieurs méthodes sont utilisées pour synthétiser les NP incluant des méthodes biochimiques, électrochimiques et photocatalytiques. Ces méthodes conventionnelles sont coûteuses et produisent souvent des rejets toxiques pour la biodiversité (Poulose *et al.*, 2014). On peut séparer les méthodes de synthèse des NP métalliques en deux groupes. Le premier regroupe les approches « physiques » et utilise des méthodes telles que la condensation, l'évaporation et l'ablation au laser. Pour sa part, le deuxième groupe inclut plutôt les méthodes dites « chimiques », par exemple, par la réduction d'une solution contenant des ions métalliques formant ainsi des agrégats ou des petites granules (Kholoud M.M. Abou El-Nour, 2008). Lors de la réduction par les agents réducteurs, il peut y avoir une production de déchets toxiques. L'industrie est ainsi incitée à développer des méthodes plus performantes, moins polluantes et moins toxiques permettant la synthèse des NP. On a donc vu apparaître, au cours des dernières années, le développement de nouvelles méthodes de synthèse. Il est ainsi possible de synthétiser différentes NP métalliques à partir des bactéries, levures, champignons et même de certains virus (Narayanan *et al.*, 2010). Il s'agit en fait d'une réduction rendue possible grâce à l'action des enzymes réductases et des quinones que possèdent certains micro-organismes, dont le champignon *Fusarium oxyporum* dans le cas de la synthèse des AgNP (Duran *et al.*, 2005). Aussi, il semble que les NP synthétisées de cette manière gardent leurs propriétés (Ishida *et al.*, 2014, Sanjenbam *et al.*, 2014, R. Singh *et al.*, 2013). Les plantes peuvent aussi être utilisées comme méthode de synthèse puisque la réduction est effectuée à l'aide d'agents réducteurs naturels tels que les polysaccharides ou d'autres extraits végétaux. En effet, il a déjà été observé que les plantes ont la capacité de produire des NP à partir de sels de métaux (Husen *et al.*, 2014).

1.4 La caractérisation des nanoparticules

Plusieurs méthodes sont utilisées pour caractériser les NP. Il est grandement recommandé d'utiliser plus d'une technique à la fois pour établir ces mesures. Celles-ci permettent de déterminer les différents paramètres des NP dont le diamètre, la forme, l'aire de surface, le potentiel zêta et parfois le poids moléculaire, la cristallinité, la dimension fractale, la grosseur des pores, etc. Les principales méthodes utilisées sont la microscopie électronique à transmission (MET) ou à balayage et les techniques de la diffusion dynamique, statique et électrophorétique de la lumière, la spectrométrie photoélectronique X, etc. (Dos Santos et al., 2014, Kholoud M.M. Abou El-Nour, 2008). Certains appareils combinent ces techniques pour mesurer plusieurs paramètres. Ainsi, le potentiel zêta est mesuré grâce un procédé d'électrophorèse et le poids moléculaire par la diffusion statique de la lumière. Pour sa part, le diamètre ou la taille des NP sont mesurés grâce à la diffusion dynamique de la lumière (DLS). Cette donnée peut être indicatrice de la présence ou non d'agrégats. En effet, on peut extrapoler leur présence en comparant le résultat obtenu avec le diamètre initial de la NP observée. Si les NP sont en suspension, il est parfois possible d'en déterminer la distribution, c'est-à-dire si celle-ci est monodisperse (la distribution comporte une majorité de NP possèdant la même taille) ou polydisperse (la distribution est composée de NP de tailles différentes). Plusieurs auteurs ont soulevé des inquiétudes concernant la manière de faire lors de la caractérisation des NP. D'une part, il y a un manque de conformité lors de la prise des paramètres. En effet, ceux-ci varient selon les conditions utilisées lors de la lecture. Il doit donc y avoir un consensus au niveau de celles-ci puisque le type de milieu, le pH ainsi que la

température du milieu peuvent affecter les résultats d'une même NP. Il serait donc important que la caractérisation des NP soit faite de manière uniforme (Beer *et al.*, 2012). D'autre part, il peut y avoir une incohérence entre le milieu utilisé lors de la caractérisation et celui utilisé lors des expériences. Par exemple, certains auteurs vont caractériser leur NP et effectueront leurs expériences dans des milieux différents.

1.5 L'importance du sérum dans la caractérisation des nanoparticules

Tel que mentionné précédemment, il a été observé que le sérum, utilisé principalement comme supplément lors de la culture cellulaire, peut stabiliser les NP, limiter les interactions avec les cellules et contribue à la formation de la corona (Hsiao et al., 2013). Puisque cette corona est l'identité de la NP (Albanese et al., 2014), il est d'autant plus important d'observer leur comportement dans un milieu comportant du sérum si on veut avoir des résultats représentatifs de ses interactions dans un système biologique (Devi et al., 2014, Hsiao et al., 2013). En effet, dans des conditions in vitro, les protéines contenues dans le sérum sont responsables de la totalité de la corona qui représente la nouvelle identité de la NP. Seulement quelques dizaines des 3 700 protéines contenues dans le sérum humain ont été retrouvées dans les coronas primaires des différentes NP. Contre toute attente, il ne s'agira pas nécessairement des plus abondantes ni de celles qui possèdent la plus forte affinité avec la NP. Les raisons expliquant pourquoi certaines protéines sont choisies au détriment des autres sont malheureusement inconnues (Monopoli et al., 2012). Cependant, il a été avancé que ces associations NP/protéines dépendent des acides aminés composant ces dernières. En effet, il a été observé que les protéines riches en résidus de tryptophane, de tyrosine et de phénylalanine et comportant plusieurs résidus aromatiques semblaient induire des associations plus rapidement et plus facilement. Il est proposé que ceci serait dû aux interactions hydrophobes (Ge et al., 2011). Il est donc important, autant que possible, d'ajouter du sérum lors des manipulations in vitro puisque cela affecte grandement l'identité de la NP. En effet, cela permettra une meilleure représentation des effets dans un système biologique.

1.6 Le potentiel zêta et le comportement des nanoparticules

On a définit précédement le potentiel zêta comme étant la charge électrique que possède une NP. De par sa composition, celle-ci possède un potentiel zêta qui lui est propre (Kathe *et al.*, 2014). Ce dernier est une indication de la stabilité de la NP et de son comportement. Plus celuici est élevé, qu'il soit positif ou négatif, plus la NP aura un comportement stable. À l'inverse, si celui-ci est faible, donc près de zéro, la NP adoptera un comportement instable (Devi *et al.*, 2014) (voir figure 1).



Figure 1 : Comportement des nanoparticules selon le potentiel zêta¹

Le comportement des NP est plus instable lorsque le potentiel zêta est situé en dessous de +30mV et au-dessus de -30mV. Lorsque celui-ci est au-dessous de -30mV et en dessus de +30mV, le comportement des NP est plus stable et celles-ci n'auront pas tendance à sédimenter ni à s'agglomérer.

Cette instabilité se définit par des forces et des interactions qui induisent l'association de la NP avec des protéines. Il a aussi été suggéré que ces associations sont médiées par des forces physiques communes (Liu *et al.*, 2015). Fait à noter, il a été observé que le milieu dans lequel se trouve la NP influence grandement cette charge électrique et que le sérum y joue pour beaucoup dans le sens où celui-ci stabilise la NP (Monopoli *et al.*, 2012). Puisque le comportement des NP est dépendant du contexte et que celui-ci affecte directement les changements physiologiques induits aux cellules, il est important d'introduire les deux principaux comportements adoptés par les NP : soit l'agglomération et la sédimentation. Ces deux comportements sont différents, mais il faut comprendre que l'agglomération des NP peut induire la sédimentation et qu'ils semblent être la résultante d'une même cause commune, c'est-à-dire

d'un potentiel zêta près de zéro. Ainsi, il a été observé par l'équipe de Hsiao que les NP de ZnO auront tendance à s'agglomérer et à sédimenter si le milieu (DMEM) est exempt de sérum car l'ajout de sérum de veau fœtal diminue cette tendance (Hsiao *et al.*, 2013). On retrouve des résultats similaires pour les NP d'oxyde d'aluminium (Al₂O₃) et d'aluminium (Al) (Murdock *et al.*, 2008). Il a été publié que la grosseur des agrégats de TiO₂ était quatre fois plus petite avec l'ajout de sérum de veau fœtal ou de sérum humain (Allouni *et al.*, 2009). Le sérum, qu'il soit d'origine humaine ou vituline, semble donc jouer un rôle dominant au niveau du potentiel zêta de la NP.

Cependant, on ne peut pas affirmer que l'ajout de sérum diminuera ou augmentera à coup sûr la charge de la NP et éloignera son potentiel zêta de zéro. En effet, il a été observé que la charge originale d'une NP (par exemple si celle-ci est calculée dans de l'eau déionisée) aura tendance à augmenter négativement si celle-ci est mise dans un milieu (DMEM) et qu'elle poursuivra sa descente si on y ajoute du sérum (Hsiao *et al.*, 2013). Aussi, un résultat inverse a été publié. Il s'agit d'un cas où le potentiel zêta des NP de TiO₂ dans du RPMI sans sérum était négatif (-16mV \pm 2 donc comportement instable) et qu'il a atteint -9mV \pm 1 après l'addition de 10% de sérum de veau fœtal au RPMI (Allouni *et al.*, 2009). Il est évident que les deux milieux sont différents mais il est important de constater que le sérum, à lui seul, n'est pas la seule variable responsable de la stabilisation de la NP.

1.7 La réglementation et les usages des nanoparticules

Santé Canada définit les nanomatériaux comme toute substance, produit fabriqué, matière constitutive, structure, ingrédient ou dispositif :

- s'il est à l'échelle nanométrique, ou dans les limites de celle-ci, dans au moins une dimension externe ou présente une structure interne ou en surface à l'échelle nanométrique; ou,
- 2. s'il est plus petit ou plus grand que l'échelle nanométrique dans toutes les dimensions et affiche un ou plusieurs phénomènes ou propriétés à l'échelle nanométrique.

Aux fins de la présente définition :

1. le terme « à l'échelle nanométrique » signifie 1 à 100 nanomètres (nm) inclusivement.

 le terme « propriétés ou phénomènes à l'échelle nanométrique » signifie des propriétés qui sont attribuables à la taille et aux effets. Ces propriétés sont faciles à distinguer des propriétés chimiques ou physiques des atomes, molécules et matériaux particuliers et les matériaux en vrac.

3. le terme « fabriqué » comprend les processus techniques et les contrôles de la matière². Cette définition est large pour permettre à Santé Canada de recueillir les informations nécessaires à la caractérisation des nanomatériaux. De plus, Santé Canada reconnaît l'importance des informations à propos des nanomatériaux pour l'évaluation des risques. Cependant, il affirme aussi que la preuve est présentement insuffisante pour établir des valeurs de seuils communs concernant ceux-ci³. Ainsi, la réglementation les concernant sera actualisée pour être en accord avec la preuve scientifique et avec les normes internationales. Présentement, en ce qui a trait à la réglementation, Santé Canada demande de déclarer les nanomatériaux qui sont fabriqués ou importés au Canada. En effet, ceux-ci sont soumis aux mêmes lois que les polymères et substances chimiques². Pour ce qui est des nouvelles substances (tant au niveau de la fabrication ou au niveau de l'importation), les déclarants doivent se conformer aux directives encadrant la déclaration et les essais de substances nouvelles. Depuis le 1^{er} janvier 2013, la France, avec la loi nº 2010-788 du 12 juillet 2010 portant engagement national pour l'environnement (appellée aussi loi Grenelle 2)⁴, demande aux distributeurs et aux fabriquants de produits qui comportent un certain pourcentage de NP de les déclarer à l'Agence nationale de sécurité sanitaire. Toutefois, en Amérique du nord, il n'y a pas de règlements qui légifèrent l'étiquettage des biens de consommation comportant des NP. Il est ainsi difficile de savoir quels sont les produits qui en contiennent et de quelles NP il s'agit. La plupart des connaissances que nous avons sur la présence et la nature des NP est acquise grâce à la déclaration volontaire par les compagnies.

Cependant, on estime que d'ici la prochaine année, plus de 15% de tous les produits sur le marché auront utilisé des nanotechnologies, soit au niveau de leur conception ou de leur composition (Husen *et al.*, 2014). Le marché des NP est estimé à atteindre un milliard de dollars américain en 2015 (M. C. Roco, 2005). Diverses NP sont utilisées dans la fabrication de plusieurs biens de consommation de la vie courante tels que les petits appareils ménagers et les électroménagers, les meubles, les systèmes de purification d'air et d'eau, les appareils électroniques : ordinateurs, téléphones cellulaires, télévisions et appareils photos (Gutierrez-Pineda *et al.*, 2015); les produits d'entretien pour la voiture : lubrifiants, pièces d'automobile

(Schwartz *et al.*, 2005); pour le jardin : insecticides, fertilisants (Soni *et al.*, 2014, Zhang *et al.*, 2012); ou pour la maison : désinfectants, nettoyants tout usage, détergents pour plancher et tapis, peintures, vernis et matériaux de construction (Giovanni *et al.*, 2014). On les retrouve aussi dans des produits destinés à l'entrainement physique : vêtements et articles de sport (Lombi *et al.*, 2014, Miyayama *et al.*, 2012) ou dans des produits cosmétiques (Cross *et al.*, 2007, Leite-Silva *et al.*, 2013, Nohynek *et al.*, 2010). Plus récemment, l'utilisation des NP a été introduit dans le secteur de la santé sous la forme de médicament permettant un ciblage ou au niveau de l'imagerie médicale (Chatterjee *et al.*, 2014, De Jong *et al.*, 2008, Devi *et al.*, 2014, Valdiglesias *et al.*, 2014). Pour leur part, les AgNP sont de plus en plus présentes dans ce secteur, notamment pour le traitement du cancer, mais elles le sont aussi dans le matériel hospitalier (Besinis *et al.*, 2014, Dos Santos *et al.*, 2014, Hebeish *et al.*, 2014, Maki, 2010, Roe *et al.*, 2008). Le tableau suivant (tableau I) résume les différents types d'utilisation des principales NP. Vu leur importance dans ce travail, les AgNP seront résumées dans un tableau à part (tableau II).

Type de nanoparticules	Produits de consommation comportant différentes nanoparticules					
Calcium	Supplément alimentaire (Microactive®, CoQ-10)					
Carbone	 Vêtements de sport, semelles, chaussettes (Bigmensland, Double L®, Green Yarn), Couvertures (Green Yarn) Articles de bicyclette (Easton®) Raquettes de sport (Head®, Protech Sports) Bâtons de golf (Maruman®, Wilson®) 					
Carbone (nanotubes)	 Bio-médical (prothèse orthopédique, biosenseur pour détection d'enzyme, thérapie anti-cancer) Articles de sport : raquette de tennis (Babolat® NS™, STIGA, Yonex®), bicyclette (BMC cycling), article de golf, de hockey, de baseball, de vélos (Easton®) Pièces automobile : pneus (Continental) 					
Dioxyde de titane	 Peinture d'intérieur (Ace, Behr® (base, peintures), Benjamin Moore, Bulls Eye, Glidden) Cosmétique : crème solaire (Dermatone®, Fallene, Mustela®, Aveeno, Burt's Bees®, Coppertone, Hawaian Tropic, Neutrogena), déodorant (Dove), shampoing (Head and Shoulders), crème à rasage (Gillette) Accessoires de coiffure : fer à friser, fer plat et séchoir (Conair) 					
Magnésium	Supplément alimentaire (Microactive®, CoQ-10)					
Oxyde d'aluminium	 Cosmétiques : poudre (Alusion™ Alumina Powders) 					
Oxyde de zinc	 Cosmétique : crème solaire (Sun Smart[™], Mustela[®], Daily Sun Defense, Dermatone[®]) et crème hydratante (D-Fense[™]) 					
Silicone	 Matériel informatique (Samsung®, AMD®, IBM, Intel® Celeron®, Pentium®) Cosmétique : crème hydratante Lancôme® 					

Tableau I : Utilisation des différentes nanoparticules dans les produits et biens de consommation ⁵

Ainsi, on remarque que les nanotubes et les NP de carbone sont principalement utilisés pour les articles de sport. Les NP de carbone peuvent être ajoutées aux fibres des tissus ce qui permet leur incorporation aux vêtements de sport et les nanotubes de carbone sont utilisés dans divers produits du secteur bio-médical. Les NP de magnésium et de calcium sont commercialisées sous forme de suppléments alimentaires et celles de TiO₂ et ZnO sont utilisées principalement

dans les cosmétiques au niveau des crèmes solaires. Pour leur part, les NP de silice (Si) sont ajoutées au matériel informatique.

Si les autres NP ont leurs utilités propres, les AgNP sont utilisées principalement parce qu'elles possèdent des propriétés antimicrobiennes. Elles sont antifongiques, antivirales et possèdent un potentiel d'activité antibactérien contre les bactéries Gram-positive et Gram-négative (J. S. Kim et al., 2007, Morones et al., 2005, Sondi et al., 2004). Il a été avancé que cette propriété inciterait le développement de nouveaux médicaments pour contrôler la résistance aux antibiotiques (Dos Santos et al., 2014). Cette propriété serait expliquée en partie par l'action toxique des ions d'argent (Ag+) sur les cellules (Hachicho et al., 2014). En effet, il a été observé que certaines NP, en particulier les AgNP et surtout celles qui n'ont aucun recouvrement, peuvent libérer des ions. Certains chercheurs avancent que les dommages créés par les NP et observés dans les différents tissus (peau, reins, intestins) seraient la conséquence de la présence d'ions plutôt que des NP elles-mêmes (Loeschner et al., 2011, van der Zande et al., 2012). Il est aussi proposé que l'effet antibactérien des AgNP est dû à une interférence avec la formation des biofilms. Les biofilms permettent l'attachement des bactéries aux surfaces favorisant ainsi leur prolifération (Kalishwaralal et al., 2010). Il a été observé que ceux-ci peuvent contribuer à la résistance aux médicaments et aux désinfectants et qu'ils peuvent permettre aux pathogènes d'échapper à la réponse immunitaire pour établir des maladies chroniques (Jefferson et al., 2006). Une autre hypothèse expliquant l'effet antimicrobien a été présentée : il s'agit des dommages membranaires. En effet, des chercheurs ont notés que les AgNP (potentiellement leurs Ag+), formeraient des dommages à la membrane plasmique et que ceci serait le principal mode d'action. Aussi, il est avancé que l'adhérence des AqNP sur la membrane plasmique augmente sa perméabilité. Cela induirait des effets toxiques via un dérèglement du transport à travers celle-ci (Morones et al., 2005, Sondi et al., 2004). De plus, il a été remarqué que le potentiel antimicrobien des AgNP serait inversement proportionnel au diamètre de la NP (Devi et al., 2014, Kholoud M.M. Abou El-Nour, 2008).

De part leurs propriétés antimicrobiennes, l'ajout des AgNP aux biens de consommation permet de limiter la croissance des micro-organismes. Cet aspect incite donc plusieurs compagnies associées aux secteurs alimentaires, textiles, domestiques ou cosmétiques à ajouter celles-ci dans la composition de leurs produits (Ahamed *et al.*, 2010, Y. S. Kim *et al.*, 2010, Mohammed Fayaz *et al.*, 2012, E. J. Park *et al.*, 2010). On peut constater que les AgNP ne sont pas ajoutées directement à la nourriture, mais plutôt à leur emballage. En effet, les AgNP ne sont

14

pas utilisées comme agent de conservation mais plutôt dans des produits de conservation et de préparation alimentaire. De plus, les produits comportant des AgNP et destinés à être ingérés sont, pour la plupart, des suppléments alimentaires (Gaiser *et al.*, 2012). Au niveau des cosmétiques, on retrouve celles-ci dans des produits de base tels que les déodorants, shampoings, savons et dentifrices (Korani *et al.*, 2013, Miyayama *et al.*, 2012). On note aussi une grande utilisation dans le domaine du textile. Effectivement, les AgNP sont incorporées aux fibres des tissus et ceux-ci sont utilisés pour produire de la literie, des serviettes, des vêtements de sport et aussi des vêtements pour la vie courante (Kulthong *et al.*, 2010, Lombi *et al.*, 2014). Le tableau ci-dessous présente quelques-uns des secteurs dans lesquelles celles-ci sont retrouvées. La majorité des produits proviennent de compagnies asiatiques (Corée, Taiwan et Chine), américaines et européennes (Allemagne, Italie et République Tchèque).

Secteurs	Produits de consommation comportant des nanoparticules d'argent						
Alimentaire	 Contenants pour conserver la nourriture (BlueMoonGoods™, Fresher Longer™) Biberons et gobelets pour bébé (Baby Dream®) Vaisselle et ustensiles de cuisine Nettoyants pour fruits et légumes Suppléments alimentaires; laxatif (Microbe-Flush) Supplément antimicrobien (NanoSilver) Supplément sous forme d'argent colloïdal (Skybright Natural Health) 						
Textile	 Literie (couvertures, draps, couvre-matelas, et couvre-oreillers) Serviettes de bain Oreillers, coussins Chaussettes, serviettes, et vêtements de sport (Eddie Bauer®) Vêtements professionnels (Contourwear) et sous-vêtement (Nanbabies®) Pantouffles (Contour-Foam[™]), semelles pour souliers (Nanbabies®) Vêtements pour bébé (Precious Protechtor) 						
Électronique	 Accessoires d'ordinateur : clavier, souris avec ou sans fil (IOGEAR®) Téléphones cellulaires (LG®, Samsung®) Encre pour imprimante (Metalon™) 						
Cosmétique	 Étuit pour verres de contact (Lensspirit, GmbH) Accessoires de coiffure : brosses, séchoirs et fers plats (Philips, Conair), rasoirs (CleanXchange™, Remington®) Dentifrices et brosses à dent (Lucky Silver, Mouth Watcher) Savons, gels douche, déodorants, lingettes nettoyantes (Nanover™), shampoings (Nanover™), maquillage (Lip Tender®) Bijoux 						
Maison	 Systèmes de filtration d'eau Climatiseurs et purificateurs d'air (ex : Carrier®, Transit Electronics Co. Ltd) Réfrigérateurs (Daewoo®, LG®, Samsung®) Laveuses commerciale et résidentielle (Daewoo®, LG®) Matériaux de construction (bidet, robinetterie et poignées de porte) Peinture d'intérieur (Seongan D & C, Nanotech) Petits appareils électriques : fers à repasser (Breville), aspirateurs (Daewoo®, LG®), machir expresso (Saeco) Jouets pour enfants (ours en peluche Pure Plushy) 						
Animaux domestiques	 Bols pour nourriture, coussins et paniers (Dog Gone Smart Bed) Shampoings et vaporisateurs hydratants pour animaux (Nanover[™]) 						
Produits ménagers	 Savons et assouplisseurs à lessive (Finell, IRIN, Nanotec, Nanover™) Nettoyeurs tout usage (Lion®, Nanover™), à plancher et à tapis (Nanotec) Vaporisateurs antifongiques (MesoSilver®) 						

Tableau II : Utilisation des nanoparticules d'argent dans les produits et biens de consommation dans différents secteurs 5

CHAPITRE 2 : La toxicité des nanoparticules

Puisque l'on retrouve des NP dans plusieurs secteurs, il va de soi que les sources d'exposition sont variées. Ainsi, les NP peuvent avoir plusieurs voies d'entrées tels que le tractus digestif, les voies respiratoires ou le contact cutané. Le chemin et la translocation qu'elles parcourent à l'intérieur du corps sont encore plus ou moins compris. Toutefois, des NP ont été retrouvées dans plusieurs compartiments tels que le foie, la rate et les poumons. Cela indique qu'elles peuvent être distribuées largement et peuvent être bioaccumulées. La distribution, l'internalisation des NP par les cellules ainsi que leur bioaccumulation dans les organes peuvent causer la toxicité d'un système (Chatterjee *et al.*, 2014). Il a été suggéré que le complexe NP-corona serait responsable de cette toxicité puisque c'est lui qui dicte les mécanismes d'internalisation et qui guide la distribution. Ainsi, dans un système biologique complexe, les NP seraient toxiques d'après leur compositition et aussi d'après la nature de leur corona (Allouni *et al.*, 2009, Monopoli *et al.*, 2012).

