

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Centre Armand-Frappier

EFFET MODULATOIRE DES NANOPARTICULES DE TiO_2 , CeO_2 ET ZNO SUR LA DÉGRANULATION CHEZ LE NEUTROPHILE HUMAIN

Par Kim Babin

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

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne	M. Jacques Bernier, PhD INRS-Institut Armand-Frappier
Examineur externe	M. Tamas Fulop, PhD Université de Sherbrooke
Directeur de recherche	M. Denis Girard, PhD INRS-Institut Armand-Frappier

Remerciements

Le mémoire que vous vous apprêtez à lire reflète toutes les connaissances que j'ai apprises et les techniques que j'ai appliquées durant mes deux années de recherche à la maîtrise. J'aimerais donc profiter de cette opportunité pour remercier les gens qui m'ont accompagnée lors de ce parcours et qui ont contribué à rendre ma maîtrise à la fois plus facile, mais surtout plus stimulante.

Premièrement, j'aimerais particulièrement remercier mon directeur de recherche Denis Girard qui m'a accueillie à bras ouvert dans sa petite famille scientifique et qui m'a donnée cette chance de travailler avec une équipe de recherche dynamique, attentionnée et surtout très solidaire envers tous et chacun. Denis, merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir guidée avec les différents projets, remplis de défis et de possibilités. Tu m'as inculquée la détermination scientifique tout en me donnant une grande liberté au niveau de l'évolution de mon projet. Finalement, je te remercie au nom du groupe pour tout le temps consacré à tes étudiants, autant lors du midi pour échanger sur des discussions scientifiques que lorsque tu organises des activités à ton chalet.

J'aimerais également remercier mes collègues, Jean-Christophe Simard et Francis Vallières qui m'ont si bien encadrée avec leurs partages d'idées et d'hypothèses face à mon projet sur la phagocytose, ainsi que Francis Antoine et David Goncalves pour mes premiers mois de stages sur l'apprentissage des fonctionnalités du laboratoire. J'aimerais aussi remercier une nouvelle personne qui est avec nous depuis quelques mois au laboratoire, Valérie Levastre, qui m'a accompagnée et aidée à traverser les embûches de mon projet de fin de maîtrise et qui m'a soutenue durant ma rédaction. J'aimerais souhaiter bonne chance aux nouveaux étudiants qui entament ou finissent leur maîtrise (Claudie Noel, Isabelle Durocher et Rafael Luis Silva), ainsi que leur doctorat (Francis Vallières). Profitez-en, ça passe énormément vite lorsqu'on est entouré de bonnes personnes !

Finalement, je remercie mon comité de correction de mémoire, Jacques Bernier, Tamas Fulop et Denis Girard.

Table des matières

Remerciements	ii
Table des matières	iii
Liste des abréviations	v
Liste des figures et des tableaux.....	vii
Résumé	viii
Introduction	1
SECTION 1 : REVUE DE LITTÉRATURE.....	3
CHAPITRE 1 : RÉPONSE IMMUNITAIRE	4
1.1 Système immunitaire	4
1.2 Inflammation	4
1.3 Résolution de l'inflammation	5
CHAPITRE 2 : NEUTROPHILES, FONCTIONS ET MALADIES	7
2.1 Développement du neutrophile	7
2.1.1 Granulopoïèse	8
2.1.2 Plasticité	10
2.1.3 Interaction avec le système immunitaire acquis	11
2.2 Recrutement du neutrophile au site inflammatoire	12
2.2.1 Activation.....	13
2.2.2 Roulement.....	14
2.2.3 Adhésion	14
2.2.4 Transmigration	15
2.3 Fonctions du neutrophile.....	16
2.3.1 Synthèse et la sécrétion des protéines	17
2.3.2 Chimiotaxie	18
2.3.3 Dégranulation	19
2.3.4 Phagocytose.....	22
2.3.5 Flambée oxydative.....	23
2.3.6 Formation de NETs	25

2.3.7 Mort cellulaire	25
2.4 Maladies associées aux neutrophiles	27
2.4.1 Neutropénie	28
2.4.2 Arthrite rhumatoïde	28
2.4.3 Thrombose	29
2.4.4 Obésité et diabète	29
CHAPITRE 3 : NANOPARTICULES	31
3.1 Synthèse, applications et toxicologie	31
3.1.1 Voies d'administration	32
3.1.2 Distribution dans un milieu biologique	32
3.1.3 Voies d'internalisation	34
3.1.4 Actions toxiques	34
3.2 Nanotoxicologie d'oxydes métalliques	36
3.2.1 Interaction avec système immunitaire	37
3.3 Nanoparticules de dioxyde de titane	37
3.3.1 Études <i>in vitro</i> sur les cellules immunitaires	39
3.3.2 Études <i>in vivo</i> sur les modèles inflammatoires	40
3.4 Nanoparticules de dioxyde de zinc	41
3.4.1 Études <i>in vitro</i> sur les cellules immunitaires	42
3.4.2 Études <i>in vivo</i> sur les modèles inflammatoires	44
3.5 Nanoparticules de dioxyde de cérium	45
3.5.1 Études <i>in vitro</i> sur les cellules immunitaires	46
3.5.2 Études <i>in vivo</i> sur les modèles inflammatoires	47
SECTION 2 : Article	49
RÉSUMÉ DE L'ARTICLE	51
TABLES	64
SECTION 3 : Discussion et conclusion	70
Liste des références	76

Liste des abréviations

Ac : Anticorps
Ac-PGP : N-acetyl Pro-Gly-Pro
APAF-1 : Apoptotic Protease Activating Factor 1
ATP : Adenosine Tri-Phosphate
BAFF : TNF Family member B cell-Activating Factor
CASPASE : Cysteine ASPartic Acid proteaSE
CD30L : Ligand CD30
CR : Récepteur du complément
CeO₂: Dioxide de Cérium
CLR : Récepteurs de lectine de type C
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CINC : Cytokine-induced chemoattractants
Cyt C : Cytochrome C
DAMP : Damage-Associated Molecular Patterns
DC : Cellule Dendritique
DD : Death Domain
DDR2 : Discoidin Domain Receptor-2
ERM : Ezrin-moesin-radixin
FasL : Ligand Fas
FcR : Récepteurs Fc
fMLP: formylMethionyl-Leucyl-Phenylalanine
G-CSF : Facteur de Stimulation des Granulocytes
GM-CSF : Facteur de Stimulation des Granulocytes et Macrophages
GRO- α : Growth-related gene product- α
GTP : Guanosine triphosphate
HMGB1 : High mobility group protein B1
ICAM : InterCellular Adhesion molecule
Ig : Immunoglobuline
IL : Interleukine
IP-10 : interferoninducible protein 10
ITAM : Immuno-Tyrosine Activating Motif
ITIM : Immuno-Tyrosine Inhibitory Motif
JAM : Molécule d'Adhésion Jonctionel
kDa : Kilo Dalton
LEF-1 : Lymphoid Enhancer binding Factor 1
LPS: Lipopolysaccharides
LTB4 : Leukotriene B4
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
MCL-1 : Myeloid Cell Leukaemia-1
MIP-1 α / β : Macrophage infiltrating protein-1 α / β
MIP-3 : Macrophage Inflammatory Protein-3
MPO : Myeloperoxidase
MMP : Matrix Metalloproteases
MRSA : Methicilin-Resistant Staphylococcus Aureus
MTT : 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NADPH : Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate

NAMP: Nanoparticles-Associated Molecular Patterns
NAT : Neutrophile associé aux tumeurs
NET : Neutrophil Extracellular Traps
NF- κ B : Nuclear factor κ B
NT-4 : Neurotrophine-4
NGAL : Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin
NKC : Natural Killer Cell
NLR : Récepteurs NOD-like
NP: Nanoparticules
OSM : Oncostatine M
PAMP: Pathogen-Associated Molecular Patterns
PECAM : Platelet Endothelial-Cell Adhesion Molecule
PEG: Polyéthylène glycol
PGE2 : *Prostaglandine E2*
PI3K : phosphoinositide 3 kinase
PIP : *Phosphatidylinositol*phosphate
PIP₂ : Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
PIP₃ : Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate
PKC : Protéine Kinase C
PMA : Phorbol myristate acetate
PMN : Polymorphonucléaires
PRR : Récepteurs de reconnaissance de Motifs
PS : PhosphatidylSérine
PSGL-1 : P-Selectine Glycoprotein ligand 1
PTEN : Phosphatase and Tensin homolog
RCPG : Récepteur couplé aux protéines G
rhG-CSF : G-CSF recombinant pour humain
RLR : Récepteur RIG-I-like
ROS : Reactive Oxygen Species
RNS: Reactive Nitrogen Species
DC-SIGN : *Dendritic Cell*-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
SYK : Spleen Tyrosine Kinase
TiO₂ : Dioxide de Titane
TIMP : Tissue inhibitors of metalloproteinases
TLR : Recepteurs Toll-like
TNF α : Tumor Necrosis Factor- α
VAMP-2 : Vesicle Associated Membrane Protein-2
VEGF : Vascular endothelial growth factor
ZnO: Oxide de Zinc

Liste des figures et des tableaux

Liste des figures

- Figure 1 Photographie en microscopie électronique du contenu intra-plasmique chez le neutrophile (adapté et modifié de (Witko-Sarsat, V et al., 2000)) 7
- Figure 2: La granulopoïèse des neutrophiles: stages de différenciation et formation des granules et vésicules (adapté et modifié de la Société Française d'Hématologie (SFH)).....9
- Figure 3 : La transmigration : les différentes étapes et voies de passages des vaisseaux sanguins au site inflammatoire (adapté et modifié de (Ley K et al, 2007))..... 13
- Figure 4 : Les fonctions anti-microbiennes du neutrophile, représentées par la degranulation de protéases, la phagocytose, ainsi que la production de ROS et de NETs (adapté de (Fournier BM et al, 2012)) 16
- Figure 5 : Les voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose chez le neutrophile (adapté de (Wright HL et al, 2010)).....27
- Figure 6 La sélection des nanoparticules pour les études de toxicologie, corrélation entre leurs propriétés physico-chimiques et leurs profils de toxicité (adapté de (Amberg, M.E et al, 2009))35

Liste des tableaux

- Tableau 1 : Synthèse des cytokines, chimiokine et facteurs de croissances chez le neutrophile 18
- Tableau 2 Contenu des différents granules et du vésicule sécrétoire chez le neutrophile20
- Tableau 3 : Études in vitro et in vivo récentes sur les effets immunomodulateurs des NPs de TiO₂ 41
- Tableau 4: Études in vitro et in vivo récentes sur les effets immunomodulateurs des NPs de ZnO 45
- Tableau 5 : Études in vitro et in vivo récentes sur les effets immunomodulateurs des NPs de CeO₂ 48

Résumé

Les nanoparticules (NPs) de dioxyde de cérium (CeO_2), dioxyde de zinc (ZnO) et dioxyde de titane (TiO_2) sont des oxydes métalliques retrouvés grandement dans l'environnement, au sein des domaines tels que les industries pharmaceutiques, électroniques, cosmétiques et médicales. En raison de leurs petites tailles (<100 nm) et dans le but d'augmenter la qualité des produits, ces NPs ont fait leurs insertions dans une gamme de produits augmentant ainsi les risques d'interactions avec les cellules humaines. Peu à peu, des études commencent à démontrer que les nanoparticules peuvent être cytotoxiques et causer l'inflammation. Cependant, la majorité des études avec les NPs ont été réalisées sur des modèles inflammatoires *in vivo* de rongeurs et *in vitro* sur des lignées cellulaires (cellules épithéliales ou pulmonaires), mais peu ont été testées sur des cellules primaires ou différenciées du système immunitaire humain. L'effet des NPs sur la survie et sur les différentes fonctions du neutrophile est encore à ce jour inconnu. Ainsi, le présent mémoire porte sur les fonctions du neutrophile humain dans le processus inflammatoire, l'objectif étant d'évaluer *in vitro* l'effet modulateur de ces trois NPs sur la dégranulation. Cette fonction essentielle permet non seulement l'élimination des microbes extracellulaires par la libération de protéases et d'enzymes catalytiques mais, en plus, permet l'acquisition de récepteurs à la surface de la cellule pour la reconnaissance d'autres particules et l'activation de fonctions subséquentes. Hypothétiquement, nous croyons que ces trois NPs pouvaient potentiellement moduler la dégranulation chez le neutrophile. Ce mémoire présente l'influence de des trois NPs principalement sur les marqueurs et protéines spécifiques aux granules chez le neutrophile. Les résultats obtenus au cours de ces expériences montrent que la présence de TiO_2 et CeO_2 augmente la dégranulation par l'exocytose des granules spécifiques/gélatinases du neutrophile humain. Cette dégranulation a été constaté via une augmentation de plusieurs paramètres, tels que les récepteurs CD66b à la surface de la cellule, les métalloprotéinases-9 (MMP9) à l'extérieur de la cellule ainsi que l'activité gélatinasiq ue de ces protéines. Les travaux présentés dans ce mémoire contribuent donc significativement à l'amélioration des connaissances concernant les agents régulant la dégranulation du neutrophile.

Introduction

Le neutrophile fait partie de la famille des granulocytes regroupant également les éosinophiles et les basophiles. Son importance au niveau du système immunitaire se voit par sa forte présence (50 à 70%) dans le sang parmi les autres leucocytes. Non activé, le neutrophile survit pendant environ 24 heures et ensuite se dirige vers l'apoptose, une mort cellulaire strictement régulée. Cependant, s'il rencontre des agents inflammatoires, sa demi-vie peut s'étendre jusqu'à plusieurs jours. Ainsi, une demi-vie prolongée permettrait au neutrophile d'effectuer un plus grand nombre d'activités complexes dans un tissu telles que contribuer à la résolution de l'inflammation par ses diverses fonctions antimicrobiennes ou si l'infection ne peut être résolue, former une réponse spécifique demandant la collaboration du système immunitaire acquis. Il est crucial que sa survie soit hautement contrôlée, sans quoi sa persistance dans les tissus peut mener à des lésions tissulaires. Les NPs sont des composés de taille nanométrique pouvant être produits naturellement ou, depuis plusieurs années maintenant, être fabriquées par l'homme dans le but de les introduire dans divers produits. L'augmentation de leur utilisation se traduit par un plus grand risque d'exposition chez l'humain et donc un contact plus élevé avec les systèmes biologiques, incluant le système immunitaire.

Les mécanismes de défense des neutrophiles dirigés contre les micro-organismes sont très bien connus, néanmoins il n'y a que très peu d'études relatant sur leurs comportements envers les NPs. Le but de ce mémoire est d'évaluer si trois NPs spécifiques (CeO_2 , ZnO et TiO_2) agissent comme agent pro-inflammatoire en modulant l'activation et les fonctions du neutrophile. Une étude sur les monocytes humains a démontré que ces mêmes NPs avaient toutes induit des changements distincts dans le niveau d'expression des molécules d'adhésion, notamment au niveau des récepteurs des chimiokines (CXCR4), une molécule clé qui régule la libération des neutrophiles dans le sang et les tissus (Lozano-Fernandez *et al.*, 2014). Les résultats démontrent que le CeO_2 induit l'expression de CXCR4, alors qu'au contraire le ZnO le réduit. De plus, ces trois NPs réduisent l'expression de l'intégrine- β (LFA-1) et de la sélectine (L-sélectine) à la surface des monocytes. Ces molécules d'adhésion sont essentielles à leur migration au site inflammatoire, suggérant la toxicité potentielle des NPs au niveau des fonctions cellulaires. De plus, basé sur les études réalisées dans notre laboratoire, il avait été suggéré que les NPs de TiO_2 et ZnO induisaient l'activation de certaines fonctions chez le neutrophile humain. D'une part, les premiers résultats portant sur les NPs de TiO_2 ont démontré

qu'elles activaient le neutrophile tout en retardant son apoptose (Goncalves *et al.*, 2010). Cette capacité de pouvoir retarder la mort cellulaire suggère que le TiO₂ peut perturber l'homéostasie en prolongeant la demi-vie des neutrophiles ainsi que la sécrétion de produits toxiques. Cette NP possède également la capacité d'activer la phosphorylation des kinases P38 et ERK-1 et -2, deux enzymes clés impliquées dans plusieurs fonctions chez le neutrophile. De plus, le TiO₂ induit la production d'IL-8, Gro- α et MIP1- α et - β , des médiateurs pro-inflammatoires qui attirent d'autres neutrophiles et leucocytes. Notre équipe a également démontré le potentiel activateur des NPs de ZnO sur le neutrophile (Goncalves *et al.*, 2014) via une inhibition de leur l'apoptose. De plus, le ZnO induit la phosphorylation des tyrosines, suggérant une interaction directe avec la membrane plasmique pour amorcer l'activation des voies signalétiques. En ce qui concerne les NPs de CeO₂, à ce jour, encore aucune étude n'a été réalisée chez les neutrophiles humains. Ce projet de recherche s'insère dans un plus vaste projet visant à évaluer les effets pro-inflammatoires des NPs.

SECTION 1 : REVUE DE LITTÉRATURE

CHAPITRE 1 : RÉPONSE IMMUNITAIRE

1.1 Système immunitaire

Le système immunitaire sert à protéger l'humain contre les différents micro-organismes qui l'envahissent tels que les bactéries, les virus, les champignons, les protozoaires et les parasites. Il existe deux types de réponse, soit la réponse innée et la réponse acquise. D'un côté, la réponse immunitaire innée n'est pas spécifique à un antigène, mais reconnaît plutôt les motifs conservés chez les pathogènes. Cette réponse s'établit par la collaboration étroite des granulocytes (neutrophiles, éosinophiles, basophiles), des monocytes et des cellules NK (NKC). D'un autre côté, la réponse immunitaire acquise implique la reconnaissance d'antigènes reconnus spécifiquement par les anticorps et récepteurs cellulaires, notamment via l'activation des cellules B, des cellules T et des cellules dendritiques. Ces deux différents types de réponses cellulaires agissent en collaboration dans le but d'éliminer la particule infectieuse, nettoyer le site et remettre l'homéostasie de l'hôte à l'état normale. La réponse immunitaire est basée sur la reconnaissance du soi versus le non-soi ou le soi altéré, c'est-à-dire une tolérance envers les éléments endogènes de l'organisme et une réaction de défense contre ceux qui sont exogènes. L'incapacité de distinguer les cellules du soi et les considérés comme du non-soi, peut résulter en l'inflammation, en infections et même dans des cas sévères, en maladies auto-immunes où l'on voit le système immunitaire s'attaquer aux cellules saines de l'hôte (Janeway *et al.*, 2002). À cet effet, Polly Matzinger propose un modèle de "danger" avec lequel elle suggère que c'est grandement dû aux dommages tissulaires et à la mort des cellules de l'hôte que la réaction immunitaire est activée, et non simplement en raison de la présence de micro-organismes ou de particules exogènes, sachant que la plupart ne sont pas nécessairement reconnus et passent inaperçus (Matzinger, 2002) (Mortensen *et al.*, 2008). Ainsi, le système immunitaire est plus concerné par les cellules qui font du dommage que par les particules exogènes.

1.2 Inflammation

L'inflammation est le résultat du recrutement d'un grand nombre de cellules immunitaires et de facteurs sériques en réponse à un stress causé par une blessure, des particules exogènes ou des pathogènes infectieux. La chaleur, la douleur, la rougeur et l'enflure en sont les quatre signes cliniques. La réponse inflammatoire, qui est médiée par les cellules du système immunitaire, se développe en réponse aux PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) tels que Lipopolysaccharides (LPS) et autres produits bactériens et viraux qui sont relâchés dans les tissus durant une infection, ou en réponse aux DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns) comme l'adénosine tri-phosphate (ATP) et l'HMGB1 (High mobility group protein B1) qui sont générés en réponse à une blessure stérile telle qu'une brûlure, une hypoxie ou un produit chimique. Ces PAMPs et DAMPs sont reconnus par des molécules de surface cellulaires telles les récepteurs toll-like (TLRs), les récepteurs de lectine de type C (CLRs), les récepteurs NOD-like (NLRs) et récepteur RIG-I-like (RLRs) retrouvés chez les neutrophiles, les macrophages ou les cellules dendritiques (Iwasaki *et al.*, 2010, Takeuchi *et al.*, 2010). Deux types d'inflammation peuvent survenir suite à la reconnaissance de ces agents exogènes, soit l'inflammation aiguë et chronique. La première se voit par l'activation et le recrutement de cellules immunitaires innées au site inflammatoire, favorisant la libération de médiateurs inflammatoires tels que des cytokines et des chimiokines inflammatoires, des facteurs du complément et les eicosanoïdes menant à la constitution de l'inflammation. Cependant, si l'inflammation est trop importante et ne peut être résolue par les cellules innées, les cellules dendritiques résidentes dans les tissus migrent jusqu'aux organes lymphoïdes et interagissent directement avec les cellules B et T permettant une activation immunitaire plus spécifique, et correspondant au phénomène d'inflammation chronique.

1.3 Résolution de l'inflammation

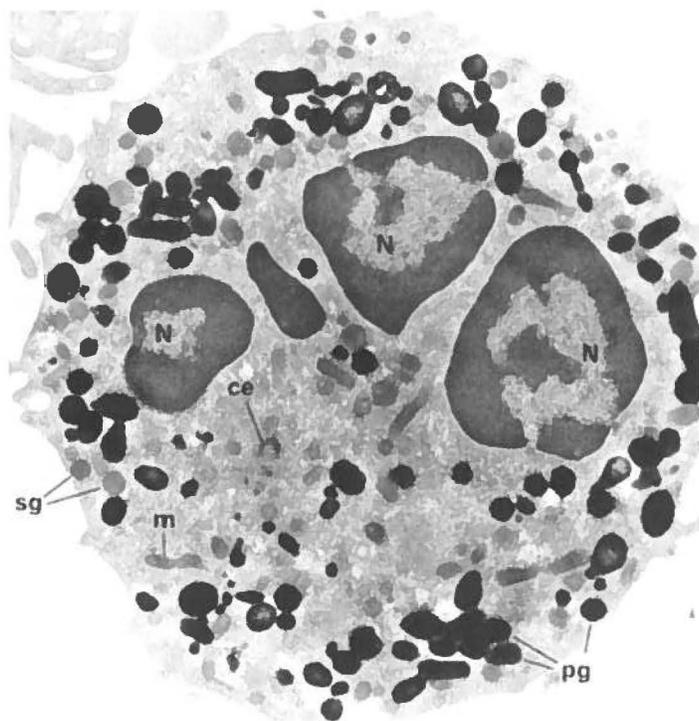
La résolution de l'inflammation est un processus indispensable qui est strictement régulé pour protéger l'hôte contre les dommages aux tissus. Une fois que le neutrophile a éliminé l'agent infectieux, un système de régulation est nécessaire pour contrer l'effet nuisible qu'aurait une suractivation du neutrophile sur l'hôte. Plusieurs étapes sont nécessaires à la résolution de l'inflammation telles que l'abolition du stimulus, le retrait de signaux de survie cellulaire, la normalisation du gradient chimiotactique, l'apoptose des neutrophiles infiltrant le tissu et

finalement l'efferocytose des neutrophiles par les macrophages résidants dans le tissu ou leur recyclage via la circulation sanguine et les nœuds lymphatiques (Serhan *et al.*, 2007). Une inflammation non résolue peut amener à une inflammation chronique, à des dommages tissulaires, ainsi qu'à une dérégulation de la cicatrisation du tissu. Concernant le neutrophile, plusieurs de ses fonctions effectrices peuvent endommager les tissus et les cellules par la suite telles que la sécrétion des granules et des ROS (Reactive Oxygen Species) qui deviennent toxiques pour la cellule, la phagocytose qui active plusieurs voies impliquées dans l'apoptose (Simon *et al.*, 1988) et finalement la libération des NETs (Neutrophil Extracellular Traps) qui empêchent la capacité transcriptionnelle nécessaire à la survie cellulaire. Ces raisons expliquent pourquoi le neutrophile possède une demi-vie très courte et tombe rapidement en apoptose. Le macrophage, quant à lui, s'occupe de la clairance des neutrophiles apoptotiques en modifiant leurs phénotypes, passant de cellules pro-inflammatoires à anti-inflammatoires afin de favoriser un retour à l'homéostasie (Fadok *et al.*, 1998). La phase anti-inflammatoire implique la relâche de médiateurs anti-inflammatoires tels que l'interleukine-10 (IL-10) et TGF- β (Tumor Necrosis Factor- α), en plus de la diminution de gènes pro-inflammatoires dépendant de NF- κ B (Nuclear Factor κ B) (Kolaczowska *et al.*, 2013). De plus, des médiateurs lipidiques pro-inflammatoires, tels que les prostaglandines E2 (PGE2) et les leucotriènes B4 (LTB4) sont diminués, alors que des médiateurs lipidiques pro-résolution (lipoxines, protectines et resolvines) sont générés. Ces derniers inhibent la migration des neutrophiles et initient le recrutement de monocytes et de macrophages, résultant à la phagocytose des neutrophiles apoptotiques par les macrophages (Serhan, 2010). Ainsi, les neutrophiles induisent la résolution de l'inflammation suite à la clairance des microbes, par la production de signaux qui vont diminuer le recrutement des neutrophiles au site d'infection, ainsi que par la production de signaux spécifiques aux macrophages pour convertir les conditions pro-inflammatoires à anti-inflammatoires (Singer *et al.*, 1999). Autant les neutrophiles que les phagocytes professionnels sont nécessaires à la résolution de l'inflammation.

CHAPITRE 2 : NEUTROPHILES, FONCTIONS ET MALADIES

2.1 Développement du neutrophile

Avant que le neutrophile puisse entreprendre une fonction précise, il doit passer à travers différentes étapes complexes de maturation. Durant le premier stage de différenciation cellulaire, le neutrophile est un hémoblaste granuleux qui se différencie en myéloblaste, ensuite en promyélocyte, en myélocyte, en métamyélocyte et finalement en cellule segmentée polymorphonucléaire, soit le neutrophile mature (figure 2) (Borregaard, 2010). Ce processus de maturation requiert environ 14 jours (Bainton *et al.*, 1987) et ensuite les neutrophiles sont libérés dans la circulation sanguine. Ils possèdent un diamètre entre 7 et 10 μ m, un noyau segmenté et contiennent dans leurs cytoplasmes différents granules et vésicules.



pg: Granule primaire (Azurophiles)
sg: granule secondaire (Spécifique)
N : noyaux (trilobés)
ce : centrioles
m : mitochondries.

Figure 1 Photographie en microscopie électronique du contenu intra-plasmique chez le neutrophile (adapté et modifié de (Witko-Sarsat, V *et al.*, 2000 :617)).