2.1 Toxicocinétique des nanoparticules

Les conséquences des NP sur un système biologique peuvent être estimées grâce aux connaissances que l'on possède sur les modèles toxicocinétiques. En effet, ceux-ci nous permettent d'estimer le devenir d'une subtance chimique ou d'un xénobiotique grâce aux quatre étapes de la pharmacocinétique de celui-ci : absorption, distribution, métabolisme et excrétion. Dans le cas des NP, on peut observer toutes les phases sauf celui du métabolisme du xénobiotique. En effet, cette étape est peu documentée parce que la plupart des NP (si on exclut celles associées à des médicaments) sont inertes et ne subiront pas de grands changements outre au niveau de leur corona. On définit l'absorption comme étant le passage des NP à travers les membranes biologiques vers la circulation sanguine. Or, il a été observé que quelles que soient les voies d'exposition (inhalation, contact dermique ou ingestion), les NP peuvent être absorbées et rejoindre la circulation sanguine (Monopoli et al., 2012). Ainsi, des NP inhalées peuvent passer à travers la barrière épithéliale des poumons et se retrouver dans la circulation sanguine (Rothen-Rutishauser et al., 2007). Toujours lors d'une inhalation, d'autres chercheurs ont publié que des AgNP pouvaient être distribuées dans le corps car elles ont été retrouvées dans le cerveau (Oberdorster et al., 2004). Lors d'un contact dermique, des NP de TiO₂ ont été observées dans les nodules lymphatiques (Roy et al., 2014) et suite à une ingestion, des AgNP ont été retrouvées dans plusieurs organes dont les reins, le foie, les muscles, l'estomac et le cerveau. Aussi, il a été publié que les NP ont la capacité de passer à travers les différentes barrières dont la barrière hémato-encéphalique et le placenta (Hadrup *et al.*, 2014). Toutefois, l'absorption des NP semble dépendre de l'exposition puisque certaines études indiquent que les NP qui pénètrent par contact dermique sont sans danger et que leur internalisation par les cellules est négligeable (Cross *et al.*, 2007, Nohynek *et al.*, 2010, Zvyagin *et al.*, 2008). Une fois dans le système circulatoire, les NP sont en contact direct avec les cellules sanguines et les organes où elles pourront se déposer et induire des effets indésirables. C'est l'étape de la distribution. Plusieurs effets ont été observés sur des organes ou sur des lignées cellulaires suite à des expositions de NP.

Une modulation de l'inflammation a été observée à maintes reprises sur plusieurs types cellulaires. Par exemple, l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires qui a été observée chez des cellules dendritiques ou des macrophages lors d'une exposition à des NP (Rothen-Rutishauser et al., 2007). Aussi, il a été remarqué que les NP de TiO₂ induisaient une augmentation de l'IL-8 chez les PMN humains in vitro (Goncalves et al., 2010). Des résultats similaires concernant la chimiokine IL-8 ont été observés chez les macrophages alvéolaires de rat après une exposition à des NP d'oxyde de fer (Zhu et al., 2008) et chez des cellules endothéliales humaines après un contact avec des NP de dioxyde de silicium (SiO₂) (Peters et al., 2004). Pour leur part, les NP de carbone de 14 nm augmentent la libération du TNF chez les macrophages alvéolaires de rats (Brown et al., 2004). Plus récemment, il a été observé, in vivo avec le modèle de la poche d'air murine, que les NP de TiO₂ peuvent induire une inflammation caractérisée par une infiltration leucocytaire ainsi que par la production de médiateurs proinflammatoires (Goncalves et al., 2011). Une induction du stress oxydatif a aussi été notée. En effet. l'augmentation de la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) chez les macrophages alvéolaire de rat lors d'un contact avec les NP d'oxyde de fer a été remarquée (Zhu et al., 2008). Des résultats similaires ont été publiés par Rothen-Rutishauser et ses collègues à propos des cellules dendritiques et des macrophages alvéolaires tout comme des dommages à l'ADN à la suite d'une inhalation de NP (Rothen-Rutishauser et al., 2007).

Chez les PMN, une modulation de la dégranulation, qui est une fonction cellulaire importante, a été publiée. Cette modulation a été observée lorsque les PMN ont été exposés à trois NP différentes : des NP de TiO₂, de dioxyde de cérium (CeO₂) et de ZnO. Le même article a relevé que les protéines contenues dans ces granules (myéloperoxidase, MMP-9 et l'albumine) ont été retrouvées dans les surnageants (Babin *et al.*, 2013). Toujours chez le PMN, l'apoptose qui doit

être fortement régulée, a été altérée. Il a été observé que les NP de TiO₂ retardent l'apoptose des PMN via l'activation de ceux-ci (Goncalves *et al.*, 2010). Ceci est préoccupant puisque cette fonction cellulaire est particulièrement importante pour le maintien des populations saines de PMN.

La dernière étape est celle de l'excrétion, il s'agit de l'évacuation des NP par l'organisme. Loescher et son équipe ont présenté des résultats indiquant que des AgNP ingérées étaient retrouvées dans les excréments des rats (Loeschner *et al.*, 2011). Il a aussi été observé que l'excrétion de l'argent aurait aussi lieu via le système biliaire et les urines (Hadrup *et al.*, 2014). On ne sait pas si après un certains temps, les NP sont complètement évacuées ou si des résidus persistent. Plus d'études doivent être faites à ce sujet afin d'élucider ce questionnement.

Puisque nous avons vu qu'une NP possède son identité propre et qu'elle peut induire des effets complètement différents d'une autre, nous nous attarderons maintenant aux effets connus des AgNP sur les différents types cellulaires.

2.3 Effets des nanoparticules d'argent

Il est intéressant de noter qu'à l'état natif, l'Ag est peu abondant. Il est souvent associé à d'autres éléments tels que le chlore, l'arsenic, le sulfure. On trouve des mines d'argent surtout au Mexique, Bolivie, Pérou, Canada et Etats-Unis (Johnson et al., 2005). Son extraction peut induire plusieurs formes de pollution (Figueroa et al., 2008, R. C. Gonzalez et al., 2006). Il a été démontré qu'une ingestion, une inhalation ou une exposition quotidienne d'Ag peut s'accumuler et mener à l'argyrisme (Bowden et al., 2011, Hadrup et al., 2014, Raimondo et al., 2014). Cette affection procure à la peau une coloration gris-ardoise, la coloration peut être localisée ou généralisée (S. W. Park et al., 2013). Plusieurs des cas ont signalés suite à la prise de suppléments médicinaux (Chung et al., 2010), mais cela n'a pas été observé lors de l'utilisation de crème contenant de l'Ag (Sterling, 2014). Nous avons déjà mentionné que les AgNP sont reconnues pour leurs propriétés antibactériennes. Ceci justifie leur utilisation dans des domaines où la prolifération de ces dernières doit être contrôlée (Elechiguerra et al., 2005, Mohammed Fayaz et al., 2012). Malheureusement, elles peuvent aussi représenter un danger sous certaines conditions. En effet, la toxicité de l'argent et des AgNP a été observée à maintes reprises tant au niveau cellulaire qu'au niveau multi-cellulaire (Ahamed et al., 2010). La figure cidessous montre les diverses sources d'exposition aux AgNP et leurs effets potentiels.



Figure 2: Sources d'exposition aux nanoparticules d'argent et leurs effets toxiques connus (inspiré de Ahamed, Alsalhi et al. 2010)

Les AgNP proviennent de différentes sources d'exposition et induisent des effets toxiques *in vitro* sur les cellules de mammifères ainsi que *in vivo*, à la fois sur des cellules de mammifères et de non-mammifères.

Tel qu'expliqué précédemment, il est proposé que l'effet antimicrobien des AgNP serait dû principalement la libération des Ag+ qui induisent des dommages à la membrane cellulaire, à l'ADN et aux enzymes respiratoires. En effet, la toxicité a été observée à plusieurs reprises sur différents types cellulaires et expliquée par la libération des Ag+ (Hsiao *et al.*, 2013). De plus, celle-ci fût observée en particulier lorsque la NP possède un noyau fait de ZnO ou d'Ag et est non-recouverte ou dont le recouvrement est composé d'Ag (Devi *et al.*, 2014, Hsiao *et al.*, 2013). Il a aussi été avancé que les cellules qui avaient été exposées aux NP sans l'ajout de sérum avaient un taux de mortalité plus élevé, probablement dû au manque de protection offert par la corona ou par le recouvrement. En effet, ceux-ci semblent diminuer la concentration

d'ions libérés par le noyau (Hsiao *et al.*, 2013). De plus, une augmentation de la libération de la lactate déshydrogénase (LDH) fut observée chez des cellules souches de gonades de souris (lignée cellulaire C18-4) à des doses de 5 à 10 µg/mL de AgNP de 15 nm après une exposition de 24 heures (L. Braydich-Stolle *et al.*, 2005) ce qui indique des dommages membranaires ou une toxicité cellulaire.

Au niveau de l'apoptose, elle a été induite chez plusieurs types cellulaires tels que les cellules souches de gonades (lignée cellulaire C18-4) (L. Braydich-Stolle *et al.*, 2005) et chez les fibroblastes murins (lignée NIH3T3). Aussi, elle a été observée via la libération du cytochrome c de la mitochondrie, une augmentation des ROS et de l'activation de c-Jun N-terminal kinase (JNK) (Hsin *et al.*, 2008). L'induction de l'apoptose a aussi été observée chez les fibroblastes et les cellules souches d'embryons murins par l'équipe de Ahamed et coll. En effet, l'équipe de ce dernier a remarqué que la réponse était plus forte si les AgNPs étaient recouvertes de polysaccharide versus celles qui n'en avait pas (Ahamed *et al.*, 2008). Une induction de l'apoptose a aussi été observée chez les fibroblastes murins à des concentrations variant entre 1 et 200 µg/mL (Arora *et al.*, 2009). Plus récemment, l'apoptose a été remarquée chez les cellules LoVo (lignée du carcinome humain) comme étant la résultante d'une internalisation des NP induisant la formation de ROS, de médiateurs inflammatoires et des troubles à la mitochondrie (Miethling-Graff *et al.*, 2014). Chez l'humain, elle a aussi été répertoriée *in vitro* lors d'une exposition sur des cellules THP-1 (lignée cellulaire comparable aux monocytes) (Foldbjerg *et al.*, 2009).

La respiration cellulaire semble aussi être affectée par les AgNP. On a remarqué une diminution de l'activité de la mitochondrie chez les cellules C18-4 (L. Braydich-Stolle *et al.*, 2005) et aussi chez une lignée cellulaire de foie de rat (cellules BRL3A) à des doses variant entre 5 et 50 µg/ml pour des AgNP dont le diamètre variait entre 25 et 100 nm (Hussain *et al.*, 2005). Les mêmes observations ont été faites chez des cellules neuroendocrines de rat, soit la lignée PC-12 (Hussain *et al.*, 2006). Pour sa part, une augmentation de la production de ROS fut observée après une exposition de 24 heures sur des cellules BRL3A (Hussain *et al.*, 2005) et aussi chez les macrophages alvéolaires de rat (Carlson *et al.*, 2008). Des résultats similaires ont été observés chez des cellules de la lignée A431 (carcinome humain), chez la lignée HT-1080 (fibrosarcome humain) (Arora *et al.*, 2008) et sur des hépatocytes et des fibroblastes murins (Arora *et al.*, 2009). On a aussi remarqué une induction du stress oxydatif sur des hépatocytes humains (HepG2) après une exposition de 28h (E. J. Park *et al.*, 2010) ainsi que sur des

monocytes humains (THP-1) après 24h (Foldbjerg *et al.*, 2009). Aussi, il a été démontré que le stress oxidatif induit par des AgNP était responsable de l'apoptose des hémocytes chez l'escargot de mer (Ali, 2014).

Plusieurs résultats indiquent des dommages à l'ADN cellulaire après une exposition à des AgNP. Ceux-ci ont été observés sur des cellules souches embryonnaires murins (Ahamed *et al.*, 2008) ainsi que sur deux lignées cellulaires humaines, soit le carcinome (lignée cellulaire A431) et le fibrosarcome humain (lignée HT-1080) (Arora *et al.*, 2008). À des faibles doses considérées comme non-cytotoxiques (soit 0.1-3.0 µg/mL), l'équipe de Kawata a remarqué, après une exposition de 24h sur des hépatocytes humains (HepG2), une accélération des mécanismes de réparation de l'ADN (Kawata *et al.*, 2009). Une augmentation d'IL-8 fût observée sur des cellules souches mésenchymales humaines à des faibles concentrations de 2.5-5.0 µg/mL de AgNP de 100 nm de diamètre (Greulich *et al.*, 2009). D'autre part, une augmentation de la libération du TNF fut observée chez les cellules RAW 264.7 (lignée cellulaire de macrophages murins) (E. J. Park *et al.*, 2010).

Même si la majorité des résultats portent sur des lignées cellulaires, quelques études ont été faites sur des modèles in vivo. Celles-ci témoignent à la fois de l'absorption et de la distribution, mais aussi parfois de l'excrétion incomplète des NP puisque des dépôts ont pu être observés au niveau des reins et du foie. Trois études portent sur des systèmes complexes et mentionnent des effets au niveau du système digestif. La première, présentée par Shahare et Yashpal, montre que des AgNP de 5 et 20 nm ont endommagé les microvillosités et les glandes intestinales des souris (Shahare et al., 2013). Pour sa part, Jeong et son équipe ont publié des résultats présentant une modulation des fonctions cellulaires telle qu'une augmentation de la libération du mucus par les cellules calliciformes des rats suite à une ingestion de AgNP de 60nm (Jeong et al., 2010). Toujours chez le rat, une hyperplasie du canal biliaire et la présence de dépôt au niveau du foie ont été notées par Kim et coll. suite à une administration orale de AgNP de 56nm (Y. S. Kim et al., 2010). De plus, chez les rats femelles, des dépôts aux reins ont été observés lors d'une ingestion de AgNP de 60nm, ceux-ci étaient deux fois moindre chez les mâles (Y. S. Kim et al., 2008). Chez la souris, une infiltration des lymphocytes a été observée suite à une ingestion de doses élevées de AgNP de 13nm (2.5g/souris) (Cha et al., 2008). Le tableau III détaille la caractérisation des nanoparticules ainsi qu'une évaluation de leur toxicité (notez que la majorité des NP ne sont pas recouvertes et que des résultats différents pourraient être observés si elles possédaient un recouvrement).

 Tableau III : Effets des nanoparticules d'argent sur les cellules de mammifères (inspiré de Ahamed, Alsalhi et al.

 2010)

Caractérisation des AgNPs				Évaluation de la toxicité des AgNPs				
Diamètre (MET)	Recouvrement	Cellules mammifères	Doses	Exposition	Résultats observés	Références		
15 nm	aucun	cellules souches de gonades de souris (C18-4)	5-10 μg/mL	24h	réduction de l'activité mitochondriale, augmentation du LDH, apoptose	Braydich, 2005		
25 et 100 nm	aucun	cellules de foie de rat (BRL3A)	5-50 µg/mL	24h	réduction de l'activité mitochondriale, augmentation du GSH et des ROS	Hussain, 2005		
15 nm	aucun	cellules neuro- endocrines de rat (PC-12)	50 µg/mL	24h	réduction de l'activité mitochondriale et du niveau de la dopamine	Hussain, 2006		
15, 30 et 55 nm	aucun	macrophages alvéolaires de rats	10-75 μg/mL	24h	création de ROS et stress oxydatif médié par le diamètre	Carlson, 2008		
1-100 nm	aucun	fibroblastes murins (NIH 3T3)	5-50 µg/mL	24h	apoptose induite par la mitochondrie (médiée via ROS et JNK)	Hsin, 2008		
25 nm	polysaccharide versus aucun	fibroblastes et cellules souches murines	50 µg/mL	4-72h	induction de l'apoptose et dommages à l'ADN	Ahamed, 2008		
7-20 nm	aucun	cellules du carcinome (A431) et fibrosarcome humain (HT-1080)	6.25-50 µg/mL	24h	viabilité cellulaire réduite, ROS, fragmentation de l'ADN, activité de caspase-3	Arora, 2008		
7-20 nm	aucun	fibroblastes et hépatocytes murins	10-200 μg/mL	24h	viabilité cellulaire réduite, stress oxydatif et apoptose	Arora, 2009		
100 nm	aucun	cellules souches mésenchymales humaines (hMSCs)	2.5-5.0 μg/mL	24h	prolifération cellulaire et chimiotaxie réduite, concentration d'IL-8 augmentée	Greulich, 2009		
5-10 nm	aucun	hépatocytes humains (HepG2)	0.5-1.0 µg/mL	28h	cytotoxicité et stress oxydatif	Park, 2010		
7-10 nm	aucun	hépatocytes humains (HepG2)	0.1-3.0 μg/mL	24h	doses non-toxiques accélèrent la réparation des dommages à l'ADN	Kawata, 2009		
25 nm	polyvinyl et pyrrolidone	kéranitocytes humains	0.46ng /cm-2 à 2.32ng /cm-2	24h	pénétration de la peau dans un modèle de diffusion cellulaire <i>in vitro</i>	Larese, 2009		
69 nm	polyvinyl et pyrrolidone	monocytes humains (THP-1)	0-7.5 µg/mL	24h	création de ROS et apoptose	Foldbjerg, 2009		
2-5 nm	aucun	carcinome humain (HeLa S3)	92 µg/mL	3,4 et 24h	cytotoxicité, apoptose et induction des gènes reliés au ROS	Lubick, 2008		

CHAPITRE 3 : Le neutrophile et le système immunitaire

Dans les chapitres précédents nous avons vu que, sous certaines conditions, les NP peuvent induire la toxicité via des altérations aux organes ou induire la toxicité au niveau cellulaire. À notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée sur les effets des AgNP sur les PMN humains. Toutefois, vu leur rôle important au niveau du maintien de l'homéostasie, il serait nécessaire d'étudier leurs effets à ce niveau. Ce chapitre présente les rôles du PMN et définit son importance pour la santé humaine.

Le système immunitaire (SI) est un ensemble complexe composé de plusieurs molécules et types cellulaires dont le rôle est d'assurer l'homéostasie du corps vivant. Cette homéostasie est permise grâce à l'immunité conférée par le SI. On peut diviser l'immunité en deux classes : l'immunité innée (non spécifique) et l'immunité acquise (qui confère la mémoire immunitaire). Ces dernières jouent des rôles différents et regroupent des composantes et des cellules qui leur sont propres. Toutefois, elles interagissent et s'influencent mutuellement. L'immunité innée est la première ligne de défense de l'organisme. Elle est composée des barrières physiques, de certaines molécules et des cellules sanguines tels que les monocytes, macrophages et les PMN dont la responsabilité est d'envoyer les premiers signaux enclenchant la réponse immunitaire. Sa réponse est très rapide et peut prendre seulement quelques heures. Pour sa part, l'immunité acquise est composée des cellules sanguines tels que les lymphocytes et des anticorps. Sa réponse s'élabore sur plusieurs jours et se précise envers l'agresseur tout au long de son développement. Nous avons mentionné précédemment que les PMN étaient des composantes de l'immunité innée. En effet, ceux-ci sont non seulement les cellules immunitaires les plus abondantes du sang représentant entre 40% et 60% de tous les leucocytes (Wright et al., 2010) mais sont aussi un grand médiateur de l'inflammation. Notons qu'en plus de ce rôle principal, les PMN possèdent d'autres fonctions mineures. Par exemple, grâce à leur complexe d'histocompatibilité de classe II (CHMII), ils peuvent, lorsque le moment est opportun, participer à la présentation de l'antigène aux lymphocytes T et ainsi moduler la réponse immunitaire au niveau de cellules T auxiliaires 1 et 2 (Pillay et al., 2010, Wright et al., 2010). Dans ce chapitre, nous verrons l'importance des PMN dans le maintien de l'homéostasie du corps ainsi que son rôle à jouer dans la réponse inflammatoire.

24

3.1 L'équilibre des neutrophiles

Les PMN proviennent des cellules progénitrices myéloides. Ces dernières prennent naissance à partir de cellules souches pluripotentes dans la MO (Borregaard, 2010). On croit que les PMN passent la majorité de leur vie dans la MO dans un état quiescent. Seulement 2% se retrouverait dans la circulation sanguine (Sadik et al., 2011). Lorsque les PMN ont atteint leur maturité, ils migrent dans la circulation systémique. Cette migration est nécessaire puisque les PMN ne se divisent pas. Chez l'adulte, on estime qu'il y a environ 5X10¹⁰ (50 milliards) de PMN dans la circulation sanguine (Sadik et al., 2011). Il a été proposé que la demi-vie des PMN dans la circulation systémique est de quelques heures (6-8h) (Beyrau et al., 2012). Cependant l'équipe de Pillay a démontré que celle-ci peut être d'environ 5 à 6 jours (Pillay et al., 2010). Puisque la migration se fait en continue, l'équilibre du taux de PMN est préservé entre autre par le système réticulo-endothélial et par l'apoptose (Sadik et al., 2011). L'apoptose est une notion importante puisqu'elle assure l'équilibre du taux de PMN (nous reviendrons plus loin sur cette mort cellulaire). Cet équilibre est important puisqu'une surabondance de PMN peut mener à une inflammation chronique. En effet, une apoptose retardée, augmentera la quantité de PMN dans le système ce qui peut mener au développement de certaines maladies inflammatoires telles que la polyarthrite rhumatoïde et la spondylarthrite ankylosante (Bratton et al., 2011, Paoliello-Paschoalato et al., 2014, Wright et al., 2015). Au contraire, l'induction de l'apoptose par des facteurs pro-apoptotiques réduira le taux de PMN circulants, ce qui peut conduire à de la difficulté à combattre les infections (Beyrau et al., 2012, Gabelloni et al., 2013).



Figure 3 : L'importance de l'équilibre de la population de neutrophiles (inspirée de Denis Girard, PhD, Introduction à la toxicologie du système immunitaire, SES 9802, INRS-IAF, automne 2012) Une apoptose normale des PMN conserve le taux équilibré de ceux-ci. Une apoptose excessive induit une déplétion des PMN qui engendre des difficultés à combattre les infections. Une apoptose retardée ou inhibée peut mener à des maladies auto-immunes via une inflammation chronique.

On croit qu'il existe plusieurs «sous-populations» de PMN. En effet, ceux-ci ne semblent pas être une population uniforme mais semblent plutôt être composés de divers phénotypes et de divers niveaux de maturation. De plus, les PMN diffèrent selon l'âge de l'individu (Beyrau *et al.*, 2012). Il est aussi accepté que certaines maladies, tel que le lupus érythémateux disséminé (LED), sont la conséquence d'un phénotype particulier de PMN (Beyrau *et al.*, 2012). En effet, il a été démontré que 25% des PMN exprimaient de l'olfactomedine 4 (OLFM4), un suppresseur de tumeur retrouvé dans leurs granules. D'autres PMN présentent le CD117, une glycoprotéine de surface qui est impliquée dans l'adhésion endothéliale permettant la transmigration (Beyrau *et al.*, 2012). Aussi, les rôles des sous-populations anti-tumorale N1 et pro-tumorales N2 ont été notés dans le développement de certains cancers (Mishalian *et al.*, 2013, Sionov *et al.*, 2014). Les différentes sous-populations de PMN n'ont pas été examinées dans le travail présenté dans ce mémoire. Il faudra toutefois garder en tête que les PMN sont un groupe hétérogène de cellules ayant des phénotypes variables selon leur niveau d'activation et leur stade de maturation (Beyrau *et al.*, 2012).

3.2 Médiateur de l'inflammation

Les PMN sont les grands médiateurs de l'inflammation. L'inflammation est une réponse normale du système immunitaire de l'organisme lorsque celui-ci perçoit une agression. Elle a été décrite dans l'antiquité par Celsius il y plus de 2 000 ans. On la reconnaît à plusieurs états : calor, rubor, tumor, dolor, function lasea soit respectivement la «chaleur», «rougeur», «oedeme», «douleur» et «perte de fonction». L'inflammation permet le recrutement des cellules immunitaires permettant de combattre l'agression. Tout d'abord, les PMN matures circulent dans le sang, puis un signal (une lésion tissulaire ou un pathogène) induit des médiateurs de l'inflammation chimiotactiques. Ceux-ci qui mènent au recrutement des PMN (Sadik et al., 2011, Wright et al., 2010). D'une part, ces médiateurs permettent la vasodilatation des vaisseaux sanguins. D'autre part, ils induisent des changements phénotypiques et physiologiques qui permettent le roulement et l'attachement des PMN aux parois endothéliales des vaisseaux sanguins ainsi que l'infiltration des PMN dans les tissus. Pendant ce temps, la moelle osseuse augmentera la maturation des PMN pour répondre à la demande accrue en PMNs matures. Une fois dans les tissus, les PMN activés utiliseront diverses fonctions pour détruire l'agresseur (Sadik et al., 2011, Wright et al., 2010). Par la suite, il y aura résolution de l'inflammation via les macrophages dont l'un des rôles est d'éliminer les PMN apoptotiques. Il est aussi possible que les PMN activés ayant infiltrés les tissus retournent dans la circulation systémique via une transmigration inverse. Cela leur permettra de rejoindre le pool de PMN circulant. Dans ce dernier cas, les PMN apoptotiques seront éliminés par la rate (Beyrau et al., 2012). La résorption de l'inflammation est importante; si celle-ci n'est pas résolue, on verra apparaître une inflammation chronique qui peut mener au développement de maladies auto-immunes.

3.3 Inflammation aigüe

L'inflammation aigüe se distingue par la vitesse à laquelle la réponse est initiée et par laquelle elle est résorbée. En effet, l'infiltration est rapide et a lieu dans les premières heures. La réponse inflammatoire se développe sur une courte période de temps et est résolue dès que l'agression est disparue. On parlera alors d'inflammation aigüe. L'augmentation de la production de PMN à la moelle osseuse est importante et ponctuelle. Elle peut être induite par des cytokines spécifiques, dont le G-CSF et le GM-CSF (Mhaskar *et al.*, 2014). Par la suite, des

événements s'enclencheront très rapidement sous le signal de diverses cytokines sécrétées par différentes cellules. Certaines protéines agissent précisément sur le PMN et induiront des changements physiologiques permettant son roulement, son adhésion et sa migration. Parmi celles-ci, on retrouve des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 et l'IL-18, induites par des caspases pro-inflammatoires (caspase-1, caspase-4, caspase-5, caspase-11 et caspase-12) (Gabelloni et al., 2013), d'autres anti-inflammatoires et enfin, d'autres qui seront nécessaires pour les différentes fonctions du PMN. Elles seront sécrétées dans un ordre précis dépendamment du stade de la réponse inflammatoire (Futosi et al., 2013, Gabelloni et al., 2013). En effet, celles-ci sont importantes puisque c'est grâce à elles que la réponse inflammatoire est modulée. Tout d'abord, il y aura la présence de l'IL-4, l'IL-6 et de l'IL-15 qui seront sécrétées par les basophiles, macrophages et monocytes et dont le rôle sera d'activer les PMN nouvellement différenciés pour les préparer à utiliser leurs fonctions. Ultérieurement, l'IL-1 et ses dérivés sont exprimés. Celle-ci provoque des effets pro-inflammatoires qui agissent autant sur les PMN que sur les macrophages. La production d'IL-8, puissant agent proinflammatoire et chimioattractant, permettra d'assurer la migration des PMN activés au site infectieux tout en induisant leur activation (Basran et al., 2013). Ces derniers exprimeront aussi du MIP-1 α et du MIP-1 β qui, à leur tour, recruteront les macrophages au site. Ceux-ci, tous comme les PMN, produiront du TNF, une cytokine pro-inflammatoire qui est aussi responsable de l'induction de la migration des PMN au fover d'inflammation (Bratton et al., 2011). Au site infectieux, les PMN présents procèderont à la destruction du pathogène. Lorsque l'inflammation doit être résolue, les cytokines aux effets pro-inflammatoires cessent d'être produites. Seuls les macrophages sont appelés pour exercer la phagocytose des cellules apoptotiques (Fox et al., 2010). L'équilibre du système est rétabli. Ainsi, les PMN sont d'importants médiateurs de l'inflammation grâce aux cytokines sécrétées qui modulent tout aussi bien le début que la fin du processus inflammatoire.

3.4 Inflammation chronique

L'inflammation chronique peut être la réponse à un stimulus constant ou la conséquence d'une résolution inadéquate de la réponse inflammatoire. En effet, si le signal initiateur disparaît et que les cellules immunitaires continuent à affluer au site, elles risquent d'y exercer leurs fonctions de destruction ou de ne pas pouvoir induire leur apoptose. Dans les deux cas, des dommages peuvent être causés aux tissus et aux organes environnants. Ainsi, les métallo-protéases libérées des granules lors de la dégranulation, tout comme les ROS produits lors de

la flambée oxydative, ont été observés comme étant des causes menant à des dommages tissulaires dans le cadre d'une inflammation chronique (Wright *et al.*, 2010). Il est aussi accepté qu'une inflammation chronique peut mener à des graves problème de santé tels que des maladies auto-immunes (Beyrau *et al.*, 2012).

3.5 Les différents états du neutrophile

On reconnaît généralement 3 différents stades aux PMN; le stade naïf, pré-activé et activé. Au stade naïf, le PMN n'exprime pas ou peu de récepteurs, il a donc besoin d'un signal permettant sa maturation et lui permettant d'évoluer vers le stade pré-activé. Au stade pré-activé, il exprime certains récepteurs, dont le IL-10R1 qui lui permettront de reconnaître des signaux induisant des changements physiologiques nécessaires pour qu'il puisse être activé (Cassatella et al., 2005). Il assemblera aussi des protéines ou des complexes enzymatiques tels que la NADPH oxidase lui permettant de faciliter l'activation d'une réponse rapide. Lorsqu'il est activé, son état est irréversible et il est prêt à remplir ses fonctions destructrices telles que la dégranulation ou la production de ROS (El-Benna et al., 2008). Il a été observé que certaines maladies autoimmunes telle que l'arthrite rhumatoïde (RA), possèdent un taux plus élevé de PMN activés (Paoliello-Paschoalato et al., 2014). Lorsque ceux-ci rencontrent des complexes immuns, une dégranulation, ainsi qu'une production rapide de ROS peuvent être générés. Les protéases libérées des granules et les réactifs oxygénés se retrouvant ainsi dans le milieu extracellulaire peuvent causer des dommages aux tissus sains. Ces fonctions destructrices peuvent être induites rapidement puisque la cellule pré-activée est déjà disposée à agir rapidement (Wright et *al.*, 2010).

3.6 Physiologie et fonctions du neutrophile dans un contexte inflammatoire

Nous avons mentionné précédemment que les PMN agissent comme médiateur de l'inflammation. En effet, ils ont comme rôle d'assurer la sauvegarde de l'homéostasie du corps. Pour ce faire, ils possèdent des fonctions leur permettant de détruire les pathogènes. La section suivante décrit plus en détails les principales fonctions.
3.6.1 La production de cytokines

Tel que mentionné précédemment, les leucocytes sécrètent diverses protéines dont le rôle est d'induire l'activation, la migration et la production de médiateurs inflammatoires chez les autres cellules composant le système immunitaire. Les cytokines ne possèdent pas un rôle de destruction tels que les fonctions qui seront décrites ci-dessous mais elles induisent celles-ci et peuvent subir une modulation affectant ces dernières. Dans cette optique, nous croyons qu'il est légitime de les considérer comme une fonction indirecte des PMN. Nous détaillerons maintenant les effets des principales cytokines produites par le PMN dont l'IL-1β, le TNF, l' ainsi que le MIP-1 α et le MIP-1 β et qui auront comme rôle de réguler l'inflammation (Kasama *et al.*, 2005). Dès son activation, le PMN peut à son tour activer les macrophages (et vice versa) et les autres PMNs pour induire le processus inflammatoire. Il sécrète alors de l'IL-1, cette cytokine a comme rôle d'activer ces cellules tout en augmentant leur adhésion (Basran et al., 2013). Par la suite, on voit apparaître l'IL-8 qui possède des rôle similaire à l'IL-1 en plus d'avoir un puissant effet chimioattractant. Elle est sécrétée principalement par les PMN, les cible directement et elle indique le foyer inflammatoire. De plus, l'IL-8 induit plusieurs changements physiologiques qui sont nécessaire dans l'exercice des autres fonctions telles que la phagocytose, la dégranulation et la flambée oxydative (Dalboni et al., 2013). Dans cette perspective, on pourrait la considérer comme le précurseur des autres fonctions. De plus, il y aura l'induction du TNF qui permet la prolifération des cellules B, T et des PMN dans la MO, via l'expression de G-CSF (Munker et al., 1986) et qui induit l'activation ainsi que l'adhésion de ces derniers aux parois endothéliales (Ishii et al., 1992, Lokuta et al., 2005). Les PMN sécrètent aussi des protéines pro-inflammatoires destinées aux macrophages telles que le MIP-1a et le MIP-1B. Ces dernières induiront leur migration en leur indiquant le site inflammatoire. Lorsque le signal diminue et que la réponse inflammatoire doit être résorbée, les PMN diminuent la sécrétion des cytokines proinflammatoires et donc cessent l'infiltration et l'activation des leucocytes au site infectieux. Cependant, elles continuent de produire du MIP-1a et du MIP-1ß puisque leur présence est nécessaire à la migration des macrophages qui se chargeront de la résolution de l'inflammation (Gabelloni et al., 2013, Ortega-Gomez et al., 2013). De plus, il a été observé que cette cytokine serait responsable du changement de population des PMN pour les monocytes/macrophages (Kasama et al., 1993).

Le PMN peut aussi moduler l'inflammation grâce à des protéines autre que les cytokines. Nous avons mentionné précédement que les membres de la famille de l'IL-1 ont des effets pro-

inflammatoires. Cependant, le neutrophile sécrète de l'IL-1ra qui est une protéine dont le rôle est d'agir en tant qu'antagoniste. En effet, celle-ci a la capacité de lier le récepteur de l'IL-1 et d'empêcher la liaison à son ligand. Cela a pour but de faire compétition à l'IL-1 et de réguler négativement l'inflammation.

3.6.2 La flambée oxydative et la création de réactifs oxygénés

Il est connu que les PMN utilisent la flambée oxydative pour former des ROS qui seront libérés dans le milieu extracellulaire et qui permettront la destruction des champignons, virus ou bactéries. Les ROS produits par les PMN sont des anions superoxides et des radicaux libres qui possèdent de puissantes propriétés antimicrobiennes (Fox *et al.*, 2010). Tel que mentionné précédemment, si la flambée oxydative n'est pas résorbée, des dommages seront occasionnés aux tissus sains. Ainsi, s'ils sont mal régulés, les ROS peuvent présenter un danger potentiel. Il est aussi connu qu'une forte production de ROS intracellulaire peut induire l'apoptose de la cellule. Il a été suggéré que les ROS peuvent induire un signal pro-apoptotique aux récepteurs de mort formant des complexes DISC (*death-inducing signaling complex*) dans les radeaux lipidiques. Aussi, ils pourraient promouvoir l'apoptose en créant une interférence dans la voie anti-apoptotique transmise par les MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) et NF-κB (Gabelloni *et al.*, 2013). De plus, il a été observé que l'inhibition de la formation de ROS, soit par l'ajout d'antioxydant tel que la catalase (F. Binet *et al.*, 2006) ou par un inhibiteur de NADPH oxidase, prévenait l'induction de l'apoptose (Perskvist *et al.*, 2002).

3.6.3 La dégranulation

Les PMN sont des granulocytes et possèdent plusieurs classes de granules qui apparaissent à des temps différents lors de leur maturation. Ces granules contiennent des protéines et des enzymes permettant la destruction des pathogènes (Fox *et al.*, 2010). La classe de granules qui apparaît en premier comprend les granules azurophiles (appelés aussi granules primaires), ceux-ci restent la plupart du temps à l'intérieur des cellules et sont plutôt appelés à fusionner avec les phagosomes pour permettre la destruction du pathogène lors de la phagocytose. Ils contiennent entre autres les myéloperoxydase (MPO), les élastases, les défensines et les lysosymes. La deuxième classe à apparaître contient les granules spécifiques (dits aussi granules secondaires). Ceux-ci peuvent être libérés dans le milieu extracellulaire et

comprennent des substances antimicrobiennes. Ensuite, la classe à être formée dans les PMN comprend les granules gélatinases (appelés aussi granules tertiaires). Ceux-ci sont composés principalement de gélatinases dont le rôle est de dégrader la matrice extracellulaire. Ils comportent également des récepteurs permettant la migration leucocytaire. Finalement, les derniers granules à être formés constituent les vésicules sécrétoires. Lorsque les PMN sont activés, les vésicules sécrétoires sont les premières à être libérées (Carbone *et al.*, 2014). Elles possèdent des récepteurs permettant d'orchestrer l'inflammation en activant les PMN et en promouvant leur adhésion aux vaisseaux endothéliaux (Sadik *et al.*, 2011, Simard *et al.*, 2010). Certains signaux peuvent induire la dégranulation, tels que l'IL-8 ou le formyl-methionine-leucine-phenylalanine (fMLP), peptide constituant de la paroi bactérienne (Babin *et al.*, 2013).

3.6.4 Les trappes extracellulaires (NETs)

Récemment, il a été démontré que lorsque les PMN sont activés, ils peuvent former des trappes favorisant une activité bactéricide et anti-fongique permettant d'englober et de tuer les bactéries et les champignons (Brinkmann et al., 2007, Brinkmann et al., 2012). Ces trappes sont des structures formées de chromatine décondensée associée aux histones nucléaires. On considère que la formation de ces trappes peut induire une forme de mort cellulaire (si la chromatine utilisée est celle du noyau) mais il est de plus en plus accepté que la cellule est viable si les trappes sont formées avec l'ADN de la mitochondrie (Bratton et al., 2011). Cette mort cellulaire est appelée la «NETose». Elle est caractérisée par la perte de la membrane intracellulaire avant la perte d'intégrité de la membrane plasmique. Lorsqu'il y a formation de ces trappes, il y a aussi une dégranulation qui permet la libération des protéases contenues dans les granules permettant la destruction des pathogènes englobés (Brinkmann et al., 2007, Brinkmann et al., 2012). Dans les premières heures suivant l'activation des PMN, il a été observé que ceux-ci perdent leur noyau polylobé, que la chromatine se décondense et que les membranes nucléaires interne et externe se détachent l'une de l'autre. Les granules perdent aussi leurs membranes ce qui mène à la création d'une masse homogène entre le cytoplasme et le nucléoplasme. Il a été observé que les PMN qui exploitent la possibilité d'utiliser l'ADN mitochondrial pour produire les trappes seraient dépendant de la flambée oxydative pour exercer cette fonction (Yousefi et al., 2009). En effet, il a été remarqué que les individus dont l'activité de la NADPH oxidase était compromise étaient incapables de produire les trappes en réponse à un stimuli (Remijsen et al., 2011). Puisque la NETose est une fonction permettant la destruction des pathogènes, elle peut être induite non seulement par des pathogènes mais

32

aussi par des stimuli pro-inflammatoires tels que le lipopolysaccharide (LPS) (Brinkmann *et al.*, 2012).

3.6.5 La phagocytose

Tous comme les macrophages, les PMN sont classés comme étant des phagocytes professionnels. En effet, ils peuvent agir comme joueurs de la première ligne de défense et internaliser des pathogènes représentant un danger via leurs récepteurs membranaires (Belon et al., 2014). Cette internalisation sera suivie par une digestion qui, d'une part, détruit le pathogène et le danger qu'il représente et d'autre part, permet aux PMN d'effectuer la présentation d'antigène aux lymphocytes induisant ainsi une réponse immunitaire plus spécialisée (Nordenfelt, 2014). Tout d'abord, les PMN reconnaissent le pathogène via leurs récepteurs membraines tels que les récepteurs Fc. Il existe plusieurs types de récepteurs Fc dont les types Fcy et Fca. Ces derniers appartiennent à la superfamille des immunoglobulines, on les nomme aussi Cluster of Differentiation (CD). Les PMN possèdent, entre autres, les FcyRI (CD64) (Repp et al., 1991) et les FcaRI (CD89) (Tacken et al., 2006). Ces récepteurs reconnaissent les antigènes et induisent la phagocytose, (Forsberg et al., 2003, Fridman, 1991). Ensuite, il y aura polymérisation de l'actine amenant à la formation de pseudopodes qui formeront le phagosome. Celui-ci englobera le pathogène permettant ainsi l'internalisation de ce dernier. Par la suite, le phagosome fusionnera avec les lysosomes déjà présents dans le cytosol ce qui mènera à la formation du phagolysosome. C'est à l'intérieur de celui-ci que sera détruit le pathogène grâce aux enzymes digestives déjà présentes dans les lysosomes (Esmann et al., 2010).

3.6.6 L'apoptose

L'apoptose est définie comme étant la mort cellulaire programmée ou la mort silencieuse. Elle est commune à toutes les cellules animales nucléées et intervient dans le maintien de l'homéostasie de plusieurs systèmes (intestinal, hépatique et immunitaire) (F. Wang *et al.*, 2014a). En effet, l'apoptose diffère de la nécrose cellulaire puisqu'elle permet la destruction de la cellule sans occasionner des dommages aux tissus environnants. Lors de l'apoptose, la membrane cellulaire reste intacte, le cytosquelette est désassemblé, la cellule se condense et son ADN est fragmenté (Bratton *et al.*, 2011). Tous ces événements seront orchestrés grâce à

33

l'activation des caspases. Celles-ci sont des protéases pourvues d'une cystéine à leur site actif. Elles sont synthétisées par les cellules et sont retrouvées dans le cytosol mais sous une forme inactive (pro-caspase ou zymogène). Leur activation est généralement induite via l'activation de certains récepteurs de surface ou par une autre caspase qui clivera leur acide aspartique. Celles-ci étant actives, elles pourront à leur tour, couper l'acide aspartique des protéines ciblées enclenchant donc une cascade d'activation résultant vers l'apoptose cellulaire. Aussi, dès leur introduction dans la voie apoptotique, les cellules exposeront des molécules qui auront la tâche d'indiquer leur état de viabilité à des cellules phagocytaires comme les macrophages (Ortega-Gomez *et al.*, 2013). Les corps apoptotiques étant formés seront ainsi phagocytés et l'efferocytose a lieu (Bratton *et al.*, 2011). Ceci aura comme but de prévenir la relâche d'agents cytotoxiques ou de motifs associés au danger (DAMPs) qui pourraient exacerber la réponse inflammatoire due à une nécrose secondaire (Gabelloni *et al.*, 2013).

On a mentionné précédemment que l'apoptose est nécessaire à l'homéostasie. En effet, elle contrôle le maintien du bon taux de PMN tout comme elle assure à la résolution de l'inflammation. Il faut garder en tête qu'une apoptose déréglée (qu'elle soit retardée ou induite de façon non-adéquate) peut ouvrir la voie à des maladies auto-immunes ou diminuer le pouvoir anti-infectieux des PMN (Wright *et al.*, 2010). Récemment, il a été démontré qu'une protéine régulatrice du cycle cellulaire, la *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) était exprimée par les PMN (malgré le fait que le PMN ne peut pas se diviser) et qu'elle pouvait avoir un rôle à jouer dans la régulation de leur apoptose. La PCNA est exprimé exclusivement dans le cytosol et est associée avec les procaspases-3, -8 et -9. Il a été suggéré que cette association préviendrait l'activation des caspases. Il a aussi été remarqué que l'expression de la PCNA diminuerait lors de l'apoptose et augmenterait après une stimulation avec le facteur de croissance *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF) qui est connu comme ayant un effet anti-apoptotique sur les PMN (Witko-Sarsat *et al.*, 2010).

On divise l'apoptose des PMN en deux scénarios; l'apoptose spontanée et celle induite. Le premier scénario peut se produire *in vivo* et *in vitro*. Dans des conditions *in vivo*, les PMN naïfs, après avoir circulés dans la système sanguin (Beyrau *et al.*, 2012, Pillay *et al.*, 2010), se rendront à la rate ou au foie ou ils deviendront apoptotiques pour ensuite être phagocytés par les macrophages ou par les cellules de Kupffer. Il est important de noter que les PMN apoptotiques n'ont pas été activés par un signal quelconque. En effet, ils sont demeurés au stade «naïfs» décrit précédemment. Cette apoptose spontanée permet de maintenir une

population saine de PMN qui seront prêts à effectuer leurs fonctions en cas de danger (Borregaard, 2010). On observe ce phénomène en condition *in vitro* lorsque les cellules sont en culture sans aucune stimulation après une vingtaine d'heures. En effet, celles-ci, par manque de signaux, induiront leur propre apoptose et ce, même si elles ont tous les nutriments nécessaires à leur survie (Tanaka *et al.*, 2014, Zielinska-Przyjemska *et al.*, 2008).