Au sein de la moelle osseuse, les neutrophiles font partie des leucocytes les plus abondants, avec une production de 2×10^{11} cellules par jour chez l'humain (Dancey *et al.*, 1976). Ce processus est strictement contrôlé par le facteur de stimulation des granulocytes et macrophages (GM-CSF), une molécule essentielle à la différenciation et à la survie des neutrophiles. En fait, suite à l'ingestion des neutrophiles apoptotiques, les macrophages résidant dans les tissus vont produire de l'IL-23. Cette cytokine va se rendre aux tissus lymphoïdes et activer les cellules T, qui à leur tour synthétiseront de l'IL-17. C'est l'IL-17 qui induira la production de G-CSF chez les cellules stromales, les macrophages, les cellules endothéliales et les fibroblastes (Kaushansky, 2006). Sans signal, les neutrophiles sont retenus dans la moelle osseuse, de par l'interaction de leurs récepteurs CXCR4 avec celui des cellules réticulaires de la moelle osseuse, soit CXCL12 (SDF-1) (J. L. Li *et al.*, 2012). Le G-CSF sécrété interrompt la liaison entre les molécules CXCR4 et CXCL12, contribuant ainsi à la mobilisation des neutrophiles. L'expression des molécules CXCR4 à la surface du neutrophile augmente en fonction de son âge, initiant donc par gradient chimiotactique, leurs retours à la moelle osseuse et leurs liaisons aux molécules CXCL12 (Nagase *et al.*, 2002). Ainsi, la signalisation entre CXCR4 et CXCL12 possède un double rôle de régulation, soit de retenir le neutrophile naissant en absence de signal et d'entreprendre son retour à la moelle osseuse une fois qu'il a effectué sa fonction. De plus, des études (Skokowa *et al.*, 2007) ont démontré que LEF-1 (Lymphoid Enhancer binding Factor 1) était un facteur de transcription indispensable dans la différenciation des précurseurs myéloïdes aux neutrophiles matures sous condition de G-CSF (Skokowa *et al.*, 2007). Ainsi, le développement du neutrophile est strictement régulé par différentes cytokines (G-CSF, IL-17 et IL-23) et facteurs de transcriptions, tel LEF-1.

2.1.1 Granulopoïèse

Durant leur maturation, les neutrophiles acquièrent plusieurs compartiments intracellulaires (granules) qui entreposent, entre autre, les protéines nécessaires dans leur fonction de défense. Lors de la maturation trois types de granules sont formés consécutivement (Hager *et al.*, 2010), soit les granules azurophiles (primaires), spécifiques (secondaires) et gélatinases (tertiaires). Chaque type granulaire contient des protéines distinctes et est sécrété dans des conditions spécifiques (Barrowman *et al.*, 1987). Le granule azurophile contient majoritairement la myéloperoxydase (MPO), les défensines et l'élastase. La collagénase, l'histaminase et la lactoferrine sont plutôt retrouvées dans le granule spécifique, alors qu'on retrouve la MMP-9 et

l'acétyltransférase dans le granule gélatinase. Le neutrophile contient également des vésicules sécrétoires contenant les protéines du plasma.

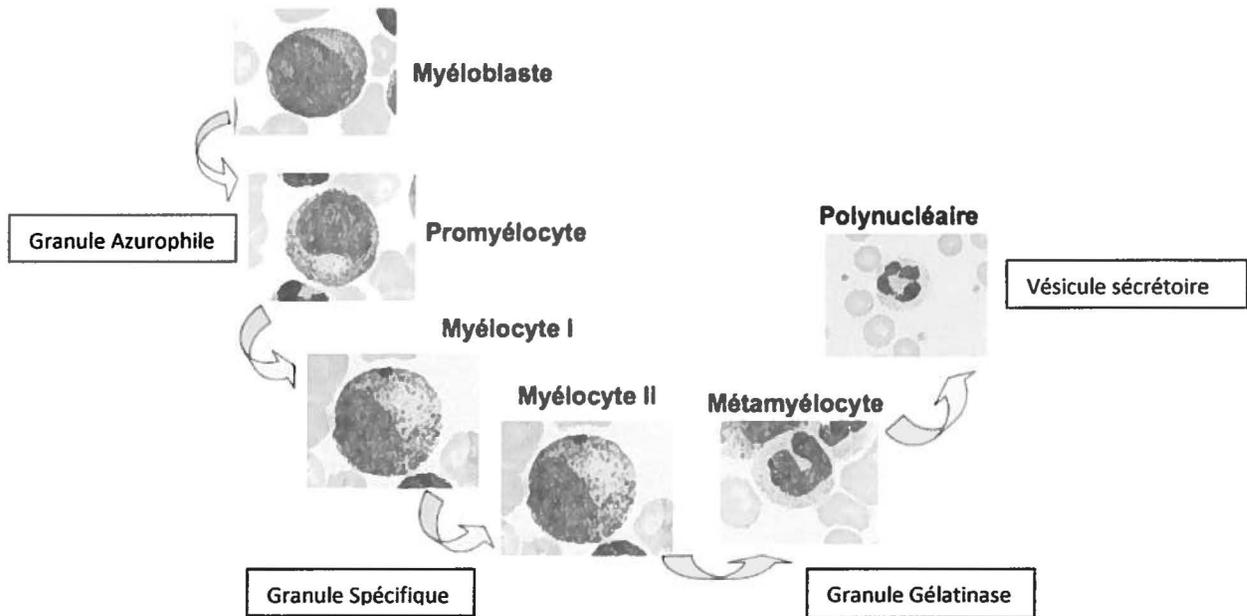


Figure 2: La granulopoïèse des neutrophiles: stades de différenciation et formation des granules et vésicules (adapté et modifié de la Société Française d'Hématologie (SFH)).

Les granules azurophiles sont produits durant l'étape promyélocytaire, alors que les granules gélatinases se forment durant l'étape myélocytaire et finalement les granules spécifiques sont créés durant la dernière étape, soit dans les cellules segmentées. En plus d'être formé aux différentes étapes de la différenciation du neutrophile, chaque type de granules et vésicules est également mobilisé de manière séquentielle durant la migration de ce dernier hors de la circulation sanguine vers le site inflammatoire. En effet, une plus grande compétence pour l'exocytose serait reliée à une plus grande quantité de protéine fusogénique telle que la VAMP-2 (Vesicle Associated Membrane Protein-2) (Borregaard *et al.*, 2007). La VAMP-2 est la protéine la plus dense dans les vésicules sécrétoires. Par contre, elle diminue des granules spécifiques à gélatinases et est la moins présente dans les granules azurophiles (Soehnlein *et al.*, 2009b). Ainsi, lorsque les neutrophiles interagissent avec l'endothélium, une décharge des vésicules sécrétoires se produit et un réservoir de récepteurs va se lier à la membrane, changeant le phénotype du neutrophile. Les granules spécifiques sont libérés durant la migration transendothéliale, alors que le contenu des granules gélatinases et azurophiles sont libérés dans l'espace extravasculaire, provoquant l'élimination des microbes par les protéines

antimicrobiennes de ces granules (Lominadze *et al.*, 2005). Par l'application d'une approche protéomique, environ 300 protéines ont été identifiées dans les granules du neutrophile (Lominadze *et al.*, 2005), la plupart possède une activité antimicrobienne et réside dans les granules gélatinases et azurophiles (Lacy *et al.*, 2008). Ces protéines antimicrobiennes détruisent directement la membrane cellulaire des microbes, atteignant l'homéostasie (Brogden, 2005) ou clivent des protéines nécessaires à la virulence du microbe (Belaaouaj *et al.*, 2000, Ginsburg, 2002, Shafer *et al.*, 1996). Ainsi, autant les granules que les vésicules interviennent dans les fonctions du neutrophile.

2.1.2 Plasticité

Les leucocytes existent sous de multiples formes définies par des phénotypes et des profils de fonctions distinctes. Les lymphocytes et les monocytes sont depuis longtemps considérés comme étant des cellules hétérogènes face à leur morphologie, à leur phénotype et à leurs fonctions, alors que les neutrophiles étaient plutôt vu comme une population cellulaire relativement homogène (Auffray *et al.*, 2009). Cette affirmation venait de la croyance que les neutrophiles étaient des cellules suicidaires qui arrivaient rapidement au site inflammatoire, effectuaient leurs activités et mourraient par apoptose peu de temps après. Suite à de nombreuses études, on sait maintenant que le neutrophile peut acquérir une demi-vie prolongée (5.4 jours) (Pillay *et al.*, 2010) et qu'il peut s'infiltrer ailleurs qu'aux tissus infectés, par exemple aux organes lymphoïdes. Il est prouvé que le phénotype des neutrophiles change lors de la transmigration hors des vaisseaux sanguins au travers des cellules endothéliales (Nourshargh *et al.*, 2010). Ainsi, l'interaction du neutrophile avec ces structures cellulaires induit de nombreux changements phénotypiques et fonctionnels (Nourshargh *et al.*, 2005) incluant l'augmentation de l'expression de molécules de surfaces telles que les molécules d'adhésions comme les intégrines- $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha 6\beta 1$, ainsi que les récepteurs de chimiokines CCR1-2-3-5 et CXCR3-4 (Hartl *et al.*, 2008). Finalement, une fois qu'ils ont accédé au site inflammatoire et entrepris leurs fonctions antimicrobiennes, les neutrophiles ont la capacité d'effectuer la transmigration renversée (Woodfin *et al.*, 2011) par l'augmentation de l'expression de leurs ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule) et la diminution d'expression des récepteurs à chimiokines.

De plus, une étude sur des modèles d'auto-immunités chroniques (Tosello Boari *et al.*, 2012) a démontré que les neutrophiles exprimaient une grande diversité de protéines de surface cellulaires différentes et que certains des changements dans leurs phénotypes puissent résulter à des cancers ou infections et être la conséquence au développement de conditions pathologiques. En effet, des études suggèrent que certains cancers sont associés aux phénotypes particuliers des neutrophile associé aux tumeurs (NATs) (Fridlender *et al.*, 2009). Deux différents types de NATs (N1 et N2) sont caractérisés et la majorité étant des NATs de type N2 qui possèdent un phénotype immunosuppresseur et protumorigène. Cependant, un blocage de TNF- β amènerait à la formation d'un phénotype N1 possédant des caractéristiques immunostimulateurs et antitumorales. Ce phénotype N1 s'associe à l'augmentation de plusieurs facteurs tels que l'expression de Fas et ICAM-1, la production de cytokines et de chimiokines, résultant en une plus grande cytotoxicité envers les cellules tumorales (Fridlender *et al.*, 2009). En lien avec le développement d'infection chez un modèle de souris infectées par MSRA (Tsuda *et al.*, 2004), deux types de neutrophiles (PMNs) ont été détectés, soit les PMN-1 exprimant l'IL-12 et les PMN-2 exprimant l'IL-10. Les résultats ont démontré qu'une plus grande population de PMN-1 résultait à la clairance de l'infection, alors que les souris contenant les PMN-2 succombaient à l'infection bactérienne. Ainsi, les neutrophiles peuvent démontrer une grande plasticité et développer différents phénotypes en réponse à des conditions physiologiques (vieillesse) ou pathologiques (infection).

2.1.3 Interaction avec le système immunitaire acquis

Les neutrophiles ont longtemps été vus comme des cellules effectrices et différenciées qui n'avaient pas grande influence sur le développement de la réponse adaptative. Toutefois, plusieurs découvertes ont permis de modifier cette vision. En effet, ces cellules servent également à localiser et à éliminer les pathogènes en plus de réguler l'inflammation et l'immunité. Récemment, il a été démontré que le neutrophile pouvait être intimement impliqué dans la réponse immunitaire adaptative, interagissant avec les cellules B, les cellules T, de même que les cellules dendritiques. Des études chez la souris ont démontré que le neutrophile était responsable de capturer les microbes du site inflammatoire et de les transporter dans la zone marginale splénique où résident les cellules B (Balazs *et al.*, 2002). Une autre étude chez l'humain a démontré que le neutrophile activé exprimait BAFF, une cytokine spécifique et activatrice des cellules B (Scapini *et al.*, 2003). Pour ce qui est des cellules T, elles sont généralement régulées par des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) telles que les cellules

dendritiques et les macrophages. Il est maintenant connu que les neutrophiles humains et murins ont la capacité de transporter des antigènes jusqu'aux ganglions lymphatiques en migrant par les vaisseaux lymphatiques (Abadie *et al.*, 2005) et qu'ils expriment des molécules nécessaires à la présentation aux cellules T (Ashtekar *et al.*, 2003). En effet, il a été démontré chez le neutrophile que l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité-II (CMH-II) était induite par la présence de GM-CSF, d'IL-3 et d'INF- γ (Gosselin *et al.*, 1993). Ainsi, le transport des antigènes aux cellules T par la présentation du CMH a mis en évidence la possibilité que le neutrophile puisse avoir comme fonction celle de présentatrice d'antigènes. De plus, selon différentes études, les neutrophiles auraient la capacité de réprimer (Pillay *et al.*, 2012) ou d'activer (Ryan *et al.*, 2013) l'activité des cellules T. L'effet des neutrophiles sur l'immunité adaptative ne serait pas seulement médié par l'interaction directe avec les cellules B et T, mais également en affectant les fonctions des cellules dendritiques. Des études sur les neutrophiles humains et murins (Boudaly, 2009, Megiovanni *et al.*, 2006) suggèrent qu'une interaction directe résulte en diverses réponses des cellules dendritiques telles que leur activation, leur maturation, leur prolifération et leur polarisation. En effet, l'interaction entre la molécule DC-SIGN des cellules dendritiques et MAC-1 du neutrophile induit ces différents changements (van Gisbergen *et al.*, 2005). Ainsi, les neutrophiles pourraient jouer un rôle très complexe dans la régulation du système adaptatif et des études deviennent nécessaires pour approfondir les questionnements au sujet de leurs interactions.

2.2 Recrutement du neutrophile au site inflammatoire

Les neutrophiles sont les premiers leucocytes à se rendre aux tissus endommagés ou infectés (Williams *et al.*, 2011). Une fois qu'ils quittent la moelle osseuse et entrent dans la circulation sanguine, les neutrophiles sont aux aguets des signaux d'infections qui, si présents, vont induire leur migration à travers la paroi endothéliale jusqu'au site d'invasion microbienne. Les cellules quittent le compartiment intravasculaire dans un processus qu'on nomme : le recrutement leucocytaire. Ce phénomène implique plusieurs étapes séquentielles, commençant par l'activation du neutrophile, le roulement médié par les sélectines, l'adhésion ferme via les intégrines et finalement la transmigration au tissu endommagé (figure 3).