Dans le second scénario, il y a la notion d'activation des PMN via un signal. Généralement, non seulement l'activation des PMN induira le processus inflammatoire décrit plus haut mais aussi les cellules synthétiseront des protéines anti-apoptotiques, tels que l'IL-1β (Christenson *et al.*, 2013), l'IL-8 et GM-CSF (El Kebir *et al.*, 2010) qui retarderont l'apoptose et permettront aux PMN d'exercer les fonctions de destruction du pathogène. Ensuite, lorsque le signal diminue et que l'inflammation doit être résorbée, on verra les signaux anti-apoptotiques remplacés par des signaux pro-apoptotiques, tels que TNF, TRAIL ou FasL, (Croker *et al.*, 2011, El Kebir *et al.*, 2010) induisant l'apoptose des cellules. Généralement, tous les cas d'apoptose sont le résultat de l'activation de la cascade des caspases (dont les caspase-2, caspase-3, caspase-6, caspase-7, caspase-9 et caspase-10) (Gabelloni *et al.*, 2013). Il est important de noter que lorsque l'activation des caspases est amorcée, elle est irréversible. Elle doit donc être fortement régulée. Que l'apoptose soit spontanée ou induite, elle peut être déclenchée par plusieurs mécanismes que l'on regroupe sous deux voies principales : la voie intrinsèque et la voie extrinsèque.

La voie intrinsèque diffère de la voie extrinsèque par son absence d'association entre le ligand extracellulaire et le récepteur. En effet, cette voie est induite par un signal venu de l'environnement intracellulaire. Elle peut être le résultat d'un dommage à l'ADN, de la libération du cytochrome c par la mitochondrie, d'un surplus de protéines dénaturées (voie du réticulum endoplasmique qui sera détaillé plus loin) ou d'un stress oxydatif (Bratton *et al.*, 2011). Le signal intracellulaire peut aussi être le résultat d'un stress venant de l'extérieur de la cellule. Dans tous les cas, le signal induit l'assemblage d'un complexe appelé l'apoptosome qui est composé du cytochrome c, de la protéine Apaf-1 et de la procaspase-9. Ce complexe induit l'activation des autres caspases effectrices (Gabelloni *et al.*, 2013).

Pour sa part, la voie extrinsèque est la conséquence de l'association entre un ligand (FasL, TNF, TRAIL) avec un récepteur de mort appartenant au groupe des récepteurs de nécrose tumorale (TNFR-1 et TNFR-2, Fas, TRAIL-R2) (Futosi *et al.*, 2013, Gabelloni *et al.*, 2013). La

liaison peut recruter des protéines adaptatrices intracellulaires (FADD). Ces dernières sont liées à la fois au récepteur de mort et à la procaspase-8 (Kotone-Miyahara *et al.*, 2004). Celles-ci seront clivées et activeront à leur tour la procaspase-3. Il est aussi demontré que, sous certaines conditions de stress, les cellules peuvent produire à la fois le ligand et le récepteur Fas (Krzyzowska *et al.*, 2014); ainsi la voie extrinsèque peut être induite par une cellule voisine ou par la cellule elle-même.

Un autre type de voie peut être utilisé pour induire l'apoptose, il s'agit de la voie du réticulum endoplasmique. En effet, le réticulum endoplasmique est le lieu de la maturation protéique (traduction et repliement protéique) qui permet le transfert des protéines vers l'appareil de golgi où aura lieu la régulation du transport vésiculaire. Puisque c'est au réticulum endoplasmique qu'a lieu la conformation des protéines, il arrive parfois qu'il y ait une accumulation de protéines dont la conformation est erronée. Cette accumulation de protéine cause un stress au réticulum qui induira une réponse UPR « *unfolded protein response* ». Cette réponse induit, entre autre, une diminution de la traduction et une augmentation de la transcription d'enzymes et des chaperonnes nécessaires au repliement protéique. Cela favorisera le repliement des protéines déjà traduites et présentes dans le réticulum endoplasmique. Si la réponse UPR est inhibée ou que celle-ci ne permet pas le repliement des protéines, le stress du réticulum endoplasmique ne s'estompe pas et l'apoptose peut être induite (F. Binet *et al.*, 2010a, Chien *et al.*, 2014).

Sachant que certaines NP peuvent induire des effets inflammatoires et des changements physiologiques sur les PMN et que les AgNP peuvent induire des dommages à divers types cellulaires, nous avons voulu examiner les effets des AgNP sur les PMN. Aussi, puisque l'apoptose est un processus physiologique important dans l'équilibre des populations de PMN, nous nous sommes intéressé à savoir si les AgNP pouvaient moduler cette réaction physiologique ce qui peut occasionner des problèmes de santé. Ainsi, **nous avons émis l'hypothèse que les AgNP peuvent induire des changements physiologiques et altérer l'apoptose des PMN humains.** Dans le but de répondre à notre hypothèse, nous avons défini deux objectifs. Le premier est de déterminer si des AgNP peuvent altérer le taux d'apoptose des PMN humains. Le deuxième objectif est d'observer et d'identifier si les AgNP induisent des changements physiologiques chez ces derniers. Pour ce faire, nous avons examiné les effets des AgNP composées d'un noyau d'argent et recouvertes de citrate, leur diamètre étaient de 20 nanomètres et les concentration utilisées variaient entre 10µg/mL à 100µg/mL. L'article qui est

36

présenté dans la section suivante présente les résultats répondant à ces deux objectifs et confirmant notre hypothèse. Cet article a été accepté le 26 septembre 2013 et est publié dans *Journal of Applied Toxicology* (Poirier *et al.*, 2013)

SECTION 2 : ARTICLE

Titre original de l'article

Interaction between silver nanoparticules of 20nm (AgNP20) and human neutrophils : induction of apoptosis and inhibition of *de novo* protein systhesis by AgNP20 aggregates

Poirier M, Simard JC, Antoine F, Girard D¹

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

¹Corresponding author: Denis Girard INRS-Institut Armand-Frappier 531 boul. des Prairies, Laval, QC, Canada, H7V 1B7 E-mail : denis.girard@iaf.inrs.ca Phone: (450) 687-5010 (x-8847); fax: (450) 686-5309

Running title: AgNP₂₀ aggregates induce apoptosis

Résumé de l'article en français

Titre : Interactions entre les nanoparticules d'argent de 20nm (AgNP₂₀) et les neutrophiles humains : induction de l'apoptose et inhibition de la synthèse *de novo* des protéines par les agrégats d'AgNP₂₀

La cytotoxicité et les propriétés pro-inflammatoires des nanoparticules d'argent (AgNP) ont été rapportées dans certaines études mais l'interaction directe entre les AgNP et les neutrophiles, qui jouent un rôle clé dans l'inflammation, n'a jamais été documentée. Cet article examine le rôle des AgNP au diamètre de 20nm sur les neutrophiles humains. La caractérisation des suspensions d'AgNP faite par diffusion dynamique de la lumière sous des conditions identiques à celles utilisées lors des expériences in vitro ont démontré qu'à 10µg/mL, 92% des AgNP possèdent un diamètre de 17.1nm. Cependant, à 100µg/mL, une distribution tri-modale composée de larges agrégats est observée (>500nm). Une augmentation de la grosseur des neutrophiles a été observée lorsqu'ils ont été mis en contact avec l'AgNP. Aussi, on a observé, grâce au microscope électronique à transmission (MET) que les AgNP peuvent interagir rapidement avec la membrane cellulaire, être internalisées, localisées dans des structures similaires aux vacuoles pour finalement être distribuées au hasard après 24 heures. Une exposition à 100µg/mL d'AgNP (mais non de 10µg/mL) induit l'apoptose et inhibe la synthèse protéique des neutrophiles humains. Nous concluons que les AgNP de 20nm peuvent induire l'apoptose et être un inhibiteur potentiel de la synthèse de novo à 100µg/mL, mais non à 10µg/mL des neutrophiles humains.

Contribution des auteurs de l'article

Contribution personnelle

J'ai participé à la majorité des expériences dont on fait mention dans l'article. Tout d'abord, grâce à la technique de la diffusion dynamique de la lumière, j'ai caractérisé les AqNP et ce, dans le milieu de culture utilisé lors des expériences in vitro. J'ai aussi participé à l'isolation des PMN et je les ai exposés à différents agonistes selon les expériences (AgNP, Viscum album agglutinin-I (VAA-I), gragulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), cycloheximide (CHX), trioxyde d'arsenic (ATO) et Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)). Par la suite, j'ai déterminé la toxicité des AgNP grâce au test de la lactate déshydrogénase (LDH). J'ai aussi observé l'augmentation du volume et de la granulosité des PMN après leur stimulation avec les AgNP grâce au microscope optique et à la cytométrie en flux. Par la suite, j'ai observé les cellules à l'aide du microscope électronique à transmission ainsi que la modulation de l'apoptose par cytologie. Les résultats concernant l'apoptose ont été confirmés par un marquage à l'annexine-V suivi d'une lecture à la cytométrie en flux. Finalement, j'ai participé à la synthèse de novo des protéines ainsi qu'à la planification des expériences, à l'analyse des résultats obtenus et à la rédaction du manuscrit. Ma contribution a permis d'observer que les AgNP peuvent induire l'apoptose des PMN humains et inhiber leur synthèse protéigue à une concentration de 100µg/mL et non à 10µg/mL.

Contribution des co-auteurs

M. Simard a effectué la coloration au Hoescht permettant d'observer l'augmentation des PMN au microscope confocal lorsque ceux-ci sont exposés aux AgNP.

M. Antoine a planifié et effectué la synthèse *de novo* des protéines, ce qui a permis d'observer l'inhibition de celle-ci chez le PMN sous certaines conditions.

M. Girard est le responsable de l'étude. Il a participé à la conception des expériences, à l'analyse des résultats et à la rédaction du manuscrit.

Texte original de l'article

ABSTRACT

Cytotoxic and pro-inflammatory properties of silver nanoparticles (AgNPs) have been reported in few studies but the direct interaction between AgNPs and neutrophils, which play a key role in inflammation, has never been documented. Here, we examined the role of AgNPs with a starting size of 20 nm (AgNP₂₀) in human neutrophils. Using dynamic light scattering for the characterization of NPs suspended under identical conditions to those used for in vitro experiments, we found that, at 10 μ g/ml, 92% of AgNP₂₀ possess a diameter of 17.1 nm but, at 100 μ g/ml, a tri-modal size distribution with large aggregates was observed (>500 nm). Neutrophil cell size increased when treated with AgNP₂₀ and transmission electronic microscopy experiments revealed that AgNP₂₀ can rapidly interact with the cell membrane, penetrate neutrophils, localize in vacuole-like structures, and be randomly distributed in the cytosol after 24h. Treatment with 100 μ g/ml AgNP₂₀ for 24h (but not 10 μ g/ml) increased the neutrophil apoptotic rate and inhibited *de novo* protein synthesis. We conclude that AgNP₂₀ induced apoptosis and can act as potent inhibitors of de novo protein synthesis at 100, but not 10 μ g/ml in human neutrophils.

Keywords: silver nanoparticles, inflammation, neutrophils; apoptosis; protein synthesis

INTRODUCTION

Research in the field of nanotechnology has increased tremendously in the last few years due to the expectation that nanomaterials continue to be incorporated into practically all types of products; more than 1000 nanoproducts already exist on the market, many of which contain silver nanoparticles (AgNPs, or nanosilver) (Arora *et al.*, 2012). Due to their well-reputed antimicrobial properties, silver nanoparticles are presently among the leading nanotechnology products (Pratsinis *et al.*, 2013, Sotiriou *et al.*, 2010). For example, many of these products are used in the textile industries, including clothes made of AgNP-containing fabric (Kulthong *et al.*, 2010) In addition, AgNPs are found in personal hygiene products, including toothpastes (Nowack *et al.*, 2011). Thus, certain AgNP-containing products may be in close contact with the human body and may potentially reach the bloodstream, via inhalation or absorption through the skin or gastrointestinal tract (Chen *et al.*, 2008, Korani *et al.*, 2011, Quadros *et al.*, 2011).

Although several studies have reported that NPs can induce inflammation *in vivo*, as evidenced by an increased number of polymorphonuclear neutrophil cells (PMNs) in lungs/brochoalveolar lavages (Noel *et al.*, 2012, Rossi *et al.*, 2010, Roursgaard *et al.*, 2010, Srinivas *et al.*, 2011), the direct interaction between NPs and PMNs, key players in inflammation, is poorly documented. We have recently shown that titanium dioxide (TiO₂) NPs activate human PMNs *in vitro*, and can delay apoptosis and increase the production of the pro-inflammatory cytokine IL-8 (Goncalves *et al.*, 2010). Thus, the possibility that other NPs could alter PMN biology need to be determined, particularly with regard to the modulation of apoptosis, given that resolution of inflammation occurs largely by elimination of apoptotic PMNs by professional phagocytes, including macrophages (Fox *et al.*, 2010).

Studies investigating the interaction of silver nanoparticles (AgNPs) with human PMNs have not been documented. However, interactions between AgNPs and macrophages have been reported (Haase *et al.*, 2011, J. Park *et al.*, 2011, Pratsinis *et al.*, 2013, Shavandi *et al.*, 2011, Wasowicz *et al.*, 2011). Physiological changes induced by different types and sizes of NPs have been investigated, and different responses according to both characteristics have been observed. In fact, AgNPs and gold nanoparticles (AuNPs) were shown to be taken up by cells and located in vesicles in the cytosol; however, AuNPs adopt a curious circular pattern in comparison with the diffuse localisation of AgNPs. Moreover, there is variation in the expression of pro-inflammatory cytokines observed with different diameters of the same NPs, as well as between AuNPs and AgNPs (Yen *et al.*, 2009). In addition, it was observed that AgNPs caused

42

mitochondrial damage, resulting in induction of apoptosis and death of macrophages (R. P. Singh *et al.*, 2012).

Although is it known and highly predictable that a given NP can exert different cytotoxic effects and/or alter cell physiology according to its diameter (Bartneck *et al.*, 2010), the aim of the present study was to determine whether or not NPs of a given diameter, namely AgNP with a starting diameter of 20 nm (AgNP₂₀), could alter the biology of human PMNs when tested at different concentrations. Therefore we characterized AgNP₂₀ at different concentrations using dynamic light scattering (DLS), under conditions identical to those used in *in vitro* experiments (culture medium, human serum, etc.). We demonstrated that AgNP₂₀ increased the cell size of freshly isolated human PMNs, rapidly interacted with the cell membrane and penetrated inside cells, induced cell apoptosis and inhibited *de novo* protein synthesis only when present as large aggregates (>500 nm, in this study).

MATERIALS AND METHODS

Chemicals.

The cytokine granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) was purchased from PeproTech Inc. (Rocky Hill, NJ). The plant lectin *Viscum album* agglutinin-I (VAA-I), lipopolysaccharides (LPS) from *Escherichia coli*, trypan blue and dextran were from Sigma-Aldrich Ltd. (St-Louis, MO). The silver nanoparticles of 20 nm diameter, AgNP₂₀, (Pelco® citrate Biopure[™] silver) were purchased from Ted Pella (Redding, CA). Ficoll-Hypaque was purchased from GE Healthcare (Uppsala, SE) and RPMI-1640, HEPES, penicillin and streptomycin were from Life Technologies, Grand Island, NY, USA). The lactase dehydrogenase (LDH)-Cytotoxicity Assay Kit II was purchased from Abcam® (Toronto, ON),

Size distribution and zeta potential measurements.

The size distribution and surface charge (zeta potential) of $AgNP_{20}$ were determined by dynamic light scattering using a Malvern Zetasizer Nano-ZS (model ZEN3600 from Malvern Instruments Inc. (Westborough, MA). Measurements were performed at 10 and 100 µg/ml AgNPs in RPMI-1640 with HEPES and Pen/Strep + 10% heat-inactivated human serum.

Neutrophil isolation.

Neutrophils were isolated from venous blood of healthy volunteers by dextran sedimentation followed by centrifugation over Ficoll-Hypaque as previously described (F. Binet *et al.*, 2008, Pelletier *et al.*, 2004). Blood donations were obtained from informed and consenting individuals according to institutionally approved procedures. Cell viability was monitored by trypan blue exclusion and was always >98%. Purity was confirmed by cytology from cytocentrifuged preparations colored by the Hema 3 stain set (Fisher Scientific).

Cell viability and cell shape changes.

Freshly isolated human PMNs (10×10^6 cells/ml in RPMI-1640 HEPES-P/S, supplemented with 10% heat-inactivated autologous serum) were treated for 0-24h with or without increasing concentrations of AgNP₂₀ ranging from 0-100 µg/ml, as reported by others (Arora *et al.*, 2009, Rosas-Hernandez *et al.*, 2009). Cell viability was monitored by trypan blue exclusion and by LDH assays. The morphological cell shape changes were observed under light microscopy (400X), and photomicrographs were taken using a Nikon Eclipse TS100 camera.

Evaluation of cell size and inner complexity by flow cytometry.

Freshly isolated human PMNs (10×10^6 cells/ml in RPMI-1640 HEPES-P/S) were treated with or without 10 or 100 µg/ml AgNP₂₀ for 30 min and data for cell size (FSC-H) and inner complexity (SSC-H) were acquired by flow cytometry using a FACScan (BD Biosciences).

Confocal microscopy.

PMNs (10 X 10⁶ cells/mL) were resuspended in RPMI 1640 HEPES Pen/Strep without phenol red containing 10 % serum albumin. Cells were then incubated with the indicated agonist in Poly-D-coated glass bottom Microwell dishes (Mat Tek Corporation, Ashland, MA). After 24h, NucBlue® Live ReadyProbes[™] Reagent (Life Technologies) was added to micro-well dishes for microscopy. Images were captured with a Zeiss LSM 780 confocal microscope. Cell sizes were measured using Zen 2011 Blue Edition (Carl Zeiss, Germany). One hundred randomly selected cells were measured using 3 different fields for each condition. Results were confirmed with at least 4 blood donors.

Transmission electron microscopy.

Freshly isolated human PMNs (10 x 10^6 /ml) were incubated with 100 µg/ml AgNP₂₀ for 0-24h, fixed with glutaraldehyde (2.5%) and examined using a Hitachi H-7100 transmission electron microscope at different periods of time.

Assessment of neutrophil apoptosis.

Apoptosis was evaluated by cytology, as previously published (D. Girard *et al.*, 1997, Goncalves *et al.*, 2010). PMNs (10×10^6 cells/ml) were incubated at 37 °C in 5% CO₂ in 96-well plates for 24h in the presence of buffer (Ctrl), the anti-apoptotic cytokine GM-CSF (65 ng/ml), the proapoptotic plant lectin VAA-I (1µg/ml) or the indicated concentrations of AgNP₂₀. Cells were cytocentrifuged on microscope slides and colored with the Hema 3 staining kit. Apoptosis evaluation was based on the nucleus morphology. The results were expressed as the percentage of PMNs in apoptosis. In some experiments, Annexin-V binding was used to confirm the ability of AgNP₂₀ to induce neutrophil apoptosis. After 24 h of incubation, the cells were suspended at concentrations of 10×10^6 cells/mL, washed and then resuspended at 1 $\times 10^6$ cells/mL and incubated with 2 µL of FITC-annexin-V for 15 min at room temperature (light protected) prior to fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis.

Metabolic labelling and de novo protein synthesis assay.

Cells (10 x 10^6 cells/ml in RPMI-1640 medium supplemented with 10% autologous serum) were metabolically labelled with 4.625 MBq of the Redivue Pro-Mix L-[³⁵S] in vitro cell labelling mix (GE Healthcare, Baie d'Urfé, QC, Canada) in the presence or absence of 10 or 100 µg/ml AgNP₂₀, 5 µM ATO or 10 µg/ml CHX for 24h as previously described [30].

Statistical analysis.

The data are reported as mean \pm SEM and were analyzed by one-way ANOVA, and differences between tested groups and control were assessed using the Dunnett's Multiple Comparison Test or analyzed by Student-t-test (for **Fig. 3B** only), with GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). Statistical significance was established at p<0.05, and each experiment was performed and validated at least 3 times.

RESULTS

Nanoparticle characterization and lack of necrotic activity in human PMNs. The results of $AgNP_{20}$ characterization are summarized in **Table 1**. According to the manufacturer's data sheet, the starting diameter of the AgNPs was 20 nm. We confirmed this using DLS, where a bimodal size distribution was observed (17.1 nm, 92%; 2.2 nm, 8%) for a concentration of 10 µg/ml, and by TEM, where each NP was close to 20 nm (**Fig. 1A**). However, at a concentration of 100 µg/ml, a tri-modal size distribution was observed, as was the presence of large aggregates (505 nm, 59.5%; 1135 nm, 37.3%; and 1576 nm, 3.2%). We next monitored cell viability by trypan blue exclusion assay by testing different concentrations of 0, 5, 10, 20, 50 or 100 µg/ml AgNP₂₀ for up to 24h of incubation. For all conditions tested, cell necrosis never exceeded 2% (*data not shown*). We next determined cell necrosis by evaluating LDH release. Prior experiments revealed that AgNP₂₀ did not interfere with the assay (*data not shown*). As illustrated in **Fig. 1B**, after 24h, 10 or 100 µg/ml AgNP₂₀ did not significantly increase LDH release from neutrophils vs untreated cells, despite the fact that the positive technical control of the assay lead to a marked release of LDH, as expected.

Table 1. Characterization of the silver nanoparticle used in this study ^a			
Characterization	Starting material	AgNP ₂₀ (10 μg ml ⁻¹) ^b	$AgNP_{20}$ (100 µg ml ⁻¹)
Size (nm)	19.9 (TEM) as reported by the manufacturer	17.1 (92%) ^c 2.2 (8%)	505 (59.5%) 1135 (37.3%) 1576 (3.2%)
Zeta potential (mV) ^d	N/A	-9.4 ± 1.4	-9.7 ± 0.4
TEM, transmission electronic microscopy. ^a Data are representative of three different lectures. ^b NPs were suspended in RPMI-1640 + 10% human serum as detailed in Materials and methods. ^c Number in parentheses are the proportion of NPs with the indicated sized measured by DLS. ^d Results are means \pm SD ($n = 3$).			



Figure 1. Transmission electronic microscopy image of the primary solution stock of AgNP20 and evaluation of cell necrosis in activated human polymorphonuclear neutrophil cells. (A) Sample of the solution stock from the manufacturer was used for characterization by transmission electronic microscopy to confirm that the primary diameter of the NP was close to 20 nm. This was also confirmed by dynamic light scattering (Table 1). (B) Freshly isolated human polymorphonuclear neutrophil cells were incubated for 24 h in the presence of buffer (controls), 65 ng ml–1 GM colony-stimulating factor, 10 and 100 μ gml–1 AgNP20 and cell necrosis was evaluated by measuring the level of LDH released in the supernatants. Results are means ± SEM (n = 3). Both low and high controls were used according to the manufacturer's recommendations. AgNP20, silver nanoparticles of 20 nm; GM, granulocyte–macrophage; LDH, lactic dehydrogenase

AgNP₂₀ increased the neutrophil cell size. Next, as a marker of PMN activation, cell shape changes were monitored by cytology after AgNP₂₀ treatment, as done routinely in our laboratory (D. Girard et al., 1996, Goncalves et al., 2010). As illustrated in Fig. 2, after 24h, AqNP₂₀ increased the cell size of PMNs in vitro (panel B, black arrows) when compared to control cells (panel A). However, the cell shape remained relatively round or spherical in all experimental conditions, in contrast to classical neutrophil activators such as cytokines, including GM-CSF or IL-15 (D. Girard et al., 1996), where the round shape was replaced by an irregular shape. Of note, cells that appeared less well-conserved in controls or in response to AgNP₂₀ probably corresponded to apoptotic PMNs known to spontaneously undergo apoptosis in ~30-50% of cells (spontaneous apoptosis) after 24h of incubation. Results were confirmed by flow cytometry, where AgNP₂₀ increased not only the cell size (FSH-H), but also the inner complexity (SSC-H) (Fig. 2C). Next, confocal microscopy, using Hoescht (NucBlue® Live ReadyProbes™ Reagent), was performed to confirm the effect of AgNP₂₀ on PMN cell size. As illustrated in Fig. 3, after 24h without treatment (spontaneous apoptosis), two populations of cells (about 50% each) brightly or diffusely blue stained, corresponding to normal and apoptotic cells, respectively, were observed. In Fig. 3, panels c and f are shown at higher magnification (c' and f') to better illustrate that untreated PMNs display approximately the same cell size (panel c') whether they are brightly or diffusely stained with the blue dye. In contrast, only one population of PMNs (100% of cells) were observed after AgNP₂₀ treatment; these cells exhibited a larger surface area, confirming the previous data (**Fig. 2**), and are weakly stained with the blue dye that is diffuse throughout the cells (panel f'). During these experiments, cell size (surface area) was measured and the data were plotted as a bar graph (**Fig. 3B**). AgNP₂₀ increased the surface area by a factor of ~2.3, since the value increased from 68.8 ± 1.4 μ m² (mean ± SEM, n=4 donors) to 160.8 ± 5.4 μ m².



Figure 2. AgNP20 increase the cell size and inner complexity of human polymorphonuclear neutrophils. Cells were treated with buffer (Ctrl), or the indicated concentrations of AgNP20 and cell morphology (A,B) was observed for up to 24 h by optical microscopy. Cell size and inner complexity were determined by flow cytometry (C) as detailed in the experimental section. Note that the vast majority of cells treated with AgNP20 (B, black arrows) possess a larger size than control cells (A). For simplicity, only the results obtained with 100 μ gml–1, after 24 h, are illustrated. Results are representative of five different experiments. (C) Results are means \pm SEM(n=3). *P<0.05 vs Ctrl. AgNP20, silver nanoparticles of 20nm; Ctrl, controls; FSC-H, forward scattered light; SSC-H, side scattered light.



Figure 3. Cell size measurements of AgNP20-activated human polymorphonuclear neutrophils by confocal microscopy. Polymorphonuclear neutrophils were treated with buffer (Ctrl) or 100 μ gml–1 AgNP20, stained with Hoescht and observed by confocal microscopy (A). Cell size was measured as detailed in the experimental section (B). Representative images of immunofluorescence staining of the DNA/nucleus (A, panels a,d) and corresponding DIC images (A, panels b,e) as well as the merge images (A, panels c,f). The panels c and f were enlarged (c' and f') to show that the dye is diffusely distributed throughout the cytosol in response to AgNP20 (f'), but not for control cells (c'), and to show the increased cell size, easily observable. (B) Results are means \pm SEM (n = 4). *, P<0.05 vs Ctrl. AgNP20, silver nanoparticles of 20 nm; Ctrl, controls; DIC, differential interference contrast.

AgNP₂₀ are ingested by human PMNs. The above results indicated that AgNP₂₀ increased PMN cell size, suggesting that they can penetrate the cells. We next performed TEM experiments and, as indicated in **Fig. 4**, AgNP₂₀ rapidly interacted with the plasma membrane. AgNP₂₀ penetrated inside neutrophils into vacuoles (even within 1 min in some cases), were localized in vacuole-like structures, and were randomly distributed in the cytosol after 24h (**Fig. 5**).



Figure 4. Silver nanoparticles of 20 nm (AgNP20) can rapidly interact with human polymorphonuclear neutrophil cell membrane and are internalized in vacuole-like structures. Freshly isolated human polymorphonuclear neutrophils were incubated with 100 μ gml–1 AgNP20 for 1 min and prepared for transmission electron microscopy analysis. AgNP20 are localized close to the cell membrane (arrows in A) and some are readily observed in vacuole-like structures (square in A, enlarged in A') or ingested by the cells and observed in cell membrane protrusion (square in B, enlarged in B'); note that some AgNP20 are clearly observed in cell membrane protrusion (arrows in B') and that some other are not in contact with the membrane (circle). n=nucleus.



Figure 5. Silver nanoparticles of 20 nm (AgNP20) are randomly distributed throughout the cytosol in human polymorphonuclear neutrophils over time. Freshly isolated human polymorphonuclear neutrophils were incubated with 100 µgml–1 AgNP20 for 24 h and prepared for transmission electron microscopy analysis. Note the presence of AgNP20 not only in the vacuole-like structure, but also freely distributed throughout the cytoplasm (arrows).

AgNP₂₀ induce neutrophil apoptosis. Because of the importance of regulating PMN apoptosis in inflammation (Fox *et al.*, 2010, Savill *et al.*, 1995), and since apoptotic PMNs excluded trypan blue, we next determined whether or not AgNP₂₀ could regulate neutrophil apoptosis. As illustrated in **Fig. 6A**, the basal apoptotic rate of 45.8 ± 2.9% (mean ± SEM, n=4) increased to 81.8 ± 4.1% and decreased to 18.0 ± 5.28% when cells were incubated with either 100 µg/ml AgNP₂₀ or the anti-apoptotic cytokine GM-CSF, respectively, as evidenced by the presence of an increased number of cells harboring pycnoctic nuclei (black arrows) versus typical polylobed nuclei (white arrows) observed in viable PMNs. As expected, almost all PMNs (97.5 ± 0.5%) were apoptotic when incubated with VAA-I, a positive proapoptotic control (Lavastre *et al.*, 2002). Of note, concentrations of 5, 10, 20 or 50 µg/ml did not significantly alter the basal apoptotic rate (**Fig. 6B**). The proapoptotic activity of 100 µg/ml AgNP₂₀ was confirmed by determining the percentage of FITC-annexin-V positive cells by flow cytometry (**Fig. 6C**).



Figure 6. AgNP20 induce apoptosis in human PMNs. Cells were treated with buffer, 65 ng ml-1 of the antiapoptotic cytokine GM colony-stimulating factor, 1 μ gml-1 of the proapoptotic plant lectin VA or the indicated concentration of AgNP20 and apoptosis was evaluated by cytology as detailed in the experimental section. (A) The ability of AgNP20 to alter the apoptotic rate in PMNs is compared to VA. Results are means \pm SEM (n = 4). Inset, representative images illustrating normal viable (white arrows) and apoptotic (black arrows) PMNs. (B) Dose-response effect of the proapoptotic activity of AgNP20. *P<0.05 vs. Ctrl. (C) In two separate experiments, the proapoptotic activity of AgNP20 was confirmed by flow cytometry by determining the number of annexin-V-positive cells. AgNP20, silver nanoparticles of 20 nm; Ctrl, controls; GM, granulocyte-macrophage; PMNs, polymorphonuclear neutrophils; VA, Viscum album agglutinin-I.

AgNP₂₀ **particles are potent inhibitors of** *de novo* **protein synthesis**. Knowing that several agents which modulate apoptosis in PMNs also alter *de novo* protein synthesis (D. Girard *et al.*, 1997, Savoie *et al.*, 2000, Stringer *et al.*, 1996), we investigated here whether or not AgNP₂₀ could alter *de novo* protein synthesis, since this has never been investigated in response to NPs, to the best of our knowledge. As illustrated in **Fig. 7**, AgNP₂₀ acted as potent inhibitors of *de novo* protein synthesis when PMNs were treated with 100 µg/ml (lane 5, panel A), similar to CHX (lane 1, panel A), a potent inhibitor of protein synthesis. Although no new polypeptides were synthesized in response to 100 µg/ml AgNP₂₀ (and CHX), the corresponding Coomassie blue stained gel (**Fig. 7B**) clearly illustrated equivalent loading of proteins (see lanes 5 and 1,

panel B vs lanes 5 and 1, in panel A), except for a particular protein (?, in the bottom panel). In these experiments, ATO was used as a positive control (lane 3, panels A and B) known to induce *de novo* protein synthesis in human PMNs (F. Binet *et al.*, 2006).



Figure 7. AgNP20 inhibit de novo protein synthesis in human PMNs. PMNs were metabolically labelled with the Redivue Pro-Mix L-[35S] in vitro cell labelling mix and incubated in the presence of cycloheximide (CHX, lane 1); buffer (Ctrl, lanes 2 and 6); 5 μ M arsenic trioxide (ATO, lane 3); 10 or 100 μ g/ml AgNP20 (lane 4 and 5, respectively) for 24 h and cell lysates were prepared for one-dimensional sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel as described in the experimental section. Upper panel is the autoradiogram and the bottom panel is the corresponding Commassie blue stained gel illustrating an equivalent charge of proteins loaded. Note however that the level of expression of one polypeptide is decreased in response to 100 μ g/ml AgNP20 (see bottom panel).

DISCUSSION

The present study is the first to investigate the direct effect of silver nanoparticles in primary human neutrophils. AgNP₂₀ were tested at different concentrations and were characterized by DLS under conditions identical to the experimental conditions used for investigating PMN cell physiology. This led to the observation that at a concentration of 100 μ g/ml, AgNP₂₀ induced large aggregate formation and altered human PMN cell physiology. However, at a concentration of 10 µg/ml AgNP_{20.} devoid of large aggregates, as assessed by DLS, these effects were not observed. Our results that 100 µg/ml AgNP₂₀ increased the cell size of PMNs concur with other studies which have reported that carbon black nanoparticles increased the cell size of macrophages which, like neutrophils, are cells of myeloid origin (Reisetter et al., 2011). We confirmed this effect of AgNP₂₀ on cell size using three distinct procedures: microscopic observation, flow cytometry, and confocal microscopy using Hoescht staining. AgNP₂₀ were rapidly internalized in human PMNs, as evidenced by TEM analysis, in accordance with the observed in cell size. AgNP₂₀ were localized in vacuole-like (or membrane-bound vesicles), as well as in the cytosol. These results are in agreement with those previously reported for carbon black NPs that were internalized by macrophages (Reisetter et al., 2011). In another study conducted with murine macrophages (Yen et al., 2009), AgNPs, as well as gold NPs (AuNPs), were observed inside the cells, as assessed by TEM, in agreement with our present data with human PMNs. Although the authors mentioned that NPs observed inside vesicles tend to make clusters, we did not observe any such a phenomenon in the vesicles. Using 45 and 13 nm AuNPs at concentrations of 20 µg/ml (AuNP₄₅) and 142 µg/ml (AuNP₁₃), Mironava et al. (2010) reported that, for both particle sizes, the NPs were sequestered inside large vacuoles and did not penetrate the nucleus or mitochondria in primary human dermal fibroblasts (Mironava et al., 2010). These findings are similar to our results, since we did not observe a distribution of AgNP₂₀ in the nucleus but, since human PMNs possess very few mitochondria (Geering et al., 2011), it remains difficult to analyse possible association/penetration of NPs with/in mitochondria. Hence, we have no evidence that AgNP₂₀ interacts with mitochondria in human PMNs; this remains to be determined and represents certain challenges. Although research regarding the interactions of AgNPs with cells is limited, AgNPs are known to enter cells of some macrophage cell lines where Ag metal can be degraded intracellularly, leading to the release of Ag⁺ ions which then alter mitochondrial activity and cause cell death (Pratsinis et al., 2013, R. P. Singh et al., 2012). Whether or not this occurs in human PMNs is unknown and remain to be determined. Of note, the concentrations of AgNPs used in the present study were in the range

used by others in in vitro studies (Arora et al., 2009; Rosas-Hernandez et al., 2009). We are aware that such concentrations might be high but, yet, no study has clearly indicated what are the concentrations of AgNPs that humans could be exposed daily. Such information is further complicated by the fact that AgNPs are included in several different compounds and at different NP sizes. In a health surveillance case study on two workers who manufacture silver nanomaterials, the blood levels of silver were ~0.02-0.03 μ g/dl with no significant findings on their health status (Lee et al., 2012). Although these concentrations are low when compared to those used in in vitro studies, this indicates that silver could, at least, reach the blood circulation. Further studies are however needed for drawing any conclusion.

To the best of our knowledge, our previous study reporting the anti-apoptotic property of TiO_2 NPs is the only study dealing with NPs and human PMN apoptosis (Goncalves et al., 2010). Here, in contrast to TiO₂, AgNP₂₀ induced apoptosis in human PMNs. This indicates that not all NPs act in a similar fashion, and that there is a potential need to identify the pro- or antiapoptotic activity of NPs. In general, agents known to delay human PMN apoptosis are known to induce de novo protein synthesis, while pro-apoptotic molecules inhibit de novo protein synthesis (Bouchard et al., 2004, Cox et al., 1997, D. Girard et al., 1997, Savoie et al., 2000). However, the anti-cancer drug arsenic trioxide (ATO) induced apoptosis in human PMNs and induced de novo protein synthesis, the only agent thus far shown to act like this in these cells (F. Binet et al., 2006). This can be explained by the fact that ATO induced the production of heat shock proteins involved in the unfolded protein responses and ER stress-mediated apoptotic pathway of cell apoptosis (F. Binet et al., 2010b). How NPs acting as pro-apoptotic agents would alter de novo protein synthesis in human PMNs has never been investigated until now. The fact that AgNP₂₀ aggregates inhibit *de novo* protein synthesis is important to better understand the mode of action of AgNPs. Interestingly, when used at 10 µg/ml, AgNP₂₀ did not de novo protein synthesis, nor were other effects reported in this study observed, alter suggesting an association with the observed effects and the formation of large aggregates.

Although the field of study of interactions between NPs and human neutrophils is in its infancy, the results of the present study indicate that, at 100 μ g/ml, AgNP₂₀ alter human PMN physiology resulting in increased cell size and inner complexity, induction of apoptosis and inhibition of *de novo* protein synthesis. We are aware that the effects could be somewhat related to potential release of Ag⁺ ions, but the present study was aimed at investigating the commercially available AgNPs as is. All of these effects were not observed at 10 μ g/ml. It is tempting to conclude that the only variable explaining this discrepancy is related to the appearance of large aggregates at

a concentration of 100 µg/ml. However, this is presently only speculative, since in addition to the different size distribution observed, we have to consider that other criteria could be involved. including the total surface area of the NPs and the probable liberation of Ag+ into the cytosol. This remains to be determined. Nevertheless, our observations suggest that the characterization of NPs should be performed using conditions identical to those used for evaluating a given biological effect. For example, serum is frequently added into the culture medium; given the existence of many proteins in human serum (~500 proteins were detected by 2D polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry (Adkins et al., 2002)), NPs may be rapidly covered/enveloped by proteins. This is even more significant in *in vivo* studies, especially when the biophysical properties of NPs can be modified by salt concentrations, pH, plasma proteins, etc., all of which can interfere with NP interactions with cells (Baumann et al., 2012). There are presently numerous studies in which characterization of NPs using TEM and/or DLS is performed in pure water or other diluents, but the NPs are then used in experimental conditions that are completely different from those used for characterization. The results of the present study attests to the importance of characterizing NPs under the same conditions (or as closely as possible) as the experimental conditions, particularly when the aim of a study is to compare, for example, the effects of a given NP at different diameters (starting size), since the biological activity observed may be caused by the presence of aggregates rather than simply the starting NP size.

ACKNOWLEGMENTS

The study was supported by grants from the Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (*IRSST*). We thank Mary Gregory for reading the manuscript.

Discussion et conclusion

Depuis les dernières années, la recherche en nanotoxicologie est plus active. Cela est dû à l'augmentation de l'utilisation des NP dans les divers secteurs et à l'intérêt constant des consommateurs et de l'industrie envers l'innocuité des produits (Araujo et al., 2014, De Jong et al., 2008, Li et al., 2014). Il a déjà été observé qu'une exposition aux AgNP pouvait induire des changements physiologiques et altérer les fonctions de différents types cellulaires (Arora et al., 2009, L. Braydich-Stolle et al., 2005, Carlson et al., 2008, Foldbjerg et al., 2009, Hussain et al., 2006). Aussi, puisqu'il a été démontré que d'autres types de NP, tels que ceux de TiO₂, CeO₂ et ZnO, avaient induit l'activation ou des changements physiologiques chez des PMN humains (Babin et al., 2013, Goncalves et al., 2010, Goncalves et al., 2014), nous avons voulu savoir si les AgNP pouvaient, elles aussi, induire des effets sur ces celluless. Cela nous a amené à formuler notre hypothèse de départ, c'est-à-dire que les AgNP peuvent induire des changements physiologiques et moduler l'apoptose des PMN humains. Nous avions deux objectifs principaux auxquels nous avons tenté de répondre. Le premier était de déterminer si les AgNP pouvaient altérer le taux d'apoptose des PMN humains. Le deuxième objectif était d'identifier si les AgNP induisaient des changements physiologiques chez ces derniers. Pour ce faire, nous avons observé les effets de différentes concentrations variant entre 10µg/mL à 100µg/mL. Les AgNP utilisées étaient composées d'un noyau d'argent et recouvertes de citrate. À notre connaissance, cette étude est la première à observer les effets des AgNP sur ce type cellulaire. De plus, les résultats cumulés lors des expériences nous ont permis de confirmer notre hypothèse et d'atteindre nos objectifs.

Les travaux fait sur les impacts des expositions aux AgNP sont importants puisqu'ils permettent de connaître l'apport que celles-ci peuvent avoir sur le développement des maladies autoimmunes. Les maladies auto-immunes sont des maladies causées par les attaques répétées du système immunitaire contre l'organisme qu'il est censé protéger. Les causes exactes de cellesci sont inconnues. Toutefois, il a été prouvé que la présence d'auto-anticorps, des complexes immuns et d'inflammation chronique possèdent un grand apport dans ces maladies (Ohyama et al., 2014, Rubartelli, 2014, Yaniv et al., 2014). L'efferocytose est le processus par lequel les cellules mourantes ou mortes sont éliminées par les phagocytes. Or, l'inflammation chronique peut être causée par une efferocytose déficiente due à des changements physiologiques chez les macrophages (Korns et al., 2011) ou chez les PMN (El Kebir et al., 2013). Ces changements peuvent être causés par une exposition aux NP. En effet, il a été observé qu'une exposition à de fortes concentrations de NP de TiO₂ peut augmenter la sécrétion des cytokines IL-1β, IL-6 et IL-10 chez les macrophages (Borgognoni et al., 2014). Aussi, il a été démontré que les NP de polystyrène peuvent affecter la phagocytose des macrophages (Firdessa et al., 2014). Chez les PMN humains, il a été observé que les NP de ZnO retardaient l'apoptose en induisant la synthèse protéique (Goncalves et al., 2014). Le déréglement du système immunitaire peut favoriser le développement de certaines maladies auto-immunes tels que : le lupus érythémateux disséminé (LED), la polyarthrite rhumatoïde (parfois appelée l'arthrite rhumatoïde), la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse (Fujii, 2014, Yaniv et al., 2014). Dans certaines maladies, telles les vasculites, il a été observé que les patients possédaient des anticorps antineutrophiles cytoplasmatiques (ANCA) (Bonatti et al., 2014, Schonermarck et al., 2014). Les ANCA sont des anticorps dirigés contre des antigènes du cytoplasme des PMN. Jusqu'à maintenant, quelques types d'ANCA ont été répertoriés selon leur site de fixation et peuvent aider à diagnostiquer les maladies (Kallenberg, 2014, McKinney et al., 2014, Sinico et al., 2014). Un des types est le p-ANCA, dont le site de fixation est au niveau périnucléaire. Certains p-ANCA ont comme cible la myéloperoxydase (MPO). Ces p-ANCA sont impliqués dans la granulomatose éosinophilique avec polyangéite (anciennement appelé le syndrome de Churg-Strauss) qui est un type de vasculite systémique (Gioffredi et al., 2014, Greco et al., 2014, Mouthon et al., 2014). Un autre type est le c-ANCA, celui-ci possède un site de fixation au niveau cytoplasmique. Des c-ANCA ciblant la protéinase 3 (qui est présente dans les granules des PMN) ont été identifiés et sont souvent retrouvés chez les patients atteints de la granulomatose avec polyangéite (qui porte parfois le nom de granulomatose de Wegener). Cette maladie est une vasculite qui peut s'attaquer à n'importe quel tissu mais surtout aux voies respiratoires: les voies nasales, les sinus, la trachée et les poumons (Comarmond et al., 2014, Tarzi et al., 2014). Un dernier type est le a-ANCA, celui-ci possède des sites de fixation atypique (à la fois cytoplasmique et périnucléaire) (Csernok et al., 2014). Ce type d'anticorps aurait été observé chez certaines personnes atteintes de polyarthrite rhumatoïde et de LED (Dalpe et al., 1993) et dans des cas de la maladie de Crohn et de la colite ulcéreuse (Zak-Golab et al., 2011). Il a été démontré qu'un délai de l'apoptose ou la présence de corps apoptotiques résiduels pouvaient expliquer la formation des ANCA. En effet, cela mènerait à l'exposition de molécules normalement séquestrées à l'intérieur de la cellule (Reumaux et al., 2004). Or, sous certaines conditions, les NP peuvent moduler l'apoptose des PMN et ainsi jouer un rôle dans la formation des ANCA. Ceci est une des raisons expliquant l'importance d'étudier les effets inflammatoires des NP sur les PMN.

De plus, les résultats obtenus lors de ce travail sont importants puisque nous connaissons peu des conséquences biologiques aux expositions à des AgNP. En effet, ceux-ci viennent s'ajouter à ce que nous connaissons déjà des effets toxicologiques des NP. Certaines NP possèdent des modèles toxicologiques différents (de par leur composition et de par les conditions environnementales rencontrées lors de l'absorption). En effet, l'absorption est la première étape du modèle et influence directement la distribution (Zoroddu et al., 2014). Les résultats obtenus avec les AgNP pourront aider à prédire le modèle toxicologique et, le cas échéant, à développer des méthodes de protection efficaces pour les gens qui y sont exposés.