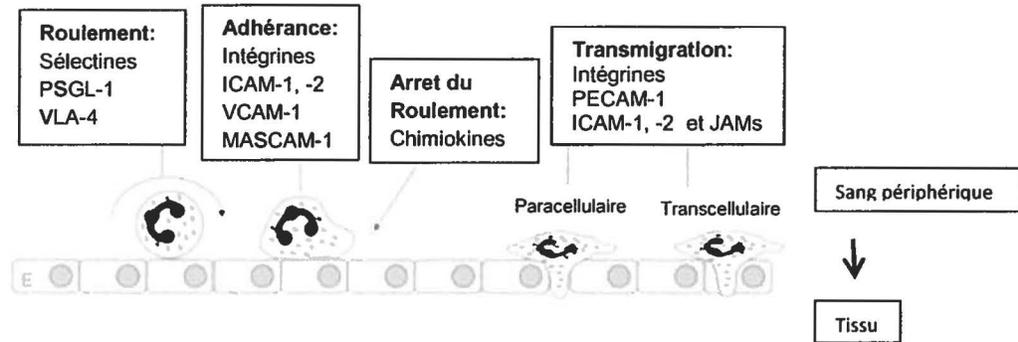


Figure 3 : La transmigration : les différentes étapes et voies de passages des vaisseaux sanguins au site inflammatoire (adapté et modifié de (Ley K et al, 2007 : 678)).

2.2.1 Activation

Le destin des neutrophiles différenciés circulant dans le sang peut conduire à deux voies possibles, soit leur mort par apoptose ou bien leur survie amenant à leur migration aux tissus inflammatoires et à l'élimination de l'agent causal (Summers *et al.*, 2010). Chez l'humain en santé, les neutrophiles circulent dans le sang sous forme inactive, assurant que leur contenu intracellulaire et toxique ne soit pas accidentellement relâché et ne cause pas de lésions aux tissus. Ainsi, en absence d'un stimulus, une grande partie des neutrophiles vont être éliminés par les cellules Kupffer du foie (29%) ou par les macrophages résidants dans la rate (31%). Les neutrophiles peuvent aussi retourner à la moelle osseuse (32%) (Suratt *et al.*, 2001). En fait, l'expression de CXCR4 augmente en fonction de l'âge des neutrophiles, favorisant leur retour à la moelle osseuse dans le but de réguler le taux de production/élimination (Rankin, 2010). Cependant, pour se rendre au site inflammatoire et combattre l'inflammation, le neutrophile doit d'abord devenir activé pour être capable de quitter la circulation sanguine. Les neutrophiles latents peuvent devenir activés par des agents inflammatoires tels que les produits microbiens ou les cytokines et chimiokines libérées (TNF- α , GM-CSF, IL-8, INF- γ) par les macrophages et les mastocytes résidant dans les tissus (Hallett *et al.*, 1995). La reconnaissance des PAMPs ou DAMPs par les récepteurs spécifiques des leucocytes va induire l'expression et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL-1 β , l'INF- γ , le TNF α , l'histamine et la thrombine qui vont par la suite activer les cellules endothéliales des parois capillaires, provoquant l'expression de leurs molécules d'adhésions qui va favoriser leur ralentissement et leurs adhésions sur les cellules endothéliales ainsi que leur transmigration (McEver, 1994).

2.2.2 Roulement

Durant ce processus, les neutrophiles quittent le compartiment intravasculaire, où ils sont exposés à un grand flux sanguin, vers le compartiment périvasculaire, où le flux est considérablement diminué. Les molécules d'adhésion regroupent les sélectines et les intégrines. Au contact des sélectines, la mobilité des neutrophiles ralentit dans le but de favoriser leur roulement, alors que les intégrines permettent leur adhésion ferme sur les cellules endothéliales, ainsi que de promouvoir leur transmigration (Springer, 1990). La capture et le roulement des neutrophiles s'effectue grâce à l'interaction des ligands glycoprotéines présents sur leurs sélectines-P1 (PSGL1 ou CD162) ou leurs L-sélectines avec les sélectines-E (CD62E) et P (CD62P) exprimées à la surface des cellules endothéliales (Zarbock *et al.*, 2008). Plus précisément, l'expression des sélectines-P sur les cellules endothéliales est induite quelques minutes suivant l'interaction avec des molécules de thrombines, d'histamines et de ROS, alors que les molécules de sélectines-E sont exprimées quelques heures suivant une stimulation avec l'IL-1 β , le TNF α , et le LPS (Patel *et al.*, 1995). Ainsi, l'étape du roulement permet une diminution de la vitesse des neutrophiles dans la circulation sanguine, favorisant un contact plus fort avec les cellules endothéliales.

2.2.3 Adhésion

Les intégrines sont localisées sur la membrane des leucocytes, reliant leur cytoplasme aux composantes de la matrice extracellulaire (MEC). Elles sont naturellement sous forme inactive. Cependant, une fois que les sélectines se lient à leurs récepteurs, les intégrines deviennent subséquentement actives et interagissent avec les molécules ICAM-1 et VCAM à la surface des cellules endothéliales. De cette manière, les leucocytes sont fortement liés à l'endothélium et le phénomène de la transmigration peut s'ensuivre. Plus précisément, les neutrophiles vont adhérer fermement par l'interaction des intégrines- β 1 et β 3 avec les composants de la MEC. Chez les neutrophiles, on retrouve trois différentes intégrines- β 2, soit LFA-1 (CD11a/CD18), MAC-1 (CD11b/CD18) et GP150/95 (CD11c/CD18). Les plus importantes lors du processus d'adhésion cellulaire sont la LFA-1 et la MAC-1 (Luo *et al.*, 2007). Les patients (LAD-1) souffrant d'une déficience de ces intégrines, présentent des infections bactériennes récurrentes suite à l'incapacité d'adhérer et ainsi empêcher la résolution d'inflammation (D. C. Anderson *et al.*, 1985). Suite à la liaison des sélectines-L avec les sélectines-E/P, l'expression de LFA-1 et de MAC-1 est induite et elles peuvent interagir avec les ICAM-1 et -2 des cellules endothéliales,

une liaison essentielle pour freiner le mouvement des neutrophiles en circulation (Smith *et al.*, 1988). En plus de sa fonction adhérente, la liaison aux intégrines apporte l'activation de différentes voies signalétiques intracellulaires telles que Syk et PI3K (Frommhold *et al.*, 2007). L'activation de ces voies aboutit au réarrangement du cytosquelette et à la libération de superoxydes et de protéines granulaires (Wang *et al.*, 2002), fonctions importantes pour la transmigration. Ainsi, la liaison des sélectines à la surface des deux types cellulaires est très importante au déclenchement des voies de signalisations impliquées dans l'expression des intégrines- β (Simon *et al.*, 2000), dans l'activation de la transcription (Urzainqui *et al.*, 2002) menant à la sécrétion de cytokines (Hidari *et al.*, 1997), ainsi qu'au réarrangement du cytosquelette (Ba *et al.*, 2005) essentiel à la mobilisation du neutrophile à travers la paroi endothéliale.

2.2.4 Transmigration

La membrane basale des cellules endothéliales est une structure continue composée de protéines de la MEC, incluant les collagènes, les lamines, les fibrogènes et les fibronectines. Les neutrophiles peuvent traverser la MEC en libérant des MMPs, des héparinase et des élastases possédant une activité catalytique dirigée contre ces molécules. Cette dégradation permet au neutrophile de se frayer un chemin à travers le tissu, tout en suivant les signaux chimiotactiques sécrétés par les neutrophiles ou macrophages présents au site d'inflammation. Le cytosquelette du neutrophile constitué d'actine, de tubuline et de myosine est fortement impliqué dans le processus de migration, permettant la mobilité cellulaire par le changement de polarisation de ses structures. En effet, pour se rendre au tissu infecté, le neutrophile va entreprendre la transmigration, aussi nommée la diapédèse, pouvant se faire selon deux mécanismes. La diapédèse paracellulaire se voit par la migration des neutrophiles à travers les jonctions intercellulaires de l'endothélium. Les neutrophiles accèdent à cette voie par leurs liaisons aux ligands de surface des cellules endothéliales tels ICAM-2, PECAM-1 et JAMs (Woodfin *et al.*, 2009). Au contraire, la diapédèse transcellulaire se fait via la cellule endothéliale par sa liaison à ICAM-1 (Carman *et al.*, 2008). Il a été prouvé que les neutrophiles utilisaient davantage la route paracellulaire (90%) durant une inflammation (Woodfin *et al.*, 2011). Les jonctions entre les cellules sont enrichies de plusieurs molécules telles PECAM-1, ICAM-1, JAMs, CD99, CD47 et VE-cadhérine, ce qui pourrait expliquer pourquoi les neutrophiles privilégient la migration paracellulaire (Ley *et al.*, 2007). Néanmoins, ce choix de route peut différer selon l'agent inflammatoire. Il semblerait que les neutrophiles favorisent la route

paracellulaire lorsqu'ils sont stimulés avec le fMLP. Le neutrophile prend de 2 à 5 minutes pour quitter la circulation à travers l'endothélium, ensuite entre 5 à 15 minutes pour traverser la membrane basale par voie paracellulaire (Ley *et al.*, 2007) et de 20 à 30 minutes pour la traverser par la voie transcellulaire (Phillipson *et al.*, 2008).

2.3 Fonctions du neutrophile

La compréhension des rôles du neutrophile lors d'une inflammation a considérablement changé depuis une vingtaine d'années. La libération de cytokines (Bazzoni *et al.*, 1991), la découverte de la formation des NETs (Brinkmann *et al.*, 2012), ainsi que leur défense immunitaire contre des pathogènes intracellulaires (virus et mycobactéries) (Jonsson *et al.*, 2013) indiquent que les neutrophiles régulent des mécanismes complexes pour perfectionner leur rôle dans la défense immunitaire et l'inflammation. Le neutrophile a deux rôles importants à jouer dans la défense du système immunitaire: la surveillance immunitaire et l'élimination directe des micro-organismes. Il peut éliminer les pathogènes par des mécanismes intracellulaires (phagocytose, flambée oxydative et apoptose) et extracellulaires (sécrétion de protéines, dégranulation et formation de NETs) (figure 4).

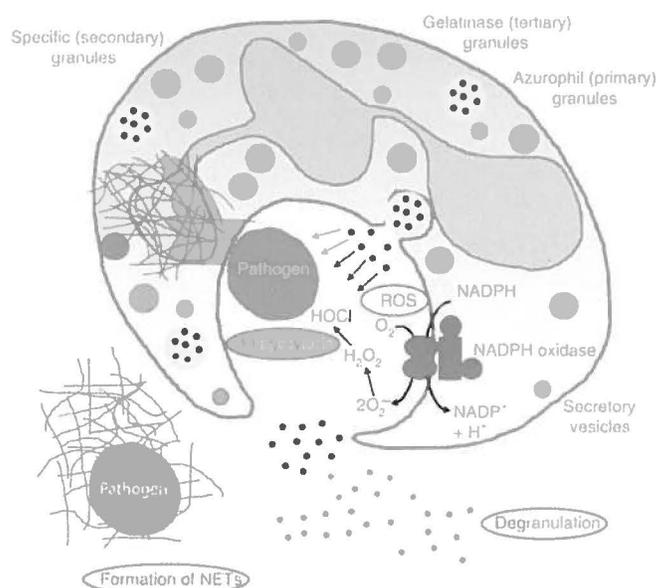


Figure 4 : Les fonctions anti-microbiennes du neutrophile, représentées par la dégranulation de protéases, la phagocytose, ainsi que la production de ROS et de NETs (adapté de (Fournier BM *et al.*, 2012 : 317)).

2.3.1 Synthèse et la sécrétion des protéines

Le neutrophile est capable de synthétiser et sécréter des cytokines pro- ou anti-inflammatoires, des chimiokines, des leucotriènes et des prostaglandines en réponse à des agents environnants inflammatoires. Ces médiateurs serviront à orienter le neutrophile ainsi que d'autres leucocytes par l'activation de plusieurs fonctions telles qu'augmenter l'adhésion cellulaire, l'expression de récepteurs et de protéines, de même que dans certain cas, à retarder l'apoptose (Seo *et al.*, 2001). En effet, la hausse de l'expression des récepteurs facilite une reconnaissance plus rapide des pathogènes, augmente l'activité phagocytaire, et promouvoit l'élimination de l'agent infectieux. Tel que présenté dans le tableau 1, le neutrophile peut produire des cytokines (IL-1, IL-3, IL-12, TNF- α , IFN γ), des chimiokines (CXCL1, CCL3, CCL4, CXCL8 (IL-8), MIP-1 α) et des facteurs de croissance (G-CSF, M-CSF, TGF- β). Une grande majorité sont synthétisées en réponse aux stimulations avec LPS, TNF, IFN et GM-CSF (Kobayashi, 2008) (Cassatella, 1999). Par exemple, le neutrophile synthétise et sécrète l'IL-8 en réponse au GM-CSF et TNF- α (Fujishima *et al.*, 1993), pouvant subséquemment activer et recruter d'autres neutrophiles et d'autres leucocytes au site inflammatoire. Ils peuvent également synthétiser des médiateurs lipidiques (LTB₄-C₄-D₄-E₄, PGD₂ et PAF) en favorisant la vasodilatation par l'expression des molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales (Tavares de Lima *et al.*, 1998) (Soehnlein *et al.*, 2009a). Les médiateurs inflammatoires dérivant des neutrophiles sont nécessaires pour détruire les microbes, toutefois ils peuvent être très dangereux pour les cellules environnantes s'ils sont relâchés en trop grande quantité (Witko-Sarsat *et al.*, 2000). Ainsi, il est important que les neutrophiles soient éliminés du site inflammatoire en même temps que l'élimination de la particule inflammatoire (Fox *et al.*, 2010).

Tableau 1 : Synthèse des cytokines, chimiokine et facteurs de croissances chez le neutrophile

Cytokines			Chimiokines		Facteurs de croissance		Médiateurs lipidiques
<i>Pro-inflammatoire</i>	<i>Anti-inflammatoire</i>	<i>Immuno-régulatrice</i>	-CXC	-CC	<i>Facteurs stimulants</i>	<i>Facteurs angiogéniques</i>	<i>Inflammation</i>
IL-1- α/β	IL-1R-A	IFN- α/γ	CXCL1	CCL2	G-CSF	HB-EGF	LTB ₄
IL-6	IL-4	IL-12	CXCL2	CCL3	GM-CSF	VEGF	PGE ₂
IL-7	IL-10	IL-23	CXCL3	CCL4	M-CSF	HGF	PAF
IL-9	TGF- α/β	OSM	CXCL4	CCL17	IL-3	GRO- α/β	
IL-16		CINC	CXCL5	CCL18	SCF	FGF2	
IL-17-A/F		NT-4	CXCL6	CCL19		TGF- α	
IL-18			CXCL8	CCL20			
MIF			CXCL9	CCL22			
			CXCL10				
			CXCL11				

2.3.2 Chimiotaxie

La migration du neutrophile aux tissus endommagés est possible grâce à un gradient chimiotactique (Witko-Sarsat *et al.*, 2000). Les chimioattractants peuvent être libérés par des par l'hôte via les cellules nécrotiques, stromales et épithéliales présentes à l'endroit de l'inflammation. Les neutrophiles exposés aux chimioattractants subissent un changement morphologique illustré par une partie frontale et dorsale allongée, que l'on nomme uropode. Des études ont démontré que le neutrophile priorise les chimioattractants en distinguant, à l'aide de voies de signalisation, les signaux faibles (LTB₄, CXCL8, PAF), des forts (fMLP et C5a). Cette technique lui permet d'éviter la distraction de signaux faibles dans un milieu possédant différents chimioattractants (Heit *et al.*, 2002). En fait, la polarisation du neutrophile est accompagnée de la redistribution de protéines cytosoliques qui contrôlent les processus mécaniques et biochimiques de la migration. Les protéines telles que la GTPase, Rac et Cdc42 localisent la partie frontale du neutrophile, alors que RhoA, PDZRhoGEF et ERM enrichissent la partie dorsale (Williams *et al.*, 2011). La chimiotaxie en présence de signaux faibles est contrôlée par l'activation des voies PI3K et PTEN (Cantley, 2002). En effet, PI3K phosphoryle PIP₂ en PIP₃, un messenger secondaire très puissant amorçant la migration des neutrophiles (Funamoto *et al.*, 2002). Au contraire, en présence de chimioattractants forts, la migration du neutrophile passe par la voie signalétique des phospholipases A2 et de la MAPK P38 (Heit *et al.*, 2008). La raison pour laquelle les neutrophiles sont soumis à une migration vers un

chimioattractant fort plutôt que faible provient du fait que l'activation de P38 qui reconvertit PIP₃ en PIP₂, inhibe la voie PI3K par la localisation rapide de PTEN à la membrane plasmique (Heit *et al.*, 2008). Ainsi, la polarisation du neutrophile dépend de la nature du chimioattractant.

La MEC sert de barrière contre la motilité cellulaire, d'où la nécessité de sécréter des MMPs pour dégrader la matrice et faciliter le mouvement cellulaire par gradient chimiotactique. Des études (Afonso *et al.*, 2013) ont démontré que le récepteur du collagène (DDR2) active la fonction chimiotactique chez le neutrophile en déclenchant l'activité gélatinase des MMPs chez le neutrophile. En fait, les gélatinases digèrent l'Ac-PGP, des fragments de collagènes médiant la chimiotaxie du neutrophile (Hoover *et al.*, 1978). En présence d'un gradient chimiotactique, les neutrophiles peuvent migrer à une vitesse extrêmement rapide (12µm/min) (S. I. Anderson *et al.*, 2000) leur permettant d'atteindre leur tissu cible en moins de trois heures. Cette rapidité les distingue des autres leucocytes qui eux peuvent prendre plus de trois heures avant d'être efficacement recrutés (Capoccia *et al.*, 2008)

2.3.3 Dégranulation

L'expulsion des protéines, enzymes catalytiques et récepteurs contenues dans les granules des neutrophiles est primordiale pour l'élaboration de différentes fonctions du neutrophile et d'une autre part pour augmenter l'adhésion des neutrophiles à l'endothélium, et ainsi faciliter leur transmigration au site inflammatoire (Soehnlein *et al.*, 2009c). Cette libération facilite l'augmentation des récepteurs et protéines membranaires nécessaire à la reconnaissance des agents environnants. De plus, ce processus permet l'élimination des pathogènes par l'activité dégradante des protéases et enzymes catalytiques. L'exocytose des granules se déroule selon des étapes distinctes (Toonen *et al.*, 2003). En fait, leur translocation vers la membrane plasmique est un processus dépendant du remodelage du cytosquelette d'actine et de l'assemblage des microtubules. Cette opération est suivie de l'attachement et de la mobilisation des vésicules et granules sur les microtubules (Burgoyne *et al.*, 2003), ainsi que du contact de leur bicouche lipidique externe avec la surface interne de la membrane plasmique entourant la cellule. Ensuite, les granules fusionnent rapidement avec la membrane plasmique et relarguent leur contenu protéique à l'extérieur de la cellule. À ce jour, plusieurs protéines granulaires des neutrophiles humains ont été identifiées dont une liste est présentée dans le tableau 2. Les vésicules sécrétoires ont la plus grande tendance à être libérées après l'activation du neutrophile, suivies des granules gélatinases, spécifiques et azurophiles (Sengelov *et al.*, 1993a).

La mobilité des compartiments intracellulaires se fait suite à une activation par les récepteurs extracellulaires au contact des agents environnants. En fait, une stimulation avec des médiateurs pro-inflammatoires tels le fMLP conduit à une décharge rapide des protéines contenues dans les vésicules sécrétoires (Sengelov *et al.*, 1993b), alors qu'une stimulation avec un autre agoniste puissant tel que le PMA (Para-MethoxyAmphetamine) induit la libération exhaustive des granules gélatinases, une libération modérée des granules spécifiques, alors que la mobilisation des granules azurophiles est faiblement affectée (M. Faurschou *et al.*, 2002).

Tableau 2 : Contenu des différents granules et du vésicule sécrétoire chez le neutrophile.

G. Azurophile	G. Spécifique	G. Gélatinase	V. Sécrétoire
<i>Protéines de la membrane</i>			
CD63	CD11b/CD18	CD11b/CD18	CD11b/CD18
CD68	CD67	CD66b	CR1 (CD35)
Préséniline 1	Récepteur fMLP	Récepteur fMLP	Récepteur fMLP
Stomatine	VAMP-2	VAMP-2	VAMP-2
	Cytochrome <i>b₅₅₈</i>	Cytochrome <i>b₅₅₈</i>	Cytochrome <i>b₅₅₈</i>
	Récepteur laminine	NRAMP-1	CD13
	Récepteur vitronectine		CD14
	Récepteur thrombospondine		CD16
	Récepteur TNF		CD45
	Récepteur fibronectine		Alcaline phosphatase
	Stomatine		
<i>Protéines de la matrice</i>			
Azurocinide	Microglobuline- β_2	Microglobuline- β_2	Protéines plasmatique
Glycérophosphatase- β	Collagénase	Acétyltransférase	
Glucuronidase- β	Gélatinase	Gélatinase	
Lysozyme	Lysozyme	Lysozyme	
Cathepsine G	Histaminase		
Élastase	Héparanase		
Protéinase-3	Lactoferrine		
Défensines			
MPO			
Mannosidase- α			
N-acétyl- β -glucosaminidase			

Certaines protéines provenant des granules spécifiques telles que la cathélicidine, la NGAL, la Nramp, la collagénase et la lactoferrine (de la Rosa *et al.*, 2008) induisent le recrutement des monocytes (Kai-Larsen *et al.*, 2008), des mastocytes, des cellules dendritiques (Yang *et al.*, 2009), de même que des lymphocytes, un processus primordial lors d'une inflammation non

résolue. D'autres protéines dérivant des granules azurophiles telles l'azurocidine, la protéinase 3, initient l'expression de molécules d'adhésions sur les cellules endothéliales, facilitant l'adhésion des monocytes et des neutrophiles (Soehnlein, 2009) par l'induction d'intégrines- β 2 (Soehnlein *et al.*, 2008). D'autres protéases du même type de granule telles la cathepsine G (Rochat *et al.*, 1988), l'élastase (Ginzberg *et al.*, 2001) et les défensines (Nygaard *et al.*, 1993) clivent et activent les pro-isoformes de TNF α , d'IL-1 β et d'IL-8, des chimioattractants très puissants, favorisant l'infiltration du neutrophile au tissu. À long terme, il est prouvé que la cathélicidine a un effet anti-apoptotique prolongeant la demie-vie du neutrophile (Barlow *et al.*, 2006), alors que l'élastase au contraire induit l'apoptose chez le neutrophile (Trevani *et al.*, 1996). Ainsi, ces différentes protéines travaillent en harmonie pour le bon fonctionnement du système immunitaire et contre les micro-organismes, favorisant la résolution de l'inflammation.

Cependant, il est important que le mécanisme de dégranulation soit contrôlé, sachant que le neutrophile est fortement enrichi de protéases pouvant détruire les tissus. En effet, certaines protéines libérées peuvent agir sur les cellules de l'hôte et mener à des lésions tissulaires (Scott *et al.*, 2002). Entre autres, les gélatinases (MMP-9) provenant des granules gélatinases et les collgénases (MMP-8) dégradant les tissus tels la lamine, le collagène, les protéoglycans et les fibronectines, facilitant le recrutement des neutrophiles au site inflammatoire (M. Faurschou *et al.*, 2003b). Cependant, une libération incontrôlée des MMPs peut être liée à des maladies sévères chez l'humain, entre autres l'arthrite rhumatoïde (Fligiel *et al.*, 2006). En effet, la MMP-9 peut également s'attaquer aux cellules de l'hôte et dégrader des composantes de la matrice intracellulaire du neutrophile, incluant l'actine et la tubuline (Cauwe *et al.*, 2009). De plus, la MPO provenant des granules azurophiles induit la production d'une grande variété de ROS. Ces métabolites oxygénés peuvent grandement contribuer à l'inflammation (Frey *et al.*, 2004) en convertissant l'H₂O₂, formé par le complexe de la NADPH oxydase, en acide hypochlorique ainsi qu'en acide hypobromeux et hypoiodeux, des antiseptiques très puissants attaquant la membrane de micro-organismes (Selsted *et al.*, 2005). Heureusement, pour maintenir l'homéostasie et diminuer les dommages à l'hôte, des inhibiteurs de MMPs (TIMPs) sont générés (Gipson *et al.*, 1999). Un déséquilibre entre les TIMPs et les MMPs est considéré comme un facteur important dans différentes maladies inflammatoires telles que l'asthme et la fibrose pulmonaire (Cederqvist *et al.*, 2001). De plus, les macrophages résidant aux tissus peuvent également produire des cytokines anti-inflammatoires telles l'IL-4, IL-10 et IL-11 qui inhibent les fonctions inflammatoires du neutrophile (Mulligan *et al.*, 1997). De plus, d'autres médiateurs provenant des macrophages tels les lipoxines, inhibent l'adhésion des neutrophiles

aux cellules endothéliales par une diminution de l'expression des intégrines, et donc empêchent leur migration au tissu (Filep *et al.*, 1999).

2.3.4 Phagocytose

La phagocytose consiste en la reconnaissance, l'ingestion, la digestion et l'élimination de micro-organismes, particules de pollution, ainsi que des cellules endommagées ou apoptotiques provenant de l'hôte. Les phagocytes tels que les macrophages, les neutrophiles et les monocytes effectuent cette fonction de défense essentielle pour l'organisme. Plus spécifiquement, les neutrophiles engouffrent et dégradent les particules en utilisant une combinaison de mécanismes oxydatifs (ROS) et non oxydatifs (dégranulation). D'une part, suivant l'engouffrement de la particule, la PKC active le complexe de la NADPH oxydase liée à la membrane, qui produit par la suite une large quantité de ROS directement dans le phagosome (Dekker *et al.*, 2000, Lekstrom-Himes *et al.*, 2000). D'une autre part, le neutrophile peut digérer la particule par la fusion et le déversement du contenu de ses granules dans le phagosome. La phagocytose peut être distinguée par trois propriétés majeures : (1) l'internalisation de particules ayant un diamètre d'au moins 0.5µm (2) un processus qui est initié par l'interaction de molécules spécifiques à un récepteur membranaire et (3) le déclenchement d'une réorganisation du cytosquelette qui va permettre l'engouffrement de la particule dans une vésicule (Kwiatkowska *et al.*, 1999a). Les récepteurs responsables de la phagocytose peuvent être classés en deux groupes, soit ceux dépendants des opsonines et ceux qui en sont indépendants. Les opsonines retrouvées dans le sérum sont les immunoglobulines G (IgG) et les fragments du complément C3b. Plus précisément, la phagocytose de particules opsonisées est effectuée soit par les récepteurs Fc γ qui reconnaissent la portion Fc des IgG recouvrant la particule ou par les récepteurs du complément pour les particules recouvertes de C3b.