Dans le deuxième chapitre, nous avons mentionné que l'absorption des NP varie selon la voie d'exposition. Cela nous amène à réfléchir aux voies d'expositions « alternatives ». Par exemple, dans le cas des AgNP, il pourrait s'agir des expositions faites en milieu hospitalier. Cela nous intéresse particulièrement puisque les AgNP sont souvent utilisées dans la conception du matériel hospitalier sous la forme d'onquents, bandages, pansements, cathéters, protèses, valves cardiaques, etc. (C. Gonzalez et al., 2014, Hebeish et al., 2014, R. Wang et al., 2014b, Wilkinson et al., 2011). En ce qui a trait aux expositions dermiques, il a été mentionné que plusieurs facteurs tels que l'espèce observée, la partie et la condition de la peau exposée (irritée ou blessée) peuvent influencer grandement l'absorption et la pénétration des NP (Lin et al., 2014). Or, dans un milieu hospitalier, il ne s'agit pas d'une exposition dermigue conventionnelle puisque, par l'usage fait du matériel, les AgNP contenues dans celui-ci peuvent entrer directement en contact avec la circulation sanguine. Ainsi, il y a la possibilité qu'une concentration supérieure à celle rencontrée dans la vie quotidienne soit atteinte. Des études in vitro témoignent que les AgNP contenues dans le matériel hospitalier sont non-toxiques envers diverses lignées cellulaires : fibroblastes et macrophages (Agarwala et al., 2014, Martinez-Gutierrez et al., 2013, Taheri et al., 2014). Pourtant, des effets toxiques ont été démontrés sur des fibroblastes humains (Avalos et al., 2014) et sur des cellules épithéliales bronchiques humaines (Gliga et al., 2014). Pour notre part, nous avons observés des résultats significatifs lors de nos expériences in vitro. La variation des résultats entre les différentes études in vitro soulignent l'importance de nos travaux. En effet, nous sommes encore au début de l'acquisition des connaissances des effets biologiques des NP. Ces variations peuvent être expliquées par le type cellulaire observé, la composition exacte des AgNP, la concentration testée ou encore par le milieu de culture utilisé lors des expériences. Cela nous indique que plus d'études doivent être faites afin de connaître les caractéristiques qui influencent ces résultats. En effet, il a été conseillé de faire un grand nombre d'études *in vitro* avant d'effectuer des expériences *in vivo* (Mukherjee et al., 2014). Nos travaux viennent donc s'ajouter aux connaissances actuelles.

En ce qui a trait aux expériences *in vivo*, nous avons déjà mentionné que les interactions protéiques formant la corona varient selon le chemin parcouru et que cette dernière influence l'absorption. Cela indique donc une des limites de nos travaux. En effet, on ne peut pas affirmer que les résultats observés lors de nos expériences *in vitro* représentent ce qui se produirait chez un individu. La réalité est beaucoup plus complexe et on ne peut pas extrapoler des conséquences à partir des résultats de nos travaux. En fait, certaines équipes déjà ont observé les effets des AgNP dans des modèles *in vivo*. Celles-ci démontrent des effets toxiques dont des dommages à l'ADN et la formation de ROS (Shrivastava *et al.*, 2014) et la modulation des cytokines pro-inflammatoires (Arai *et al.*, 2014) dans un modèle murin. Aussi, des dépôts d'argent au niveau des tissus pulmonaires et le recrutement des macrophages ont été observés chez le rat suite à une instillation intratrachéale (Anderson *et al.*, 2014). Puisque des effets significatifs ont été observés sur des modèles *in vivo*, cela indique qu'un plus grand nombre d'études, tant *in vitro* qu'*in vivo*, doivent être faites avant d'affirmer de l'innocuité de celles-ci.

À propos des concentrations auxquelles nous sommes exposées, nous nous sommes souvent demandés laquelle devrions-nous utiliser lors de nos expériences. C'est-à-dire, laquelle serait la plus susceptible d'être dans la circulation systémique et donc la plus représentative de la réalité. Malheureusement, il est difficile de connaître celle-ci puisqu'il est pratiquement impossible de connaître la concentration et la nature des NP auxquelles nous sommes exposés quotidiennement. À notre connaissance, il n'y a pas d'études qui porte sur la quantité, la composition et la synergie des différentes NP accumulées dans le corps humain lors d'une exposition quotidienne. Nous avons donc utilisé plusieurs concentrations différentes nous permettant d'avoir une variation.

Dans le but d'obtenir une direction, nous avons testés plusieurs concentrations d'AgNP variant entre 5µg/mL et 100µg/mL. La plupart des résultats étaient significatifs lorsque la concentration était supérieure à 50µg/mL. Cela propose que la concentration des AgNP doit atteindre un certain niveau pour représenter un danger. Par soucis de conformité et de comparaison entre les expériences, nous avons choisi d'observer principalement les effets de la concentration de

100µg/mL. Par la suite, nous nous sommes demandés s'il était possible, voir même fréquent, qu'un individu soit exposé à celle-ci. Tel qu'expliqué précédement, nous ne pouvons répondre précisément et nous croyons qu'il est nécessaire que des études soient faites afin de connaître la probabilité de cas comme celui-ci. En fait, nos travaux, comme ceux des autres laboratoires, observent des concentrations très variables. Malheureusement, on ne sait pas laquelle ou lesquelles représentent la réalité.

Ainsi, l'article présente les résultats obtenus lors d'expositions à différentes concentrations de AgNP. Il démontre tout d'abord qu'une exposition de vingt-quatre heures à la plus forte concentration observée, soit 100µg/mL, n'induit pas de dommage membranaire car aucune libération significative de LDH n'a été observée. Il montre aussi que la même concentration de AgNP n'induit pas de toxicité puisque le bleu de trypan était toujours exclu des cellules et ce, Toutefois, des changements même après une exposition de vingt-quatre heures. physiologiques tels que l'augmentation du volume cellulaire et de la complexité interne ont été observés grâce à la cytométrie en flux après seulement trente minutes. Ces mêmes résultats ont été confirmés par microscope optique après une exposition de vingt-quatre heures. Lors de ces observations, plusieurs concentrations ont été testées, mais puisque seule la concentration de 100µg/mL avait donné des résultats significatifs, nous avons gardé cette concentration pour faire l'examination au microscope confocal. Après une exposition de vingt-quatre heures, nous avons observé deux choses; la première est une augmentation du volume cellulaire et la deuxième est que le colorant Hoescht, qui colore l'AND, était diffus et distribué dans le cytosol. Nous nous sommes questionnés à savoir si ces résultats étaient la conséquence de l'internalisation des AgNP par les PMN. En effet, une étude a démontré, grâce au microscope confocal, une internalisation des AgNP par des cellules de type neuronales et des hépatocytes (Kennedy et al., 2014). Ainsi, nous avons voulu observer si cela avait eu lieu avec les PMN et, le cas échéant, du moment auquel cela se produisait. Nous avons donc fait plusieurs expositions dont les temps variaient entre une minute et vingt-quatre heures puis, nous avons observé les PMN par microscopie électronique à transmission (MET). Nous avons aperçu les AgNP internalisées dans des vacuoles et ce, seulement après une minute. Outre les vacuoles contenant les AgNP, la morphologie des PMN exposés aux AgNP semblait similaire à celle du témoin. Après un temps plus long, soit vingt-quatre heures, nous n'avons pas aperçu les AgNP ni les vacuoles contenant celles-ci. Cependant, le noyau des PMN était diffus (tout comme on l'avait déjà observé avec la coloration Hoescht au confoncal). Cela nous a semblé être un signe d'apoptose ou de dommages à l'ADN. Les deux cas de figure étaient possible puisque ceux-ci ont déjà été observés sur d'autres types cellulaires. Cela nous a donc incité faire l'observation de l'apoptose. Encore une fois, nous avons exposé les PMN à diverses concentrations de AgNP pendant des temps différents. Par la suite, nous avons coloré et observé les cellules sur des lames. La morphologie du noyau nous a permis de constater l'apoptose. Celle-ci fut constatée de manière significative lorsque les PMN étaient exposés à une concentration de 100µg/mL et ce, dès douze heures. En effet, le poucentage des cellules apoptotiques était d'environ 79% alors que celui du témoin était d'environ 38% (voir figure 4 en annexe). Nous avons démontré que cette tendance s'est maintenue après vingt-quatre heures.

Suite à cela, nous nous sommes questionnés sur les mécanismes induits par la concentration de 100µg/mL et dont une des conséquences est l'apoptose. Il est possible que cette dernière soit la résultante des dommages à l'ADN ou de la formation des ROS. En effet, ceux-ci ont été observés sur des monocytes humains (THP-1) (Foldbjerg et al., 2009), des fibroblastes murins (NIH 3T3) (Hsin et al., 2008), des hépatocytes murins (Arora et al., 2009) et des cellules du carcinome humain (HeLa S3) (Lubick, 2008). Dans le but de répondre à cette question, nous avons fait plusieurs expositions courtes (quinze, trente et soixante minutes) telles que répertoriées dans la littérature. La sonde utilisée fut la sonde H₂DCFDA et permet l'observation des ROS totaux. Aucune formation significative de ROS n'a été observée. Cependant, l'addition de sérum interfère avec la sonde. Aussi, il est conseillé d'effectuer l'expérience dans du HBSS plutôt que du RPMI. Cela peut sembler superflu dans le cas d'un autre type de stimulation, mais ceci est problématique dans le cas des NP. En effet, nous avons démontré que le milieu influence le potentiel zêta de la NP et que celui-ci prédit son comportement au niveau cellulaire. Cela pose un problème de conformité puisque les résultats obtenus avec l'utilisation de HBSS sans sérum ne peuvent pas être appliqués aux effets observés dans du RPMI avec sérum. Pour soutenir ces propos, la figure 5, placée en annexe, indique la modulation de l'apoptose selon le milieu. Les deux milieux ont été additionnés de sérum autologue décomplémenté, mais, dans un cas, il s'agit de HBSS et dans l'autre de RPMI. Nous pouvons observer que le taux d'apoptose des PMN n'est pas le même. Pourtant, dans les deux cas, il s'agit d'une exposition de vingt heures à 100µg/mL de AgNP. Ceci démontre que le milieu aurait un grand rôle à jouer au niveau des interactions cellulaires et au niveau de la dispersion des NP. Cela doit donc être pris en considération lorsque l'on souhaite observer et caractériser les NP (L. K. Braydich-Stolle et al., 2014). Ainsi, il est difficile d'affirmer que l'induction de l'apoptose par les AgNP n'est pas reliée aux ROS puisque l'absence de sérum et le HBSS utilisé lors de l'observation de ceux-ci changent l'identité de la NP et que cela influence ses interactions. L'équipe de Zhao J. a publié
un article concernant un protocole utilisant la sonde DCFH couplée à une peroxidase. Les auteurs affirment que ce protocole est optimal et que les artéfacts reliés aux interférences causées par les NP sont réduits au minimum. Malheureusement, ils ne semblent pas utiliser de sérum dans leur protocole (Zhao *et al.*, 2014). Un autre problème vient donc s'ajouter à celui de l'identité: les interférences causées par les NP. Il serait important de développer un protocole (peut-être modifier celui de l'équipe de Zhao) permettant d'observer la formation des ROS dans des conditions expérimentales conformes à celles des autres expériences. Malheureusement, il ne semble pas y avoir de méthode permettant de le faire pour l'instant. Le problème de l'identité de la NP est un problème généralisé lorsque l'on réalise des expériences avec les NP (soit au niveau de leurs caractérisations ou d'autres observations). Cela rappelle les limites de nos résultats qui sont le fruit des expériences *in vitro*. En effet, les fluides biologiques rencontrés par les NP dans le corps humain sont très différents de ceux utilisés en laboratoire. Les résultats de nos travaux sont donc des indicateurs de ce qui pourrait arriver dans certaines circonstances bien précises.

Par la suite, nous avons voulu connaître si l'exposition à 100µg/mL de AgNP induisait ou inhibait l'expression de protéine expliquant l'apoptose observée. Nous avons donc procédé à la synthèse de novo des protéines. Cette méthode permet d'observer la synthèse ou l'inhibition des protéines intracellulaires ou extracellulaires à un temps précis. Dans notre cas, nous avons exposé les PMN à deux différentes concentrations de AgNP, soit 10µg/mL et 100µg/mL et les avons incubés pendant vingt heures dans du RPMI-1640 auguel nous avons ajouté 10% de sérum autologue ainsi que de la méthionine marquée au soufre-35. Nous avons choisi ce temps d'exposition parce que c'est à ce moment que l'apoptose avait été observée et que nous voulions identifier des protéines permettant d'expliquer la modulation de l'apoptose. Nous avons récolté les cellules et leur surnageant et nous avons remarqué une inhibition totale de la synthèse protéique intracellulaire et extracellulaire à la concentration de 100µg/mL. Cette concentration est la même à laquelle nous avons observé l'induction significative de l'apoptose. Cependant, il faut bien comprendre que cette expérience nous permet d'observer les protéines qui sont synthétisées (et donc présentes) à un moment précis (dans notre cas vingt heures). Or, la modulation observée à vingt heures a commencé à être significative à partir de douze heures. Ainsi, il est possible que la modulation ait été affectée par des protéines présentes à ce moment, mais qui ne l'étaient plus à vingt heures ou que celles-ci soient déjà présentes dans le cytosol et donc, qui ne peuvent pas être observées à l'aide de cette technique. Il serait donc intéressant de faire la même expérience à un temps plus court pour voir si des protéines apparaissent (ou disparaissent). Un séquençage pourra permettre leur identification et cela nous donnera une indication du mécanisme qui affecte l'apoptose.

Puisque nous connaissons le rôle important des cytokines inflammatoires dans la réponse immunitaire, nous avons voulu observer si une modulation d'IL-8 avait lieu lorsque les PMN étaient exposés à 100µg/mL de AgNP. Nous avons donc fait une exposition de vingt heures et nous avons remarqué la présence d'une forte concentration, soit \approx 42 000pg/mL (voir figure 6 (A) en annexe). Après l'observation de ce résultat, nous avons voulu savoir si cette forte concentration d'IL-8 pouvait être une des causes de l'apoptose observée. Nous avons donc exposé les PMN à diverses concentrations d'IL-8 pour finalement observer que celle-ci n'avait pas d'effet sur la modulation de l'apoptose (voir figure 6 (B) en annexe). L'apoptose serait donc indépendante de la présence d'IL-8.

À la lumière des résultats compilés, nous pouvons affirmer que les AgNP, sous certaines conditions, peuvent induire des changements physiologiques chez les PMN humains. Ceci nous indique que d'autres expériences doivent être faites afin de mieux connaître leurs effets ainsi que leurs mécanismes. Tout d'abord, il serait important de connaître les conditions et les variables qui influencent le comportement des NP. Ces connaissances seraient utiles puisqu'elles permettraient l'utilisation de conditions similaires afin que les techniques d'expérimentation in vitro représentent plus fidèlement la réalité. Ensuite, il serait intéressant d'observer, via d'autres tests immuno-enzymatiques, si les AgNP modulent d'autres cytokines inflammatoires que l'IL-8. Aussi, il serait important, s'il y a une modulation, d'examiner si celle-ci a des impacts sur d'autres fonctions. En effet, la variation de l'expression de cytokines inflammatoires peut affecter des fonctions importantes telles la transmigration tissulaire ou la phagocytose. Ces fonctions possèdent une importance capitale dans la réponse immunitaire et ne doivent pas être affectées. Pour y répondre, des tests de chimiotactisme et de phagocytose pourraient être effectués. Finalement, il serait intéressant d'examiner les conséquences de la synergie créée par la présence des différentes NP. En effet, il est évident qu'une association peut se produire entre les NP puisque nous sommes soumis à plusieurs sources d'expositions. La somme de ces connaissances permettront de développer un usage performant et inoffensif des NP.

ANNEXE



12h

Figure 4 : Pourcentage de cellules apoptotiques après une exposition de 12 heures à 10µg/mL et 100µg/mL de nanoparticules d'argent

Nous avons isolé les PMN et les avons exposés à divers agonistes dans du RPMI-1640 additionné de 10% de sérum autologue décomplémenté. La concentration de PMN était de 10×10^6 cellules /mL. Nous avons incubé les cellules dans une plaque de 96 puits à 37°C et à 5% de CO₂ pendant douze heures. Les cellules exposées à 10µg/mL de AgNP ont un pourcentage de cellules apoptotiques significatif (en comparaison au témoin). Pour leurs parts, les cellules exposées à 10µg/mL de AgNP n'induisent pas de résultats significatifs.



Figure 5 : Pourcentage de cellules apoptotiques selon le milieu (HBSS versus RPMI-1640 avec sérum autologue décomplémenté) lors d'une exposition de 20 heures à une concentration de 100µg/mL de nanoparticules d'argent

Nous avons isolé les PMN et les avons exposés à 100µg/mL de AgNP soit dans du HBSS ou dans du RPMI-1640. Dans les deux cas, les milieux de culture étaient additionnés de 10% de sérum autologue décomplémenté. La concentration de PMN était de 10 x 10⁶ cellules /mL. Nous avons incubé les cellules dans une plaque de 96 puits à 37°C et à 5% de CO₂ pendant vingt heures. Le pourcentage de cellules apoptotiques varie selon le milieu de culture. Après l'exposition, le pourcentage de cellules apoptotiques et significatif si celles-ci sont exposées à 100µg/mL de AgNP dans du RPMI-1640 (en comparaison avec témoin) mais non significatif si le milieu est du HBSS.



Figure 6 : (A) Concentration d'IL-8 libérée par les neutrophiles après une exposition de 20 heures à $10\mu g/mL$ et à $100\mu g/mL$ de nanoparticules d'argent, (B) Influence de la concentration d'IL-8 sur la modulation de l'apoptose des neutrophiles

(A) Nous avons isolé les PMN, les avons exposés à divers agonistes (HBSS, 10 ou 100µg/mL de AgNP) et incubés dans du RPMI-1640 additionné de 10% de sérum autologue décomplémenté. La concentration de PMN était de 10 x 10⁶ cellules /mL. Nous avons incubé les cellules dans une plaque de 96 puits à 37°C et à 5% de CO₂ pendant vingt heures. Après l'exposition, nous avont récolté le surnageant et procédé à un test immuno-enzymatique. Les PMN ayant été exposés à 100µg/mL de AgNP ont libéré environ 42 000pg/mL d'IL-8, cette concentration est significative lorsqu'on la compare au témoin. L'exposition à 10µg/mL de AgNP n'a pas eu d'effet significatif (A).

(B) Nous avons isolé les PMN, les avons exposés à diverses concentration d'IL-8 et incubés dans du RPMI-1640 additionné de 10% de sérum autologue décomplémenté. La concentration de PMN était de 10 x 10⁶ cellules /mL. Nous avons incubé les cellules dans une plaque de 96 puits à 37°C et à 5% de CO₂ pendant vingt heures. Après l'exposition, nous avont récolté les cellules et procédé à une coloration permettant d'observer le taux de cellules apoptotiques. On remarque que les différentes concentrations d'IL-8 n'ont pas modulé les taux de cellules apoptotiques (B).

Liste de références

- Adkins JN, Varnum SM, Auberry KJ, Moore RJ, Angell NH, Smith RD, Springer DL & Pounds JG (2002) Toward a human blood serum proteome: analysis by multidimensional separation coupled with mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 1(12):947-955.
- Agarwala M, Barman T, Gogoi D, Choudhury B, Pal AR & Yadav RN (2014) Highly effective antibiofilm coating of silver-polymer nanocomposite on polymeric medical devices deposited by one step plasma process. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 102(6):1223-1235.
- Ahamed M, Alsalhi MS & Siddiqui MK (2010) Silver nanoparticle applications and human health. *Clin Chim Acta* 411(23-24):1841-1848.
- Ahamed M, Karns M, Goodson M, Rowe J, Hussain SM, Schlager JJ & Hong Y (2008) DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 233(3):404-410.
- Albanese A, Walkey CD, Olsen JB, Guo H, Emili A & Chan WC (2014) Secreted biomolecules alter the biological identity and cellular interactions of nanoparticles. *ACS Nano* 8(6):5515-5526.
- Ali D (2014) Oxidative Stress-Mediated Apoptosis and Genotoxicity Induced by Silver Nanoparticles in Freshwater Snail Lymnea luteola L. *Biol Trace Elem Res* 162(1-3):333-341.
- Allouni ZE, Cimpan MR, Hol PJ, Skodvin T & Gjerdet NR (2009) Agglomeration and sedimentation of TiO2 nanoparticles in cell culture medium. *Colloids Surf B Biointerfaces* 68(1):83-87.
- Anderson DS, Silva RM, Lee D, Edwards PC, Sharmah A, Guo T, Pinkerton KE & Van Winkle LS (2014) Persistence of silver nanoparticles in the rat lung: Influence of dose, size, and chemical composition. *Nanotoxicology* 10.3109/17435390.2014.958116:1-12.
- Arai Y, Miyayama T & Hirano S (2014) Difference in the toxicity mechanism between ion and nanoparticle forms of silver in the mouse lung and in macrophages. *Toxicology* 328C:84-92.
- Araujo F, Shrestha N, Granja PL, Hirvonen J, Santos HA & Sarmento B (2014) Safety and toxicity concerns of orally delivered nanoparticles as drug carriers. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 10.1517/17425255.2015.992781:1-13.

- Arora S, Jain J, Rajwade JM & Paknikar KM (2008) Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies. *Toxicol Lett* 179(2):93-100.
- Arora S, Jain J, Rajwade JM & Paknikar KM (2009) Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 236(3):310-318.
- Arora S, Rajwade JM & Paknikar KM (2012) Nanotoxicology and in vitro studies: the need of the hour. *Toxicol Appl Pharmacol* 258(2):151-165.
- Avalos A, Haza AI, Mateo D & Morales P (2014) Interactions of manufactured silver nanoparticles of different sizes with normal human dermal fibroblasts. *Int Wound J* 10.1111/iwj.12244.
- Babin K, Antoine F, Goncalves DM & Girard D (2013) TiO2, CeO2 and ZnO nanoparticles and modulation of the degranulation process in human neutrophils. *Toxicol Lett* 221(1):57-63.
- Bartneck M, Keul HA, Singh S, Czaja K, Bornemann J, Bockstaller M, Moeller M, Zwadlo-Klarwasser G & Groll J (2010) Rapid uptake of gold nanorods by primary human blood phagocytes and immunomodulatory effects of surface chemistry. ACS Nano 4(6):3073-3086.
- Basran A, Jabeen M, Bingle L, Stokes CA, Dockrell DH, Whyte MK, Walmsley SR, Higgins KR, Vogel SN, Wilson HL, Prince LR, Prestwich EC, Sabroe RA, Parker LC & Sabroe I (2013) Roles of neutrophils in the regulation of the extent of human inflammation through delivery of IL-1 and clearance of chemokines. *J Leukoc Biol* 93(1):7-19.
- Baumann D, Hofmann D, Nullmeier S, Panther P, Dietze C, Musyanovych A, Ritz S, Landfester K & Mailander V (2012) Complex encounters: nanoparticles in whole blood and their uptake into different types of white blood cells. *Nanomedicine* 31:31.
- Beasley DG & Meyer TA (2010) Characterization of the UVA protection provided by avobenzone, zinc oxide, and titanium dioxide in broad-spectrum sunscreen products. *Am J Clin Dermatol* 11(6):413-421.
- Beer C, Foldbjerg R, Hayashi Y, Sutherland DS & Autrup H (2012) Toxicity of silver nanoparticles nanoparticle or silver ion? *Toxicol Lett* 208(3):286-292.
- Belon C, Gannoun-Zaki L, Lutfalla G, Kremer L & Blanc-Potard AB (2014) Mycobacterium marinum MgtC Plays a Role in Phagocytosis but is Dispensable for Intracellular Multiplication. *PLoS One* 9(12):e116052.
- Besinis A, De Peralta T & Handy RD (2014) Inhibition of biofilm formation and antibacterial properties of a silver nano-coating on human dentine. *Nanotoxicology* 8(7):745-754.