Dans les cellules humaines et murines, on distingue trois classes de récepteurs Fc γ , d'après leur différence dans leur structures et leur affinités pour les IgG (Ravetch, 1994). Le Fc γ RI (CD64) possède une haute affinité, alors que les deux autres, Fc γ RII (CD32) et Fc γ RIII (CD16b) lient les IgG multivalants à faible affinité (McKenzie *et al.*, 1998). Le Fc γ RII contient un isoforme Fc γ RIIa qui devient activée par TNF- α et le GM-CSF (belostoki *et al.*, 2005) et un autre isoforme Fc γ RIIb qui, au contraire, possède le rôle inhibiteur. Une activation cellulaire via les récepteurs Fc γ va induire leur rapprochement, ainsi que l'activation des PTKs et la phosphorylation de plusieurs tyrosines subséquentes (Kwiatkowska *et al.*, 1999b). En effet, les kinases de la famille

Src (Fgr, Fyn, Hck, Lyn, Src) (Bolen, 1991) sont activées et vont ensuite phosphoryler les résidus tyrosines des ITAMs (Immuno-Tyrosine Activating Motif). L'interaction des homologues Src va permettre leur transphosphorylation, ainsi que l'association des SH2 et l'activation subséquente de la kinase Syk. La dysfonction des protéines en aval de cette voie peut mener à une résolution incomplète de l'inflammation (Bokoch, 1995). En effet, des études ont démontré (Crowley *et al.*, 1997) que les macrophages dérivant de souris déficientes de Syk ne pouvaient plus effectuer la phagocytose dépendante des récepteurs Fc γ d'où l'importance de la protéine Syk dans la phagocytose. Parmi les effecteurs en aval des tyrosines kinases Src et Syk, nous retrouvons les PI3K et les GTPases monomériques. Les protéines telles que Rho/Rac/Cdc42 et ARF appartiennent à la famille Ras des GTPases monomériques et vont transformer les kinases PIP $_3$ en PIP $_2$, une molécule nécessaire à l'élongation des filaments d'actine par la gelsoline (Nobes *et al.*, 1995). De plus, durant la phagocytose, Rac1 et 2 contrôlent le complexe de la NADPH oxydase, possédant un rôle dans la réorganisation du cytosquelette d'actine de même que dans la coordination de la flambée oxydative.

Plusieurs facteurs différencient la voie des récepteurs du complément par rapport à celle des récepteurs Fc γ chez le neutrophile. Les particules recouvertes de composants du complément vont se lier et activer le récepteur de l'intégrine- β 2 (MAC-1) (CD11b/18) facilitant l'ingestion par passage direct dans la cellule. D'une part la phagocytose par récepteur du complément n'est pas dépendante d'une montée d'ions de calcium ni de production de PIP (Fallman *et al.*, 1989). De plus, la phagocytose n'est pas accompagnée d'une flambée oxydative ni de production de cytokines ou de métabolites arachidoniques (Yamamoto *et al.*, 1984). Finalement, ce processus n'implique pas les protéines Rac ou Cdc42 (Caron *et al.*, 1998), mais plutôt l'activation de la protéine Rho qui va aboutir à l'extension de protrusion de la membrane sur la particule (Massol *et al.*, 1998). L'activation et le rapprochement des récepteurs CR3 vont activer la phosphorylation des sérines de la sous-unité B2 des CR3 (Detmers *et al.*, 1987). Cependant, la mécanistique des événements intracellulaires en réponse à la phagocytose par le récepteur du complément est très complexe et demeure obscure.

2.3.5 Flambée oxydative

Les neutrophiles ont des armes antibactériennes dépendantes et indépendantes de l'oxygène. La voie dépendante de l'oxygène est possible grâce à la production de ROS par le complexe de la NADPH oxydase, un processus nommé la flambée oxydative. La fonction des ROS (espèces

réactives à l'oxygène) ou des RNS (espèces réactives à l'azote) a pour but de détruire les particules dans l'environnement. Les ROS sont des composants de la chaîne de transport d'électrons, mais peuvent agir en tant que messagers secondaires importants dans divers événements de signalisations en réponse à des stimuli provenant de particules (Janssen *et al.*, 1995). Dans les phagocytes, les ROS sont impliqués dans l'inactivation des micro-organismes (Nathan, 1991). Il a été suggéré (Pralhad *et al.*, 1999) que les monocytes et les neutrophiles pouvaient avoir une réponse oxydative plus rigoureuse face aux particules que les macrophages alvéolaires résidant, puisqu'ils génèrent moins de radicaux libres en réponse aux microbes.

Chez les phagocytes professionnels, comme les neutrophiles et macrophages, la source dominante de ROS sont les enzymes du complexe de la NADPH oxydase. L'activation de ce complexe implique le recrutement et l'assemblage de multiples sous-unités incluant p67^{phox}, p40^{phox} et p47^{phox}, avec les sous-unités liées à la membrane telles que GP91^{phox}, p22^{phox} et Rac. Cet assemblage qui suit à la phosphorylation des kinases P38 et PI3K (Cui *et al.*, 2000) provoque la conversion de l'oxygène en grandes quantités d'anions superoxydes (O₂⁻) qui peuvent par la suite se transformer en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et en acide hypochlorique (HOCl) (Weiss, 1989). Les anions superoxydes peuvent également réagir avec l'oxyde nitrique (NO) pour former du peroxynitrite (ONOO⁻) (J. B. Park, 2003). De plus, les ROS participent dans la signalisation cellulaire (Fialkow *et al.*, 2007), pouvant activer le facteur de transcription NF-κB impliqué dans la synthèse des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires (Nick *et al.*, 1999). Ainsi, les ROS sont impliqués dans la régulation des voies de signalisations reliées à l'homéostasie, la prolifération, la différenciation cellulaire et les réponses inflammatoires (Touyz, 2005), mais peuvent devenir dangereux pour le neutrophile et son environnement s'ils sont produits en trop grande quantité. Dans des situations où la production excède la capacité antioxydante des cellules, la mort cellulaire peut se produire due à la modification de biomolécules cellulaires (Ryter *et al.*, 2007). En effet, les ROS sont des composés instables et très réactifs ayant la capacité d'enlever les électrons aux macromolécules cellulaires, les rendant dysfonctionnels (Rzigalinski *et al.*, 2006). Les cellules survivent aux ROS par l'induction d'enzymes antioxydantes ou détoxifiantes menant à la transcription de Nrf2, évitant les conséquences de la nécrose et de l'apoptose (J. Li *et al.*, 2005).

2.3.6 Formation de NETs

En 2004, il a été démontré pour la première fois que les neutrophiles étaient capables de former des structures extracellulaires, nommés NETs (Brinkmann *et al.*, 2004). Ce mécanisme implique l'expulsion d'un réseau dense en ADN et en protéines à l'extérieur de la cellule. Plus précisément, les NETs sont formés en majorité de composants de l'ADN nucléaire (histones), ainsi que de composants du cytoplasme tels que des protéines antimicrobiennes (lactoferrine, cathepsine G et défensine) et d'enzymes catalytiques (MPO et élastase) contenues dans les granules (Brinkmann *et al.*, 2004). Sa grande teneur en enzymes et peptides antimicrobiens facilite l'élimination des pathogènes (Wartha *et al.*, 2007). Des études (Soehnlein, 2009) ont démontré que l'élastase, la cathepsine G et la protéinase 3 dégradent les facteurs de virulences des bactéries Gram positifs (*Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pneumoniae*) et des bactéries Gram négatifs (*Salmonella flexneri* et *typhimurium*). Plusieurs signaux peuvent initier la formation des NETs tels qu'une liaison aux TLRs, aux FcγRs, ainsi qu'aux récepteurs des cytokines et chimiokines (Wartha *et al.*, 2007). De plus, suite à l'activation de ces récepteurs, un déclenchement des voies de signalisations induit l'activation du complexe de la NADPH oxydase, qui va ensuite induire la formation et l'externalisation des NETs. Ceci suggère donc que la formation des NETs est dépendante de l'activation des ROS (Fuchs *et al.*, 2007). Une fois la libération des NETs, le neutrophile meurt par une mort cellulaire spécifique nommée la NETose (Steinberg *et al.*, 2007). Ainsi, les particules exogènes deviennent prisonnières et subissent le sort catalytique des enzymes pendant que le neutrophile meurt de son déversement intracellulaire.

2.3.7 Mort cellulaire

Il est connu depuis longtemps que la demi-vie des neutrophiles est courte. Cependant, le mécanisme exact de leur mort cellulaire est dépendant de l'agent inflammatoire, pouvant résulter à l'apoptose, la nécrose, la pyroptose, l'oncose, la NETose (Kennedy *et al.*, 2009) et récemment reporté, l'autophagie (Mitroulis *et al.*, 2010). Ainsi, lors de la résolution de l'inflammation ou du vieillissement, les neutrophiles privilégient la voie de l'apoptose, aussi considérée comme un processus d'élimination sécuritaire ne conduisant pas à l'inflammation (Savill *et al.*, 1995). Au contraire, la mort nécrotique cause la libération d'alarmines (DAMPs) et par conséquent active le système immunitaire en induisant l'inflammation (Harris *et al.*, 2012).

La morphologie des cellules apoptotiques est signalée par une membrane intacte et dense suite à la compaction de la chromatine. Cette mort cellulaire programmée est strictement contrôlée par deux voies de signalisations distinctes (figure 5). Autant la voie intrinsèque qu'extrinsèque culminent à l'activation des caspases, clivant les protéines intracellulaires et résultant à la mort de la cellule.

La voie intrinsèque dépend de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 qui possède une très courte demi-vie (2 à 3 heures environ) (Derouet *et al.*, 2004). En effet, sous conditions de stress, la protéine inhibitrice iBH3 va se lier à Mcl-1 ou Bcl-2 (protéines anti-apoptotiques) qui sont localisées sur la membrane mitochondriale. Leur liaison résultera en une perturbation de la perméabilité membranaire et à la libération du cytochrome C dans le cytoplasme. Ce dernier deviendra disponible pour se lier au complexe de la caspase-9 et Apaf-1, formant ainsi l'apoptosome. Le clivage de la caspase 9 engendre l'activation de la caspase-3 qui va ensuite transloquer au noyau et dégrader l'ADN induisant, par conséquent, l'apoptose (Melley *et al.*, 2005). La voie extrinsèque est, quant à elle, régulée par des molécules proapoptotiques telles que Fas, TNFs et TRAIL-R2 et -3 et fait intervenir des récepteurs présents dans la membrane ou à la surface de la cellule. Ce processus implique le recrutement intracellulaire du complexe DD et de la caspase-8 qui a le rôle, tout comme la caspase-9, d'activer directement la caspase-3, causant la destruction nucléaire et la mort cellulaire (Akgul *et al.*, 2003). La reconnaissance des neutrophiles apoptotiques par les macrophages se fait par l'externalisation des phosphatidylsérine et l'expression de marqueurs (CD35-CD36-CD63) à la surface du neutrophile (Blume *et al.*, 2012). L'ingestion des neutrophiles apoptotiques par les macrophages induit la libération de médiateurs solubles, entre autres Fas, qui va mener à l'apoptose extrinsèque des neutrophiles restant (Brown *et al.*, 1999). Ensuite, les macrophages cessent de produire des cytokines et médiateurs pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-15, TNF- α , INF- γ et G-CSF) (Leuenroth *et al.*, 2000) et initient la libération de médiateurs anti-inflammatoires (IL-10 et TGF- β et VEGF) conduisant à une tolérance immunologique (Savill *et al.*, 2002).

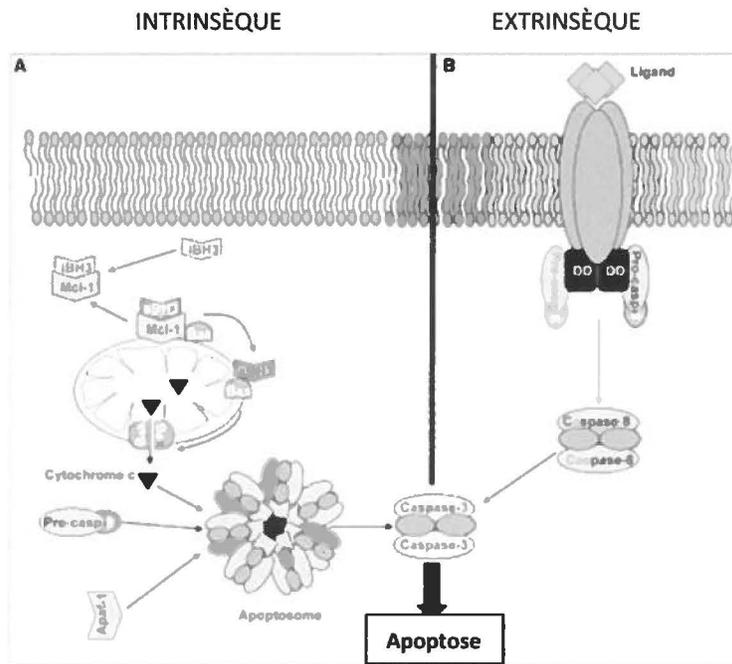


Figure 5 : Les voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose chez le neutrophile (adapté de (Wright HL et al, 2010 : 1257)).

2.4 Maladies associées aux neutrophiles

Basé sur leurs caractéristiques et fonctions, il est évident que le neutrophile possède un énorme potentiel pour la défense immunitaire. Cependant, de plus en plus d'études illustrent la contribution du neutrophile dans le développement d'un grand nombre de maladies humaines. En effet, le neutrophile est considéré comme une arme à double tranchant. S'ils sont absents, le risque aux infections, résultant d'une croissance bactériennes ou fongiques au site de la blessure ou aux muqueuses exposées, devient considérablement plus élevé (neutropénie). À un autre extrême, la suractivation des neutrophiles peut être fatale dans des maladies non reliées à l'immunité telles que le diabète, l'arthrite rhumatoïde et la thrombose. Dans la plupart de ces maladies, il semblerait que le neutrophile soit activé de façon inappropriée et libèrerait, de manière exagérée, des molécules endommageant les tissus (protéases ou médiateurs pro-inflammatoires) ou activant une réponse immunitaire non spécifique contre l'hôte.

2.4.1 Neutropénie

La neutropénie survient lorsque la production de neutrophiles par la moelle osseuse est dépassée par leur utilisation dans le sang périphérique. Ce phénomène se constate par un compte de neutrophiles sanguins absolu inférieur à la normale. En effet, le taux normal de neutrophiles dans le corps se situe autour de 0.5 à 1×10^9 neutrophiles/litre (Lima *et al.*, 2006) et en dessous de ce taux une personne est immunosupprimée et plus propice aux infections pouvant devenir mortelles. Ce compte est grandement influencé par les maladies héréditaires et acquises (syndrome de Kostmann) qui sont associées avec des neutropénies sévères ainsi qu'à l'occurrence d'infections bactériennes, virales et fongiques dès la petite enfance (Sievers *et al.*, 1996). Le traitement avec du rhG-CSF stimule la production de neutrophiles à partir de la moelle osseuse, amenant ainsi le taux de neutrophiles à un niveau normal et prévenant les infections récurrentes (Wright *et al.*, 1994).

2.4.2 Arthrite rhumatoïde

Nous connaissons maintenant l'implication et les différents rôles du neutrophile dans la persistance de l'inflammation et la progression des dommages aux jointures lors du développement de l'arthrite rhumatoïde (AR). Cette maladie inflammatoire chronique est caractérisée par une hyperplasie synoviale menant à une destruction de la jointure et elle affecte 1% de la population mondiale (Edwards *et al.*, 1997). Des études prouvent que chez les patients où la maladie est active, le neutrophile représente 90% des cellules du liquide synovial (Cross *et al.*, 2005). Non seulement le neutrophile est retrouvé en grand nombre au site de la jointure rhumatoïde, dans le tissu synovial et le liquide de la jointure, mais il a un grand potentiel de destruction au niveau des tissus, des os et du cartilage par la sécrétion de leurs sérines et leurs protéases (MMPs) provenant des granules (Larbre *et al.*, 1994) et de leurs métabolites oxygénés (Edwards *et al.*, 1997). Les neutrophiles activés vont causer la destruction tissulaire, menant aux dommages de la jointure, en plus d'induire une amplification de la réponse immunitaire. En effet, les neutrophiles sont attirés aux jointures enflammées par des chimioattractants présents dans le fluide synovial, tels que LTB₄, C5a, IL-8 et TGF- β . Une fois arrivé au site, ils sont réactivés par des cytokines pro-inflammatoires et facteurs de croissance tels que IL-1 β , IL-6, TNF et GM-CSF (Feldmann *et al.*, 1990) et stimuleront la granulopoïèse

d'autres neutrophiles ainsi que la sécrétion de cytokines pour communiquer avec les autres leucocytes (Kotake *et al.*, 1999). La methotrexate est un traitement contre l'AR qui apaise les symptômes inflammatoires, sans guérir complètement la condition. Le médicament vise à attaquer certaines fonctions du neutrophile telles que la migration à la jointure, la dégranulation et la production de médiateurs inflammatoires (Weinmann *et al.*, 2007) empêchant donc son activité destructrice.

2.4.3 Thrombose

Les thromboses artérielles ou veineuses sont des maladies vasculaires complexes causant de nombreuses mortalités autour du monde. Des études faites chez les souris ont démontré que les neutrophiles étaient les premiers types cellulaires à se rendre et à s'accumuler aux sites de lésions vasculaires, suivis par l'activation des plaquettes (Darbousset *et al.*, 2012). La grande implication du neutrophile s'est constatée lorsque leur déplétion dans la souris réduisait considérablement la formation de thrombose (von Bruhl *et al.*, 2012). Il a été proposé que les neutrophiles activés libéraient des facteurs pro-inflammatoires endommageant ainsi la paroi (Maugeri *et al.*, 2005). Une autre étude chez la souris (Massberg *et al.*, 2010) a prouvé que deux protéases du neutrophile (l'élastase et la cathepsine-G) inactivaient une protéine inhibitrice de la cascade de coagulation et donc seraient potentiellement impliquées dans la formation de thrombose. D'autres études (Fuchs *et al.*, 2010) suggèrent que la formation de NETs jouerait également un rôle procoagulant dans le processus de thrombose, via leur activation des plaquettes dans un modèle *in vitro*. De plus, une inhibition de la formation des NETs par les DNases réduisait fortement la formation de thromboses veineuses (Brill *et al.*, 2012). Ainsi, le neutrophile peut contribuer au processus en libérant des protéases qui inactivent la voie inhibitrice de facteurs tissulaires et par la formation des NETs procoagulants.

2.4.4 Obésité et diabète

Le neutrophile peut être impliqué dans certaines maladies métaboliques, entre autres, le diabète relié à l'obésité. Des études sur la souris ont prouvé que celles qui avaient une diète riche en gras démontraient une accumulation de neutrophiles dans les tissus adipeux (Elgazar-Carmon *et al.*, 2008), de même qu'en grand nombre chez les humains obèses (Rensen *et al.*, 2009). Ces études suggèrent que l'accumulation des neutrophiles dans les tissus adipeux

conduit à l'augmentation de la dégranulation des granules spécifiques gélatinases et donc s'ensuit une augmentation de l'activité catalytique de l'élastase. L'auteur a émis comme hypothèse que les élastases clivaient le substrat au récepteur d'insuline 1 (IRS-1), ce qui empêcherait le recyclage de l'insuline, d'où le développement de la maladie métabolique (Talukdar *et al.*, 2012).

CHAPITRE 3 : NANOPARTICULES

3.1 Synthèse, applications et toxicologie

Le terme "nanoparticule" s'applique aux particules ayant une taille entre 1 et 100 nm pour leurs trois dimensions. Ces particules d'échelle nanométrique (10^{-9}) possèdent des propriétés physicochimiques très différentes des microparticules (10^{-6}) de même composition. Même si certains matériaux d'échelle du micromètre sont reconnus comme étant sécuritaires (Nohynek *et al.*, 2008), plusieurs de ces matériaux peuvent induire de la toxicité cellulaire lorsqu'ils sont réduits à une taille du nanomètre (A. Nel *et al.*, 2006). En effet, les NPs offrent une plus large surface d'absorption et une plus grande réactivité (Borm *et al.*, 2004). Ces NPs peuvent avoir différentes formes et structures telles que sphérique, plate ou en tube. De grandes quantités de nanoparticules sont libérées dans l'environnement provenant de sources naturelles telles que les feux, les éruptions volcaniques, les océans et les eaux souterraines. Les NPs peuvent également provenir de sources anthropologiques, comme dans le cas des rejets industriels, le traitement d'eau potable, la combustion du diesel et le soudage (Cyrus *et al.*, 2003). Par exemple, lors de la combustion d'une flamme de chandelle, 1.5 million de NPs de diamants sont produites par secondes (Su *et al.*, 2011).

Depuis une dizaine d'années maintenant, des investissements massifs concernant les NPs sont réalisés dans divers secteurs tels que dans les produits électroniques, cosmétiques, médicaux et alimentaires. De plus, il est prévu que des millions d'emplois liés aux nanotechnologies prendront place dans les années à venir. En effet, la capacité de pouvoir contrôler leurs tailles, leurs formes et leurs chimies de surface permet leur usage dans une panoplie d'applications biologiques. Par exemple, au niveau médical, les NPs sont utilisés en tant que système de livraison thérapeutique et d'agent d'imagerie de contraste dans le diagnostic de maladies (Schrand *et al.*, 2010). Pour améliorer les applications biomédicales, les NPs constituées de polyéthylène glycol (PEG) à la surface sont davantage utilisées puisque cette synthèse réduit leur liaison avec des molécules biologiques et augmente leur demi-vie dans la circulation systémique. Une persistance de la NP dans le sang augmenterait les chances d'une livraison plus efficace du médicament vers le tissu désiré (Walkey *et al.*, 2012) sans être éliminé par les cellules du système réticulum endothélial (RES) (Zahr *et al.*, 2006). Malgré leur grande utilité, leurs nombreuses applications industrielles sont accompagnées d'une augmentation accrue de

leur exposition chez l'humain et d'une inquiétude par rapport à leur danger potentiel sur la santé (Moyano *et al.*, 2012) (Yokel *et al.*, 2011). Malheureusement, encore de nos jours, les comportements des NPs dans l'environnement sont très peu connus, ainsi que leur interaction avec les systèmes biologiques (Oberdorster *et al.*, 2005).

3.1.1 Voies d'administration

Il est connu qu'une NP peut pénétrer dans un organisme par différentes voies : cutanée, orale et respiratoire. La voie respiratoire est la route principale des NPs, facilitant ensuite leur diffusion dans la circulation sanguine vers d'autres parties du corps tels les cellules sanguines et immunitaires, le foie, la rate, les reins, le cœur, les poumons et le cerveau (De Jong *et al.*, 2008), (Terzano *et al.*, 2010) et (Shi *et al.*, 2013). Suite à leur entrée dans la circulation sanguine, leur destin varie selon leur interaction avec les cellules de la circulation sanguine telles les protéines plasmatiques, les plaquettes, les cellules sanguines ou les cellules immunitaires (Deng *et al.*, 2009). En effet, le contact d'une particule avec le sang entraîne souvent des changements physiologiques comme la coagulation sanguine, l'inflammation et la formation de tissu collagénique (Nygren *et al.*, 1997). L'absorption gastro-intestinale et dérmale peuvent également être des voies importantes, sachant que les NPs sont introduites dans des médicaments, des boissons, de la nourriture, ainsi que dans les cosmétiques et les produits de soins corporels (Hagens *et al.*, 2007). Ainsi, en raison de leurs petites tailles, les NPs peuvent facilement traverser la région alvéolaire jusqu'aux capillaires sanguins par voie respiratoire ou bien diffuser dans les tissus lymphoïdes et dans la circulation sanguine suite à leur absorption gastro-intestinale ou épidermale. Dans tout les cas, les NPs entrent en contact direct avec les cellules du système immunitaire. Il devient ainsi extrêmement important d'évaluer l'effet de l'interaction des NPs sur les différents types cellulaires et leur influence sur le système immunitaire.

3.1.2 Distribution dans un milieu biologique

Puisque les NPs sont généralement fabriquées ou post-traitées pour des applications spécifiques, leurs propriétés physico-chimiques et leur réactivité peuvent varier considérablement dans l'environnement. La taille de la NP joue un rôle primordial et influence directement son accès au sang. Les NPs de petites tailles (<100 nm) sont plus disponibles pour une translocation aux poumons, aux nœuds lymphatiques ou directement vers la circulation

sanguine, alors que les agglomérats ou les particules de plus grandes tailles (>100 nm) sont facilement détectés et éliminés par les macrophages alvéolaires (Noel *et al.*, 2012). Cependant, une réduction au niveau de la taille résulte en une augmentation du ratio de volume/surface, incitant une plus grande interaction avec les molécules biologiques (Oberdorster *et al.*, 2005). C'est pourquoi les NPs peuvent subir des phénomènes d'agrégation (Stark, 2011), de dissolution (Xia *et al.*, 2008), d'absorption de protéines (Ehrenberg *et al.*, 2009) ou d'ions provenant du milieu biologique conduisant à la formation de nouvelles entités (M. Xu *et al.*, 2012).

L'agglomération (particules liées par des forces faibles) et l'agrégation (particules maintenues ensemble par des forces de liaisons chimiques fortes) des microparticules (MPs) et des NPs à la surface d'une cellule peuvent affecter sa communication avec l'environnement (Kirchner *et al.*, 2005). Ainsi, la communication intercellulaire diffère selon leurs contacts avec les particules environnantes. La dissolution d'une particule dépend autant des propriétés physico-chimiques (taille, aire de surface et composition chimique) que des paramètres environnementaux (pH et température). En fait, une NP de faible taille aura un ratio de dissolution plus élevé en raison de sa grande superficie (Bian *et al.*, 2011). De plus des conditions de pH acides et de températures faibles (20°C vs 37) favorisent la dissolution d'une NP (Miao *et al.*, 2010) (Reed *et al.*, 2012). Même si l'origine de la dissolution particulière varie d'une étude à l'autre, le résultat final est souvent cytotoxique par la formation de ROS dans la cellule de l'hôte, l'inhibition d'activités enzymatiques conduisant à des perturbations de l'homéostasie causant la mort cellulaire. De nombreuses études sur les NPs de ZnO ont attribué les effets toxiques principalement dus à la libération de cations métalliques suite à leur dissolution en des ions Zn^{2+} dans les cultures cellulaires (M. Xu *et al.*, 2012). Pour ce qui est de l'absorption des protéines, la formation d'une couronne de protéines (corona) autour de la NP dépend de plusieurs paramètres : la taille, l'aire de surface, la charge et l'énergie de surface (Lundqvist *et al.*, 2008). Celles-ci modulent l'adhérence et l'activation cellulaire (Vroman, 1984). En fait, l'absorption des protéines de l'hôte sur la NP masque sa composition chimique de surface et augmente ses chances d'internalisation au sein d'une cellule (Maiorano *et al.*, 2010). En raison de leur petite taille, les NPs peuvent échapper à l'activité phagocytaire des macrophages, se lier aux protéines sériques et agir comme des haptènes, activant par la suite le système du complément (Dwivedi *et al.*, 2011). Une fois au sein de la cellule, les NPs peuvent se lier à différentes biomolécules telles qu'à l'ADN ou des petits fragments de peptides et de protéines. Ainsi, des matériaux inertes à l'échelle micrométrique peuvent devenir réactifs et toxiques à une taille

inférieure, ce qui demande une attention particulière pour l'évaluation de la toxicité des NPs dans un milieu biologique à l'encontre des cellules sanguines, immunes ou plasmiques circulantes.