- Beyrau M, Bodkin JV & Nourshargh S (2012) Neutrophil heterogeneity in health and disease: a revitalized avenue in inflammation and immunity. *Open Biol* 2(11):120134.
- Binet F, Cavalli H, Moisan E & Girard D (2006) Arsenic trioxide (AT) is a novel human neutrophil pro-apoptotic agent: effects of catalase on AT-induced apoptosis, degradation of cytoskeletal proteins and de novo protein synthesis. *Br J Haematol* 132(3):349-358.
- Binet F, Chiasson S & Girard D (2008) Arsenic trioxide induces de novo protein synthesis of annexin-1 in neutrophils: association with a heat shock-like response and not apoptosis. *Br J Haematol* 140(4):454-463.
- Binet F, Chiasson S & Girard D (2010a) Arsenic trioxide induces endoplasmic reticulum stress-related events in neutrophils. *Int Immunopharmacol* 10(4):508-512.
- Binet F, Chiasson S & Girard D (2010b) Evidence that endoplasmic reticulum (ER) stress and caspase-4 activation occur in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 391(1):18-23.
- Bonatti F, Reina M, Neri TM & Martorana D (2014) Genetic Susceptibility to ANCA-Associated Vasculitis: State of the Art. *Front Immunol* 5:577.
- Borgognoni CF, Mormann M, Qu Y, Schafer M, Langer K, Ozturk C, Wagner S, Chen C, Zhao Y, Fuchs H & Riehemann K (2014) Reaction of human macrophages on protein corona covered TiO nanoparticles. *Nanomedicine* 10.1016/j.nano.2014.10.001.

Borregaard N (2010) Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 33(5):657-670.

- Bouchard A, Ratthe C & Girard D (2004) Interleukin-15 delays human neutrophil apoptosis by intracellular events and not via extracellular factors: role of Mcl-1 and decreased activity of caspase-3 and caspase-8. *J Leukoc Biol* 75(5):893-900.
- Bowden LP, Royer MC, Hallman JR, Lewin-Smith M & Lupton GP (2011) Rapid onset of argyria induced by a silver-containing dietary supplement. *J Cutan Pathol* 38(10):832-835.
- Bratton DL & Henson PM (2011) Neutrophil clearance: when the party is over, clean-up begins. *Trends Immunol* 32(8):350-357.
- Braydich-Stolle L, Hussain S, Schlager JJ & Hofmann MC (2005) In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicol Sci* 88(2):412-419.
- Braydich-Stolle LK, Breitner EK, Comfort KK, Schlager JJ & Hussain SM (2014) Dynamic characteristics of silver nanoparticles in physiological fluids: toxicological implications. *Langmuir* 30(50):15309-15316.

- Brinkmann V & Zychlinsky A (2007) Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol* 5(8):577-582.
- Brinkmann V & Zychlinsky A (2012) Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol* 198(5):773-783.
- Brown DM, Donaldson K, Borm PJ, Schins RP, Dehnhardt M, Gilmour P, Jimenez LA & Stone V (2004) Calcium and ROS-mediated activation of transcription factors and TNFalpha cytokine gene expression in macrophages exposed to ultrafine particles. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286(2):L344-353.
- Buzea C, Pacheco, II & Robbie K (2007) Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases* 2(4):MR17-71.
- Carbone F, Vuilleumier N, Bertolotto M, Burger F, Galan K, Roversi G, Tamborino C, Casetta I, Seraceni S, Trentini A, Dallegri F, da Silva AR, Pende A, Artom N, Mach F, Coen M, Fainardi E & Montecucco F (2014) Treatment with recombinant tissue plasminogen activator (r-TPA) induces neutrophil degranulation in vitro via defined pathways. *Vascul Pharmacol* 10.1016/j.vph.2014.11.007.
- Carlson C, Hussain SM, Schrand AM, Braydich-Stolle LK, Hess KL, Jones RL & Schlager JJ (2008) Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *J Phys Chem B* 112(43):13608-13619.
- Cassatella MA, Tamassia N, Crepaldi L, McDonald PP, Ear T, Calzetti F, Gasperini S, Zanderigo F & Bazzoni F (2005) Lipopolysaccharide primes neutrophils for a rapid response to IL-10. *Eur J Immunol* 35(6):1877-1885.
- Cha K, Hong HW, Choi YG, Lee MJ, Park JH, Chae HK, Ryu G & Myung H (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.
- Chatterjee K, Sarkar S, Jagajjanani Rao K & Paria S (2014) Core/shell nanoparticles in biomedical applications. *Adv Colloid Interface Sci* 209:8-39.
- Chen X & Schluesener HJ (2008) Nanosilver: a nanoproduct in medical application. *Toxicol Lett* 176(1):1-12.
- Chien W, Ding LW, Sun QY, Torres-Fernandez LA, Tan SZ, Xiao J, Lim SL, Garg M, Lee KL, Kitajima S, Takao S, Leong WZ, Sun H, Tokatly I, Poellinger L, Gery S & Koeffler PH (2014) Selective inhibition of unfolded protein response induces apoptosis in pancreatic cancer cells. *Oncotarget*.

- Christenson K, Bjorkman L, Karlsson A & Bylund J (2013) Regulation of neutrophil apoptosis differs after in vivo transmigration to skin chambers and synovial fluid: a role for inflammasome-dependent interleukin-1beta release. *J Innate Immun* 5(4):377-388.
- Chung IS, Lee MY, Shin DH & Jung HR (2010) Three systemic argyria cases after ingestion of colloidal silver solution. *Int J Dermatol* 49(10):1175-1177.
- Comarmond C & Cacoub P (2014) Granulomatosis with polyangiitis (Wegener): Clinical aspects and treatment. *Autoimmun Rev* 13(11):1121-1125.
- Cox G & Austin RC (1997) Dexamethasone-induced suppression of apoptosis in human neutrophils requires continuous stimulation of new protein synthesis. *J Leukoc Biol* 61(2):224-230.
- Croker BA, O'Donnell JA, Nowell CJ, Metcalf D, Dewson G, Campbell KJ, Rogers KL, Hu Y, Smyth GK, Zhang JG, White M, Lackovic K, Cengia LH, O'Reilly LA, Bouillet P, Cory S, Strasser A & Roberts AW (2011) Fas-mediated neutrophil apoptosis is accelerated by Bid, Bak, and Bax and inhibited by Bcl-2 and Mcl-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(32):13135-13140.
- Cross SE, Innes B, Roberts MS, Tsuzuki T, Robertson TA & McCormick P (2007) Human skin penetration of sunscreen nanoparticles: in-vitro assessment of a novel micronized zinc oxide formulation. *Skin Pharmacol Physiol* 20(3):148-154.
- Csernok E & Moosig F (2014) Current and emerging techniques for ANCA detection in vasculitis. *Nat Rev Rheumatol* 10(8):494-501.
- Dalboni TM, Abe AE, de Oliveira CE, Lara VS, Campanelli AP, Gasparoto CT & Gasparoto TH (2013) Activation profile of CXCL8-stimulated neutrophils and aging. *Cytokine* 61(3):716-719.
- Dalpe G, Fernandes F, Richard C, Boire G & Menard HA (1993) Heterogeneity of ANCA sera showing atypical, peripheral and classical cytoplasmic immunofluorescence patterns. *Adv Exp Med Biol* 336:239-243.
- De Jong WH & Borm PJ (2008) Drug delivery and nanoparticles:applications and hazards. *Int J Nanomedicine* 3(2):133-149.
- Devi P, Patil SD, Jeevanandam P, Navani NK & Singla ML (2014) Synthesis, characterization and bactericidal activity of silica/silver core-shell nanoparticles. *J Mater Sci Mater Med* 10.1007/s10856-014-5165-9.
- Dos Santos CA, Seckler MM, Ingle AP, Gupta I, Galdiero S, Galdiero M, Gade A & Rai M (2014) Silver Nanoparticles: Therapeutical Uses, Toxicity, and Safety Issues. *J Pharm Sci* 10.1002/jps.24001.

- Duran N, Marcato PD, Alves OL, Souza GI & Esposito E (2005) Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several Fusarium oxysporum strains. *J Nanobiotechnology* 3:8.
- El Kebir D & Filep JG (2010) Role of neutrophil apoptosis in the resolution of inflammation. *ScientificWorldJournal* 10:1731-1748.
- El Kebir D & Filep JG (2013) Targeting neutrophil apoptosis for enhancing the resolution of inflammation. *Cells* 2(2):330-348.
- El-Benna J, Dang PM & Gougerot-Pocidalo MA (2008) Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. *Semin Immunopathol* 30(3):279-289.
- Elechiguerra JL, Burt JL, Morones JR, Camacho-Bragado A, Gao X, Lara HH & Yacaman MJ (2005) Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *J Nanobiotechnology* 3:6.
- Esmann L, Idel C, Sarkar A, Hellberg L, Behnen M, Moller S, van Zandbergen G, Klinger M, Kohl J, Bussmeyer U, Solbach W & Laskay T (2010) Phagocytosis of apoptotic cells by neutrophil granulocytes: diminished proinflammatory neutrophil functions in the presence of apoptotic cells. *J Immunol* 184(1):391-400.
- Figueroa JA, Wrobel K, Afton S, Caruso JA, Corona Felix Gutierrez J & Wrobel K (2008) Effect of some heavy metals and soil humic substances on the phytochelatin production in wild plants from silver mine areas of Guanajuato, Mexico. *Chemosphere* 70(11):2084-2091.
- Foldbjerg R, Olesen P, Hougaard M, Dang DA, Hoffmann HJ & 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.
- Forsberg M, Druid P, Zheng L, Stendahl O & Sarndahl E (2003) Activation of Rac2 and Cdc42 on Fc and complement receptor ligation in human neutrophils. *J Leukoc Biol* 74(4):611-619.
- Fox S, Leitch AE, Duffin R, Haslett C & Rossi AG (2010) Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. *J Innate Immun* 2(3):216-227.
- Fridman WH (1991) Fc receptors and immunoglobulin binding factors. *FASEB J* 5(12):2684-2690.
- Fujii T (2014) Direct and indirect pathogenic roles of autoantibodies in systemic autoimmune diseases. *Allergol Int* 63(4):515-522.

- Futosi K, Fodor S & Mocsai A (2013) Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int Immunopharmacol* 17(3):638-650.
- Gabelloni ML, Trevani AS, Sabatte J & Geffner J (2013) Mechanisms regulating neutrophil survival and cell death. *Semin Immunopathol* 35(4):423-437.
- Gaiser BK, Hirn S, Kermanizadeh A, Kanase N, Fytianos K, Wenk A, Haberl N, Brunelli A, Kreyling W & Stone V (2012) Effects of Silver Nanoparticles on the Liver and Hepatocytes in vitro. *Toxicol Sci* 10.1093/toxsci/kfs306.
- Ge C, Du J, Zhao L, Wang L, Liu Y, Li D, Yang Y, Zhou R, Zhao Y, Chai Z & Chen C (2011) Binding of blood proteins to carbon nanotubes reduces cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(41):16968-16973.
- Geering B & Simon HU (2011) Peculiarities of cell death mechanisms in neutrophils. *Cell Death Differ* 18(9):1457-1469.
- Gioffredi A, Maritati F, Oliva E & Buzio C (2014) Eosinophilic granulomatosis with polyangiitis: an overview. *Front Immunol* 5:549.
- Giovanni M, Tay CY, Inggrid Setyawati M, Xie J, Ong CN, Fan R, Yue J, Zhang L & Tai Leong D (2014) Toxicity profiling of water contextual zinc oxide, silver, and titanium dioxide nanoparticles in human oral and gastrointestinal cell systems. *Environ Toxicol* 10.1002/tox.22015.
- Girard D, Paquet ME, Paquin R & Beaulieu AD (1996) Differential effects of interleukin-15 (IL-15) and IL-2 on human neutrophils: modulation of phagocytosis, cytoskeleton rearrangement, gene expression, and apoptosis by IL-15. *Blood* 88(8):3176-3184.
- Girard D, Paquin R & Beaulieu AD (1997) Responsiveness of human neutrophils to interleukin-4: induction of cytoskeletal rearrangements, de novo protein synthesis and delay of apoptosis. *Biochem J* 325 (Pt 1):147-153.
- Gliga AR, Skoglund S, Wallinder IO, Fadeel B & Karlsson HL (2014) Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release. *Part Fibre Toxicol* 11:11.
- Goncalves DM, Chiasson S & Girard D (2010) Activation of human neutrophils by titanium dioxide (TiO2) nanoparticles. *Toxicol In Vitro* 24(3):1002-1008.
- Goncalves DM & Girard D (2011) Titanium dioxide (TiO2) nanoparticles induce neutrophil influx and local production of several pro-inflammatory mediators in vivo. *Int Immunopharmacol* 11(8):1109-1115.

- Goncalves DM & Girard D (2014) Zinc oxide nanoparticles delay human neutrophil apoptosis by a de novo protein synthesis-dependent and reactive oxygen species-independent mechanism. *Toxicol In Vitro* 28(5):926-931.
- Gonzalez C, Rosas-Hernandez H, Ramirez-Lee MA, Salazar-Garcia S & Ali SF (2014) Role of silver nanoparticles (AgNPs) on the cardiovascular system. *Arch Toxicol* 10.1007/s00204-014-1447-8.
- Gonzalez RC & Gonzalez-Chavez MC (2006) Metal accumulation in wild plants surrounding mining wastes. *Environ Pollut* 144(1):84-92.
- Greco A, Rizzo MI, De Virgilio A, Gallo A, Fusconi M, Ruoppolo G, Altissimi G & De Vincentiis M (2014) Churg-Strauss syndrome. *Autoimmun Rev* 10.1016/j.autrev.2014.12.004.
- Greulich C, Kittler S, Epple M, Muhr G & Koller M (2009) Studies on the biocompatibility and the interaction of silver nanoparticles with human mesenchymal stem cells (hMSCs). *Langenbecks Arch Surg* 394(3):495-502.
- Gutierrez-Pineda E, Alcaide F, Rodriguez-Presa MJ, Bolzan AE & Gervasi CA (2015) Electrochemical Preparation and Characterization of Polypyrrole/Stainless Steel Electrodes Decorated with Gold Nanoparticles. *ACS Appl Mater Interfaces* 10.1021/am507733b.
- Haase A, Arlinghaus HF, Tentschert J, Jungnickel H, Graf P, Mantion A, Draude F, Galla S, Plendl J, Goetz ME, Masic A, Meier W, Thunemann AF, Taubert A & Luch A (2011) Application of laser postionization secondary neutral mass spectrometry/time-of-flight secondary ion mass spectrometry in nanotoxicology: visualization of nanosilver in human macrophages and cellular responses. *ACS Nano* 5(4):3059-3068.
- Hachicho N, Hoffmann P, Ahlert K & Heipieper HJ (2014) Effect of silver nanoparticles and silver ions on growth and adaptive response mechanisms of Pseudomonas putida mt-2. *FEMS Microbiol Lett* 355(1):71-77.
- Hadrup N & Lam HR (2014) Oral toxicity of silver ions, silver nanoparticles and colloidal silver--a review. *Regul Toxicol Pharmacol* 68(1):1-7.
- Hebeish A, El-Rafie MH, El-Sheikh MA, Seleem AA & El-Naggar ME (2014) Antimicrobial wound dressing and anti-inflammatory efficacy of silver nanoparticles. *Int J Biol Macromol* 65:509-515.
- Hsiao IL & Huang YJ (2013) Effects of serum on cytotoxicity of nano- and micro-sized ZnO particles. *J Nanopart Res* 15:1829.

- Hsin YH, Chen CF, Huang S, Shih TS, Lai PS & Chueh PJ (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.
- Husen A & Siddiqi KS (2014) Phytosynthesis of nanoparticles: concept, controversy and application. *Nanoscale Res Lett* 9(1):229.
- Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM, Geiss KT & Schlager JJ (2005) In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol In Vitro* 19(7):975-983.
- Hussain SM, Javorina AK, Schrand AM, Duhart HM, Ali SF & Schlager JJ (2006) The interaction of manganese nanoparticles with PC-12 cells induces dopamine depletion. *Toxicol Sci* 92(2):456-463.
- Ishida K, Cipriano TF, Rocha GM, Weissmuller G, Gomes F, Miranda K & Rozental S (2014) Silver nanoparticle production by the fungus Fusarium oxysporum: nanoparticle characterisation and analysis of antifungal activity against pathogenic yeasts. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 109(2):220-228.
- Ishii Y, Lo SK & Malik AB (1992) Neutrophil adhesion to TNF alpha-activated endothelial cells potentiates leukotriene B4 production. *J Cell Physiol* 153(1):187-195.
- Jefferson KK & Cerca N (2006) Bacterial-bacterial cell interactions in biofilms: detection of polysaccharide intercellular adhesins by blotting and confocal microscopy. *Methods Mol Biol* 341:119-126.
- Jeong GN, Jo UB, Ryu HY, Kim YS, Song KS & Yu IJ (2010) Histochemical study of intestinal mucins after administration of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Arch Toxicol* 84(1):63-69.
- Johnson J, Jirikowic J, Bertram M, van Beers D, Gordon RB, Henderson K, Klee RJ, Lanzano T, Lifset R, Oetjen L & Graedel TE (2005) Contemporary anthropogenic silver cycle: a multilevel analysis. *Environ Sci Technol* 39(12):4655-4665.
- Kalishwaralal K, BarathManiKanth S, Pandian SR, Deepak V & Gurunathan S (2010) Silver nanoparticles impede the biofilm formation by Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus epidermidis. *Colloids Surf B Biointerfaces* 79(2):340-344.
- Kallenberg CG (2014) Key advances in the clinical approach to ANCA-associated vasculitis. *Nat Rev Rheumatol* 10(8):484-493.
- Kasama T, Miwa Y, Isozaki T, Odai T, Adachi M & Kunkel SL (2005) Neutrophil-derived cytokines: potential therapeutic targets in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4(3):273-279.

- Kasama T, Strieter RM, Standiford TJ, Burdick MD & Kunkel SL (1993) Expression and regulation of human neutrophil-derived macrophage inflammatory protein 1 alpha. *J Exp Med* 178(1):63-72.
- Kathe N, Henriksen B & Chauhan H (2014) Physicochemical characterization techniques for solid lipid nanoparticles: principles and limitations. *Drug Dev Ind Pharm* 40(12):1565-1575.
- Kawata K, Osawa M & Okabe S (2009) In vitro toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells. *Environ Sci Technol* 43(15):6046-6051.
- Kennedy DC, Orts-Gil G, Lai C, Muller L, Haase A, Luch A & Seeberger PH (2014) Carbohydrate functionalization of silver nanoparticles modulates cytotoxicity and cellular uptake. *J Nanobiotechnology* 12(1):59.
- Kholoud M.M. Abou El-Nour AaE, Abdulrhman Al-Warthan, Reda A.A. Ammar (2008) Synthesis and applications of silver nanoparticles. *Arabian Journal of Chemistry* 3:135-140.
- Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Park SJ, Lee HJ, Kim SH, Park YK, Park YH, Hwang CY, Kim YK, Lee YS, Jeong DH & Cho MH (2007) Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine* 3(1):95-101.
- Kim YS, Kim JS, Cho HS, Rha DS, Kim JM, Park JD, Choi BS, Lim R, Chang HK, Chung YH, Kwon IH, Jeong J, Han BS & Yu IJ (2008) Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Inhal Toxicol* 20(6):575-583.
- Kim YS, Song MY, Park JD, Song KS, Ryu HR, Chung YH, Chang HK, Lee JH, Oh KH, Kelman BJ, Hwang IK & Yu IJ (2010) Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles. *Part Fibre Toxicol* 7:20.
- Kora AJ & Rastogi L (2013) Enhancement of antibacterial activity of capped silver nanoparticles in combination with antibiotics, on model gram-negative and grampositive bacteria. *Bioinorg Chem Appl* 2013:871097.
- Korani M, Rezayat SM & Arbabi Bidgoli S (2013) Sub-chronic Dermal Toxicity of Silver Nanoparticles in Guinea Pig: Special Emphasis to Heart, Bone and Kidney Toxicities. *Iran J Pharm Res* 12(3):511-519.
- Korani M, Rezayat SM, Gilani K, Arbabi Bidgoli S & Adeli S (2011) Acute and subchronic dermal toxicity of nanosilver in guinea pig. *Int J Nanomedicine* 6:855-862.
- Korns D, Frasch SC, Fernandez-Boyanapalli R, Henson PM & Bratton DL (2011) Modulation of macrophage efferocytosis in inflammation. *Front Immunol* 2:57.

- Kotone-Miyahara Y, Yamashita K, Lee KK, Yonehara S, Uchiyama T, Sasada M & Takahashi A (2004) Short-term delay of Fas-stimulated apoptosis by GM-CSF as a result of temporary suppression of FADD recruitment in neutrophils: evidence implicating phosphatidylinositol 3-kinase and MEK1-ERK1/2 pathways downstream of classical protein kinase C. J Leukoc Biol 76(5):1047-1056.
- Krzyzowska M, Baska P, Grochowska A, Orlowski P, Nowak Z & Winnicka A (2014) Fas/FasL pathway participates in resolution of mucosal inflammatory response early during HSV-2 infection. *Immunobiology* 219(1):64-77.
- Kulthong K, Srisung S, Boonpavanitchakul K, Kangwansupamonkon W & Maniratanachote R (2010) Determination of silver nanoparticle release from antibacterial fabrics into artificial sweat. *Part Fibre Toxicol* 7:8
- Lavastre V, Pelletier M, Saller R, Hostanska K & Girard D (2002) Mechanisms involved in spontaneous and Viscum album agglutinin-I-induced human neutrophil apoptosis: Viscum album agglutinin-I accelerates the loss of antiapoptotic Mcl-1 expression and the degradation of cytoskeletal paxillin and vimentin proteins via caspases. *J Immunol* 168(3):1419-1427.
- Leite-Silva VR, Lamer ML, Sanchez WY, Liu DC, Sanchez WH, Morrow I, Martin D, Silva HD, Prow TW, Grice JE & Roberts MS (2013) The effect of formulation on the penetration of coated and uncoated zinc oxide nanoparticles into the viable epidermis of human skin in vivo. *Eur J Pharm Biopharm* 10.1016/j.ejpb.2013.01.020.
- Li X, Liu W, Sun L, K EA, Yu B, Fan Y, Feng Q, Cui F & Watari F (2014) Effects of physicochemical properties of nanomaterials on their toxicity. *J Biomed Mater Res A* 10.1002/jbma.35384.
- Lin Z, Monteiro-Riviere NA & Riviere JE (2014) Pharmacokinetics of metallic nanoparticles. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 10.1002/wnan.1304.
- Liu HH, Lanphere J, Walker S & Cohen Y (2015) Effect of hydration repulsion on nanoparticle agglomeration evaluated via a constant number Monte-Carlo simulation. *Nanotechnology* 26(4):045708.
- Loeschner K, Hadrup N, Qvortrup K, Larsen A, Gao X, Vogel U, Mortensen A, Lam HR & Larsen EH (2011) Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver acetate. *Part Fibre Toxicol* 8:18.
- Lokuta MA & Huttenlocher A (2005) TNF-alpha promotes a stop signal that inhibits neutrophil polarization and migration via a p38 MAPK pathway. *J Leukoc Biol* 78(1):210-219.

- Lombi E, Donner E, Scheckel KG, Sekine R, Lorenz C, Von Goetz N & Nowack B (2014) Silver speciation and release in commercial antimicrobial textiles as influenced by washing. *Chemosphere* 111:352-358.
- Lubick N (2008) Nanosilver toxicity: ions, nanoparticles--or both? *Environ Sci Technol* 42(23):8617.
- M. C. Roco WSB (2005) Societal implications of nanoscience and nanotechnology: Maximizing human benefit. *Journal of Nanoparticules Research* Volume 7(Issue 1):pp 1-13.
- Mailander V & Landfester K (2009) Interaction of nanoparticles with cells. *Biomacromolecules* 10(9):2379-2400.
- Maki DG (2010) In vitro studies of a novel antimicrobial luer-activated needleless connector for prevention of catheter-related bloodstream infection. *Clin Infect Dis* 50(12):1580-1587.
- Martinez-Gutierrez F, Guajardo-Pacheco JM, Noriega-Trevino ME, Thi EP, Reiner N, Orrantia E, Av-Gay Y, Ruiz F & Bach H (2013) Antimicrobial activity, cytotoxicity and inflammatory response of novel plastics embedded with silver nanoparticles. *Future Microbiol* 8(3):403-411.
- McKinney EF, Willcocks LC, Broecker V & Smith KG (2014) The immunopathology of ANCAassociated vasculitis. *Semin Immunopathol* 36(4):461-478.
- Mhaskar R, Clark OA, Lyman G, Engel Ayer Botrel T, Morganti Paladini L & Djulbegovic B (2014) Colony-stimulating factors for chemotherapy-induced febrile neutropenia. *Cochrane Database Syst Rev* 10:CD003039.
- Miethling-Graff R, Rumpker R, Richter M, Verano-Braga T, Kjeldsen F, Brewer J, Hoyland J, Rubahn HG & Erdmann H (2014) Exposure to silver nanoparticles induces size- and dose-dependent oxidative stress and cytotoxicity in human colon carcinoma cells. *Toxicol In Vitro* 28(7):1280-1289.
- Mironava T, Hadjiargyrou M, Simon M, Jurukovski V & Rafailovich MH (2010) Gold nanoparticles cellular toxicity and recovery: effect of size, concentration and exposure time. *Nanotoxicology* 4(1):120-137.
- Mishalian I, Bayuh R, Levy L, Zolotarov L, Michaeli J & Fridlender ZG (2013) Tumorassociated neutrophils (TAN) develop pro-tumorigenic properties during tumor progression. *Cancer Immunol Immunother* 62(11):1745-1756.
- Miyayama T, Arai Y & Hirano S (2012) [Environmental exposure to silver and its health effects]. *Nihon Eiseigaku Zasshi* 67(3):383-389.

- Mohammed Fayaz A, Ao Z, Girilal M, Chen L, Xiao X, Kalaichelvan P & Yao X (2012) Inactivation of microbial infectiousness by silver nanoparticles-coated condom: a new approach to inhibit HIV- and HSV-transmitted infection. *Int J Nanomedicine* 7:5007-5018.
- Monopoli MP, Aberg C, Salvati A & Dawson KA (2012) Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nat Nanotechnol* 7(12):779-786.
- Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramirez JT & Yacaman MJ (2005) The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 16(10):2346-2353.
- Mouthon L, Dunogue B & Guillevin L (2014) Diagnosis and classification of eosinophilic granulomatosis with polyangiitis (formerly named Churg-Strauss syndrome). *J Autoimmun* 48-49:99-103.
- Mukherjee D, Royce SG, Sarkar S, Thorley A, Schwander S, Ryan MP, Porter AE, Chung KF, Tetley TD, Zhang J & Georgopoulos PG (2014) Modeling in vitro cellular responses to silver nanoparticles. *J Toxicol* 2014:852890.
- Munker R, Gasson J, Ogawa M & Koeffler HP (1986) Recombinant human TNF induces production of granulocyte-monocyte colony-stimulating factor. *Nature* 323(6083):79-82.
- Murdock RC, Braydich-Stolle L, Schrand AM, Schlager JJ & Hussain SM (2008) Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique. *Toxicol Sci* 101(2):239-253.
- Narayanan KB & Sakthivel N (2010) Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. *Adv Colloid Interface Sci* 156(1-2):1-13.
- Noel A, Maghni K, Cloutier Y, Dion C, Wilkinson KJ, Halle S, Tardif R & Truchon G (2012) Effects of inhaled nano-TiO2 aerosols showing two distinct agglomeration states on rat lungs. *Toxicol Lett* 214(2):109-119.
- Nohynek GJ, Antignac E, Re T & Toutain H (2010) Safety assessment of personal care products/cosmetics and their ingredients. *Toxicol Appl Pharmacol* 243(2):239-259.
- Nordenfelt P (2014) Quantitative assessment of neutrophil phagocytosis using flow cytometry. *Methods Mol Biol* 1124:279-289.
- Nowack B, Krug HF & Height M (2011) 120 Years of Nanosilver History: Implications for Policy Makers. *Environ Sci Technol* 10:10.
- Oberdorster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Kreyling W & Cox C (2004) Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol* 16(6-7):437-445.

- Ohyama K, Baba M, Tamai M, Aibara N, Ichinose K, Kishikawa N, Kawakami A & Kuroda N (2014) Proteomic profiling of antigens in circulating immune complexes associated with each of seven autoimmune diseases. *Clin Biochem* 10.1016/j.clinbiochem.2014.11.008.
- Ortega-Gomez A, Perretti M & Soehnlein O (2013) Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO Mol Med* 5(5):661-674.
- Paoliello-Paschoalato AB, Azzolini AE, Cruz MF, Marchi LF, Kabeya LM, Donadi EA & Lucisano-Valim YM (2014) Isolation of healthy individuals' and rheumatoid arthritis patients' peripheral blood neutrophils by the gelatin and Ficoll-Hypaque methods: comparative efficiency and impact on the neutrophil oxidative metabolism and Fcgamma receptor expression. *J Immunol Methods* 412:70-77.
- Park EJ, Yi J, Kim Y, Choi K & Park K (2010) Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism. *Toxicol In Vitro* 24(3):872-878.
- Park J, Lim DH, Lim HJ, Kwon T, Choi JS, Jeong S, Choi IH & Cheon J (2011) Size dependent macrophage responses and toxicological effects of Ag nanoparticles. *Chem Commun* 47(15):4382-4384.
- Park SW, Shin HT, Lee KT & Lee DY (2013) Medical concern for colloidal silver supplementation: argyria of the nail and face. *Ann Dermatol* 25(1):111-112.
- Pearson RM, Juettner VV & Hong S (2014) Biomolecular corona on nanoparticles: a survey of recent literature and its implications in targeted drug delivery. *Front Chem* 2:108.
- Pelletier M, Bouchard A & Girard D (2004) In vivo and in vitro roles of IL-21 in inflammation. *J Immunol* 173(12):7521-7530.
- Perskvist N, Long M, Stendahl O & Zheng L (2002) Mycobacterium tuberculosis promotes apoptosis in human neutrophils by activating caspase-3 and altering expression of Bax/Bcl-xL via an oxygen-dependent pathway. *J Immunol* 168(12):6358-6365.
- Peters K, Unger RE, Kirkpatrick CJ, Gatti AM & Monari E (2004) Effects of nano-scaled particles on endothelial cell function in vitro: studies on viability, proliferation and inflammation. *J Mater Sci Mater Med* 15(4):321-325.
- Pillay J, den Braber I, Vrisekoop N, Kwast LM, de Boer RJ, Borghans JA, Tesselaar K & Koenderman L (2010) In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* 116(4):625-627.
- Poirier M, Simard JC, Antoine F & Girard D (2013) Interaction between silver nanoparticles of 20 nm (AgNP) and human neutrophils: induction of apoptosis and inhibition of de novo protein synthesis by AgNP aggregates. *J Appl Toxicol* 10.1002/jat.2956.

- Poulose S, Panda T, Nair PP & Theodore T (2014) Biosynthesis of silver nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol* 14(2):2038-2049.
- Pratsinis A, Hervella P, Leroux JC, Pratsinis SE & Sotiriou GA (2013) Toxicity of Silver Nanoparticles in Macrophages. *Small* 18(10):201202120.
- Quadros ME & Marr LC (2011) Silver nanoparticles and total aerosols emitted by nanotechnology-related consumer spray products. *Environ Sci Technol* 45(24):10713-10719.
- Raimondo L, Garzaro M, Molinaro L, Bartoli C, Provenzano E & Pecorari G (2014) latrogenic rhinopharyngeal isolated argyria induced by silver-containing nasal drug. *J Craniofac Surg* 25(2):e149-151.
- Reisetter AC, Stebounova LV, Baltrusaitis J, Powers L, Gupta A, Grassian VH & Monick MM (2011) Induction of inflammasome-dependent pyroptosis by carbon black nanoparticles. *J Biol Chem* 286(24):21844-21852.
- Remijsen Q, Kuijpers TW, Wirawan E, Lippens S, Vandenabeele P & Vanden Berghe T (2011) Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. *Cell Death Differ* 18(4):581-588.
- Repp R, Valerius T, Sendler A, Gramatzki M, Iro H, Kalden JR & Platzer E (1991) Neutrophils express the high affinity receptor for IgG (Fc gamma RI, CD64) after in vivo application of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 78(4):885-889.
- Reumaux D, Duthilleul P & Roos D (2004) Pathogenesis of diseases associated with antineutrophil cytoplasm autoantibodies. *Hum Immunol* 65(1):1-12.
- Roe D, Karandikar B, Bonn-Savage N, Gibbins B & Roullet JB (2008) Antimicrobial surface functionalization of plastic catheters by silver nanoparticles. *J Antimicrob Chemother* 61(4):869-876.
- Rosas-Hernandez H, Jimenez-Badillo S, Martinez-Cuevas PP, Gracia-Espino E, Terrones H, Terrones M, Hussain SM, Ali SF & Gonzalez C (2009) Effects of 45-nm silver nanoparticles on coronary endothelial cells and isolated rat aortic rings. *Toxicol Lett* 191(2-3):305-313.
- Rossi EM, Pylkkanen L, Koivisto AJ, Vippola M, Jensen KA, Miettinen M, Sirola K, Nykasenoja H, Karisola P, Stjernvall T, Vanhala E, Kiilunen M, Pasanen P, Makinen M, Hameri K, Joutsensaari J, Tuomi T, Jokiniemi J, Wolff H, Savolainen K, Matikainen S & Alenius H (2010) Airway exposure to silica-coated TiO2 nanoparticles induces pulmonary neutrophilia in mice. *Toxicol Sci* 113(2):422-433.

- Rothen-Rutishauser B, Muhlfeld C, Blank F, Musso C & Gehr P (2007) Translocation of particles and inflammatory responses after exposure to fine particles and nanoparticles in an epithelial airway model. *Part Fibre Toxicol* 4:9.
- Roursgaard M, Poulsen SS, Poulsen LK, Hammer M, Jensen KA, Utsunomiya S, Ewing RC, Balic-Zunic T, Nielsen GD & Larsen ST (2010) Time-response relationship of nano and micro particle induced lung inflammation. Quartz as reference compound. *Hum Exp Toxicol* 29(11):915-933.
- Roy R, Kumar S, Tripathi A, Das M & Dwivedi PD (2014) Interactive threats of nanoparticles to the biological system. *Immunol Lett* 158(1-2):79-87.
- Rubartelli A (2014) Autoinflammatory diseases. *Immunol Lett* 161(2):226-230.
- Sadik CD, Kim ND & Luster AD (2011) Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends Immunol* 32(10):452-460.
- Sanjenbam P, Gopal JV & Kannabiran K (2014) Anticandidal activity of silver nanoparticles synthesized using Streptomyces sp.VITPK1. *J Mycol Med* 10.1016/j.mycmed.2014.03.004.
- Savill J & Haslett C (1995) Granulocyte clearance by apoptosis in the resolution of inflammation. *Semin Cell Biol* 6(6):385-393.
- Savoie A, Lavastre V, Pelletier M, Hajto T, Hostanska K & Girard D (2000) Activation of human neutrophils by the plant lectin Viscum album agglutinin-I: modulation of de novo protein synthesis and evidence that caspases are involved in induction of apoptosis. *J Leukoc Biol* 68(6):845-853.
- Schonermarck U, Csernok E & Gross WL (2014) Pathogenesis of anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis: challenges and solutions 2014. *Nephrol Dial Transplant* 10.1093/ndt/gfu398.
- Schwartz J, Litonjua A, Suh H, Verrier M, Zanobetti A, Syring M, Nearing B, Verrier R, Stone P, MacCallum G, Speizer FE & Gold DR (2005) Traffic related pollution and heart rate variability in a panel of elderly subjects. *Thorax* 60(6):455-461.
- Shahare B & Yashpal M (2013) Toxic effects of repeated oral exposure of silver nanoparticles on small intestine mucosa of mice. *Toxicol Mech Methods* 23(3):161-167.
- Shavandi Z, Ghazanfari T & Moghaddam KN (2011) In vitro toxicity of silver nanoparticles on murine peritoneal macrophages. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 33(1):135-140.

- Shrivastava R, Kushwaha P, Bhutia YC & Flora S (2014) Oxidative stress induced following exposure to silver and gold nanoparticles in mice. *Toxicol Ind Health* 10.1177/0748233714562623.
- Simard JC, Girard D & Tessier PA (2010) Induction of neutrophil degranulation by S100A9 via a MAPK-dependent mechanism. *J Leukoc Biol* 87(5):905-914.
- Singh R, Wagh P, Wadhwani S, Gaidhani S, Kumbhar A, Bellare J & Chopade BA (2013) Synthesis, optimization, and characterization of silver nanoparticles from Acinetobacter calcoaceticus and their enhanced antibacterial activity when combined with antibiotics. *Int J Nanomedicine* 8:4277-4290.
- Singh RP & Ramarao P (2012) Cellular uptake, intracellular trafficking and cytotoxicity of silver nanoparticles. *Toxicol Lett* 213(2):249-259.
- Sinico RA & Radice A (2014) Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) testing: detection methods and clinical application. *Clin Exp Rheumatol* 32(3 Suppl 82):S112-117.
- Sionov RV, Fridlender ZG & Granot Z (2014) The Multifaceted Roles Neutrophils Play in the Tumor Microenvironment. *Cancer Microenviron* 10.1007/s12307-014-0147-5.
- Sondi I & Salopek-Sondi B (2004) Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci* 275(1):177-182.
- Soni N & Prakash S (2014) Antimicrobial and mosquitocidal activity of microbial synthesized silver nanoparticles. *Parasitol Res* 10.1007/s00436-014-4268-z.
- Sotiriou GA & Pratsinis SE (2010) Antibacterial activity of nanosilver ions and particles. *Environ Sci Technol* 44(14):5649-5654.
- Speshock JL, Murdock RC, Braydich-Stolle LK, Schrand AM & Hussain SM (2010) Interaction of silver nanoparticles with Tacaribe virus. *J Nanobiotechnology* 8:19.
- Srinivas A, Rao PJ, Selvam G, Murthy PB & Reddy PN (2011) Acute inhalation toxicity of cerium oxide nanoparticles in rats. *Toxicol Lett* 23:23.
- Sterling JP (2014) Silver-resistance, allergy, and blue skin: truth or urban legend? *Burns* 40 Suppl 1:S19-23.
- Stringer RE, Hart CA & Edwards SW (1996) Sodium butyrate delays neutrophil apoptosis: role of protein biosynthesis in neutrophil survival. *Br J Haematol* 92(1):169-175.
- Suresh AK, Pelletier DA & Doktycz MJ (2012) Relating nanomaterial properties and microbial toxicity. *Nanoscale* 10.1039/c2nr32447d.

- Tacken PJ & Batenburg JJ (2006) Monocyte CD64 or CD89 targeting by surfactant protein D/anti-Fc receptor mediates bacterial uptake. *Immunology* 117(4):494-501.
- Taheri S, Cavallaro A, Christo SN, Smith LE, Majewski P, Barton M, Hayball JD & Vasilev K (2014) Substrate independent silver nanoparticle based antibacterial coatings. *Biomaterials* 35(16):4601-4609.
- Tanaka K, Kawamura M, Otake K, Toiyama Y, Okugawa Y, Inoue Y, Uchida K, Araki T, Mohri Y & Kusunoki M (2014) Trehalose does not affect the functions of human neutrophils in vitro. *Surg Today* 44(2):332-339.
- Tarzi RM & Pusey CD (2014) Current and future prospects in the management of granulomatosis with polyangiitis (Wegener's granulomatosis). *Ther Clin Risk Manag* 10:279-293.
- Valdiglesias V, Kilic G, Costa C, Fernandez-Bertolez N, Pasaro E, Teixeira JP & Laffon B (2014) Effects of iron oxide nanoparticles: Cytotoxicity, genotoxicity, developmental toxicity, and neurotoxicity. *Environ Mol Mutagen* 10.1002/em.21909.
- van der Zande M, Vandebriel RJ, Van Doren E, Kramer E, Herrera Rivera Z, Serrano-Rojero CS, Gremmer ER, Mast J, Peters RJ, Hollman PC, Hendriksen PJ, Marvin HJ, Peijnenburg AA & Bouwmeester H (2012) Distribution, elimination, and toxicity of silver nanoparticles and silver ions in rats after 28-day oral exposure. *ACS Nano* 6(8):7427-7442.
- Wang F, Wang H, Sun X & Li M (2014a) Apoptosis-induction is A Novel Therapeutic Strategy for Gastrointestinal and Liver Cancers. *Curr Gene Ther*.
- Wang R, Neoh KG, Kang ET, Tambyah PA & Chiong E (2014b) Antifouling coating with controllable and sustained silver release for long-term inhibition of infection and encrustation in urinary catheters. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 10.1002/jbm.b.33230.
- Wasowicz W, Cieslak M, Palus J, Stanczyk M, Dziubaltowska E, Stepnik M & Duchler M (2011) Evaluation of biological effects of nanomaterials. Part I. Cyto- and genotoxicity of nanosilver composites applied in textile technologies. *Int J Occup Med Environ Health* 24(4):348-358.
- Wilkinson LJ, White RJ & Chipman JK (2011) Silver and nanoparticles of silver in wound dressings: a review of efficacy and safety. *J Wound Care* 20(11):543-549.
- Witko-Sarsat V, Mocek J, Bouayad D, Tamassia N, Ribeil JA, Candalh C, Davezac N, Reuter N, Mouthon L, Hermine O, Pederzoli-Ribeil M & Cassatella MA (2010) Proliferating cell nuclear antigen acts as a cytoplasmic platform controlling human neutrophil survival. J Exp Med 207(12):2631-2645.

- Wright HL, Moots RJ, Bucknall RC & Edwards SW (2010) Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology (Oxford)* 49(9):1618-1631.
- Wright HL, Thomas HB, Moots RJ & Edwards SW (2015) Interferon gene expression signature in rheumatoid arthritis neutrophils correlates with a good response to TNFi therapy. *Rheumatology (Oxford)* 54(1):188-193.
- Yaniv G, Twig G, Shor DB, Furer A, Sherer Y, Mozes O, Komisar O, Slonimsky E, Klang E, Lotan E, Welt M, Marai I, Shina A, Amital H & Shoenfeld Y (2014) A volcanic explosion of autoantibodies in systemic lupus erythematosus: A diversity of 180 different antibodies found in SLE patients. *Autoimmun Rev* 14(1):75-79.
- Yen HJ, Hsu SH & Tsai CL (2009) Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes. *Small* 5(13):1553-1561.
- Yousefi S, Mihalache C, Kozlowski E, Schmid I & Simon HU (2009) Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ* 16(11):1438-1444.
- Zak-Golab A, Hrycek A, Holecki M & Chudek J (2011) [Diagnostic value of antineutophil cytoplasmic antibodies]. *Wiad Lek* 64(1):37-42.
- Zhang Z, Kong F, Vardhanabhuti B, Mustapha A & Lin M (2012) Detection of engineered silver nanoparticle contamination in pears. *J Agric Food Chem* 60(43):10762-10767.
- Zhao J & Riediker M (2014) Detecting the oxidative reactivity of nanoparticles: a new protocol for reducing artifacts. *J Nanopart Res* 16:2493.
- Zhu MT, Feng WY, Wang B, Wang TC, Gu YQ, Wang M, Wang Y, Ouyang H, Zhao YL & Chai ZF (2008) Comparative study of pulmonary responses to nano- and submicron-sized ferric oxide in rats. *Toxicology* 247(2-3):102-111.
- Zielinska-Przyjemska M, Glowka FK & Klaczynska J (2008) Modulatory effect of chiral nonsteroidal anti-inflammatory drugs on apoptosis of human neutrophils. *Chirality* 20(2):159-165.
- Zoroddu MA, Medici S, Ledda A, Nurchi VM, Lachowicz JI & Peana M (2014) Toxicity of nanoparticles. *Curr Med Chem* 21(33):3837-3853.
- Zvyagin AV, Zhao X, Gierden A, Sanchez W, Ross JA & Roberts MS (2008) Imaging of zinc oxide nanoparticle penetration in human skin in vitro and in vivo. *J Biomed Opt* 13(6):064031.

Références électroniques

¹ Silver-colloids, Scientific information on colloidal silver, *zeta potential range of value*, http://www.silver-colloids.com, (page consultée le 2 juin 2014)

² Santé Canada, *Énoncé de politique sur la définition ad hoc de Santé Canada s'appliquant aux nanomatériaux*, http://www.hc-sc.gc.ca/sr-sr/pubs/nano/pol-fra.php, (page consultée le 3 juillet 2014)

³ Santé Canada, *Science et recherche, Nanotechnologie*, http://www.hc-sc.gc.ca/sr-sr/pubs/proj/nano-fra.php, (page consultée le 10 janvier 2015)

⁴ LegiFrance, *Le service public de la diffusion du droit*, <u>Loi no2010-788 du 12 juillet 2010</u> <u>portant engagement national pour l'environnement</u>, http://www.legifrance.gouv.fr/affich TexteArticle.do;jsessionid=357B828E027879ABCB8BC42B849125CB.tpdjo04v_3?idArticle =JORFARTI000022471516&cidTexte=JORFTEXT000022470434&dateTexte=29990101&ca tegorieLien=id (page consultée le 11 janvier 2015)

⁵ Nanotechnology, Consumer Products Inventory, *An inventory of nanotechnology-based consumer products introduced on the market*, http://www.nanotechproject.org/cpi, (page consultée le 26 juin et le 3 juillet 2014)