3.1.3 Voies d'internalisation

En fonction de leur taille, charge et aire de surfaces, les NPs sont internalisées de différentes manières dans une cellule. Les particules MPs sont internalisées via la phagocytose par les monocytes, les macrophages et les neutrophiles, alors que les NPs utilisent d'autres moyens, possiblement par l'endocytose médiée par les clathrines ou les cavéolines, la macropinocytose, ou encore la voie passive (Tantra *et al.*, 2011). La plupart des NPs de très petite taille (1 à 10 nm) sont généralement internalisées par voie passive (Kim *et al.*, 2012), (Lin *et al.*, 2010). Récemment, nous avons découvert que l'internalisation des NPs par les cellules dépendrait non seulement de la superficie, mais également de leur charge de surface (Dobrovolskaia *et al.*, 2009). Par l'attraction des charges, les NPs chargées positivement ont une plus forte chance de pénétrer dans une cellule, puisque celle-ci possède une charge négative. En effet, des études ont prouvé que les NPs de ZnO cationique, comparé aux NPs anioniques ou non ioniques, étaient retrouvées en plus grande quantité à l'intérieur de la cellule (Asati *et al.*, 2010). De plus, la NP chargée positivement induit plus de cytotoxicité par sa dissolution en ions Zn^{2+} localisés dans les compartiments à faibles pH, soit dans les lysosomes ou phagosomes. Cependant, en raison de leur aire de surface, les NPs ont tendance à s'agglomérer ou à interagir avec des protéines telles les immunoglobulines ou l'albumine, pour former des particules de plus grandes tailles (micromètre) étant plus stables dans l'environnement. Ainsi, suite à leur agglomération, la NP peut être internalisée par phagocytose et déclencher l'activation d'une nouvelle réponse cellulaire, entraînant un facteur clé dans la compréhension de son comportement cytotoxique. Ceci suggère que la taille, l'aire de surface et la charge de l'agrégat sont directement proportionnelles à l'effet cellulaire.

3.1.4 Actions toxiques

La toxicité des NPs dépend de plusieurs facteurs, incluant leur nature chimique, leur taille, leur forme, leur réactivité de surface, leur solubilité dans un milieu biologique, ainsi que leur degré d'agrégation (Verma *et al.*, 2010) (figure 6). Les actions toxiques produites par les NPs peuvent

se regrouper en trois mécanismes distincts (Brunner *et al.*, 2006) : (1) la libération de substances toxiques par la NP (ion libre), (2) la production de substances toxiques (oxydants ou protéases) par la cellule suite à son interaction avec une NP, (3) la mort cellulaire causée par la destruction membranaire ou l'interaction avec des molécules biologiques en présence de la NP (Rothen-Rutishauser *et al.*, 2007). Identifier les facteurs physicochimiques qui régissent les effets toxiques des NPs devient nécessaire pour la sécurité de leur synthèse et application.

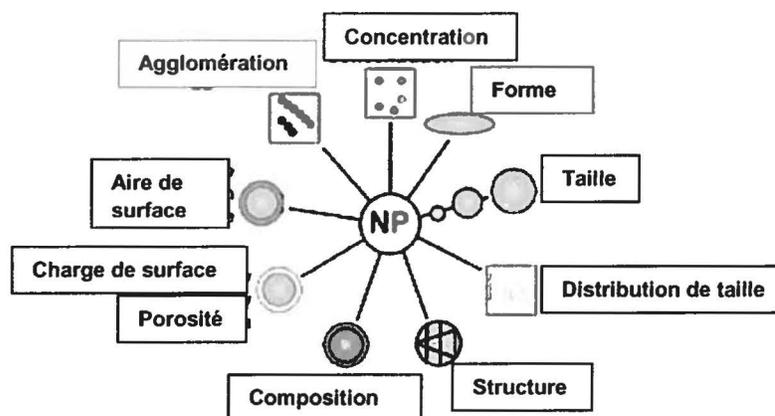


Figure 6 : La sélection des nanoparticules pour les études de toxicologie, corrélation entre leurs propriétés physico-chimiques et leurs profils de toxicité (adapté de (Amberg, M.E et al, 2009 : 668)).

Un grand nombre de préoccupations concernant les effets toxicologiques potentiels des NPs a été validé dans différentes publications (Borm *et al.*, 2006) (Maynard *et al.*, 2006). Toutefois, la plupart de ces recherches sont faites *in vitro* et démontrent la toxicité cellulaire reliée au stress oxydatif. En effet, le stress oxydatif peut causer des dommages membranaires, l'altération de l'expression génique et des voies de signalisation, de l'inflammation et même la mort cellulaire. Cependant, plusieurs variables telles que le temps d'exposition, la concentration, la taille, l'aire de surface, la phase cristalline de la NP, ainsi que ses différentes tailles d'agglomérats rendent la comparaison entre ces différentes études très ardues. En effet, plusieurs facteurs limitent la comparaison d'études *in vitro* et *in vivo* telles que la dose, puisqu'une NP à faible dose peut devenir très toxique à forte dose. L'aire de surface et la dispersion sont deux autres critères importants (Duffin *et al.*, 2007). Ainsi, une NP fortement agglomérée est moins toxique qu'une NP fortement dispersée (Fubini *et al.*, 2010). D'autres études ont démontré que certaines NPs pouvaient briser des compartiments lysosomaux à l'intérieur des cellules phagocytaires, se comportant ainsi comme des molécules de danger (DAMPs). Les particules en dessous de 200nm ne seraient pas reconnues par le système immunitaire et seraient donc considérées

comme étant invasives aux structures de l'organisme (Watari *et al.*, 2009) pouvant avoir un impact sur l'homéostasie du système immunitaire qui peut conduire à une augmentation d'incidence auto-immune, à des réactions allergiques, ainsi qu'à des maladies néoplasiques (Roy *et al.*, 2013). Ainsi, pour toutes ces raisons, il devient difficile d'établir une relation directe entre les propriétés physicochimiques de la NP et l'induction d'une toxicité (Johnston *et al.*, 2009).

3.2 Nanotoxicologie d'oxydes métalliques

La nanotechnologie a démontré un grand potentiel pour améliorer plusieurs aspects de notre vie, entre autres, par la création de matériaux industriels et d'applications médicales. Deux types de NPs sont grandement utilisés, soit les NPs à centre mou (à base de polymères) ou les NPs à centre dur (par exemple, les oxydes métalliques) (Halamoda Kenzaoui *et al.*, 2012). Concernant les oxydes métalliques, ils sont abondamment produits dans les industries et sont émis par plusieurs processus de combustion, dans les cosmétiques, dans les crèmes solaires, dans les textiles et dans les produits d'élimination d'odeurs et de décontamination (Puzyn *et al.*, 2011). Depuis quelques années, avec la naissance et le développement de la nanotoxicologie, des préoccupations au sujet des effets toxicologiques potentiels sur la santé humaine ont refait surface (Horie *et al.*, 2012). La nanotoxicologie se décrit comme étant la relation entre les propriétés physico-chimiques d'une NP et leurs effets toxiques sur les cellules vivantes et les systèmes biologiques, soit l'étude sur la toxicologie des nanomatériaux *in vitro* et *in vivo*. Plusieurs NPs d'oxydes métalliques ont été appelées à être testées avant leur introduction dans les applications diverses. Cependant, plusieurs NPs sont utilisées en industrie depuis des décennies sans avoir été proprement testées comme le TiO₂. Deux mécanismes généraux peuvent être responsables d'une éventuelle toxicité liée aux NPs d'oxydes métalliques. La première est l'activité catalytique intrinsèque qui peut perturber les processus par les voies de signalisation à l'intérieur de la cellule. Le deuxième est la libération d'ions, affectant la concentration initiale d'ions métalliques à l'intérieur de la cellule. Ainsi, en raison de la grande quantité de NPs non testée et grandement utilisée par les industries, des approches prédictives sont urgentes afin d'évaluer leur toxicité potentielle.

3.2.1 Interaction avec système immunitaire

La réponse inflammatoire est très souvent un paramètre investigué pour définir l'effet que pourrait avoir une NP à l'intérieur de l'organisme (A. E. Nel *et al.*, 2009) (Cho *et al.*, 2010). Les NPs interagissent avec les composantes du système immunitaire et peuvent soit augmenter ou diminuer les fonctions (Dobrovol'skaia *et al.*, 2008). En effet, elles peuvent l'affecter par inhibition ou activation conduisant à des réponses allergiques ou d'hypersensibilité par la production d'anticorps contre le revêtement des NPs (Hu *et al.*, 2009). C'est pour cette raison que les NPs doivent être développées en utilisant du matériel non toxique, biocompatible, biodégradable ou qui a des effets bénéfiques ou très faiblement nocifs. La modulation des fonctions immunitaires par les NPs peut être nuisible ou utile dépendamment de l'application envisagée (Zolnik *et al.*, 2010). Elles peuvent être utilisées contre les cellules immunitaires pour diminuer des problèmes allergiques ou auto-immuns par exemple ou augmenter leurs fonctions de défense contre les cellules cancéreuses. Des études *in vitro* et *in vivo* démontrent que les NPs sont capables d'activer la production des cytokines pro-inflammatoires, les chimiokines et les molécules d'adhésion par le recrutement de cellules inflammatoires, soient les macrophages, les neutrophiles, les éosinophiles et les lymphocytes T (X. Chang *et al.*, 2014). Ainsi, sachant que plusieurs composantes des NPs peuvent individuellement affecter les cellules, il devient primordial de tester les conséquences des interactions de différentes NPs avec différents types cellulaires (Halamoda Kenzaoui *et al.*, 2012). Les cellules du système immunitaire représentent une cible de toxicité potentielle en raison de la forte probabilité d'internalisation des NPs par les phagocytes tels les neutrophiles et macrophages. En conséquence, puisque la population est soumise à une exposition de NPs (via les différentes routes décrites précédemment), il devient primordiale d'évaluer l'effet des NPs sur la santé humaine.

3.3 Nanoparticules de dioxyde de titane

Le dioxyde de titane (TiO₂) se forme naturellement en trois structures cristallines, soit la forme rutile, l'anatase et la brookite. La forme rutile est la plus stable à pression et température élevées et est utilisée pour ses propriétés de réfraction dans les ultra-violets (UV) et dans les longueurs

d'onde du visible (Smijns *et al.*, 2011). Le rutile possède de 90 à 95% de dioxyde de titane. Les dioxyde de titane anatase et brookite sont des formes pures contenant des traces de fer et de niobium, l'anatase contenant en plus de l'éteïn et la brookite du tantale. Le dioxyde de titane est un oxyde métallique qui offre un maximum d'opacité et de blancheur favorisant son introduction dans un large éventail de produits tels que la peinture, le papier, le plastique, le caoutchouc, la céramique et la nourriture (entre autres, le lait écrémé et le fromage cottage) (Hext *et al.*, 2005). Il est également grandement utilisé en tant que produits cosmétiques (lotion et dentifrice) et pharmaceutiques (Hext *et al.*, 2005). Non seulement le TiO_2 est grandement exploité pour ses propriétés blanchissantes, mais il peut également être utilisé dans des réactions catalytiques comme celle de la photocatalyse semi-conductrice dans le traitement contre la contamination des eaux (Yuan *et al.*, 2010). La NP de TiO_2 a également trouvé son compte dans des applications d'autonettoyage pour les tuiles et les fenêtres, ainsi que dans des produits antibués pour les miroirs (Montazer *et al.*, 2011). Il est important de souligner que le TiO_2 est fortement insoluble, non réactif avec d'autres matériaux, thermostable et non inflammable. Ainsi, en raison de son faible coût de production, de sa photo-stabilité en solution, de ses propriétés anticorrosives et de sa faible toxicité générale, cet oxyde métallique continue à gagner de l'intérêt dans les applications industrielles. La production commerciale de TiO_2 entre 2006 et 2010 a été estimée à 5000 tonnes/an, un chiffre qui a doublé entre les années 2011 et 2014 et qui pourrait atteindre près de 2.5 millions de tonnes en 2025 (Menard *et al.*, 2011).

Ces propriétés ont favorisé son utilisation comme témoin négatif de poussière dans des modèles de santé respiratoire. Cependant, il a été retiré comme témoin négatif lorsque des résultats ont démontré que leur présence induisait de multiples cancers pulmonaires chez les rats (Lee *et al.*, 1985). En 2010, l'agence internationale pour la recherche contre le cancer (IARC) a classé le TiO_2 comme étant carcinogène pour l'homme (2010). De nos jours, la toxicité de cette NP est associée à ses propriétés photocatalytiques en raison de la formation d'anions superoxydes (O_2^-) et de radicaux hydroxyles (OH) en présence de lumière. La photoréactivité de ces NPs est grandement influencée par leur chimie de surface. Ainsi, le recouvrement de surface préviendrait les effets néfastes de la photocatalyse tels que la dégradation de composés organiques induite par la production de ROS (Yin *et al.*, 2010). Une équipe a démontré qu'une greffe par recouvrement à base de polymères diminuait l'effet cytotoxique sur une lignée de cellules pulmonaires humaines (Tedja *et al.*, 2012).

3.3.1 Études *in vitro* sur les cellules immunitaires

En raison à l'omniprésence des NPs de TiO₂ dans les industries et dans la vie quotidienne, un nombre croissant de chercheurs étudie leur toxicité sur les systèmes respiratoires et métaboliques des organismes (Zhang *et al.*, 2011). De plus en plus de recherches se concentrent sur l'effet de l'interaction de NPs de TiO₂ avec des cellules saines du système immunitaire *in vitro* ou avec des modèles *in vivo* illustré par le tableau 3. Parmi ces tests, des études *in vitro* sur les neutrophiles humains ont démontré l'effet de TiO₂ sur l'adhésion du granulocyte, de par la diminution de l'expression de leurs sélectines-L, de leurs récepteurs FcγIII (CD16), ainsi que de leurs intégrines (CD11b), suggérant que l'oxyde métallique inhibait leurs fonctions d'adhésion (Eriksson *et al.*, 2001). D'autres tests sur les neutrophiles de poisson rouge ont démontré que les NPs de TiO₂, ZnO et CeO₂ augmentait les ROS et diminuaient la viabilité de ces cellules (Ortega *et al.*, 2013). De plus, le CeO₂ augmentait la dégranulation à des doses aussi faibles que 10µg/ml. Ils ont également démontré que la NP de TiO₂ avait triplé la synthèse de gènes pro-inflammatoires tels que l'IL-β et l'INF-γ.

Un grand nombre d'études *in vitro* ont évalué l'effet des NPs de TiO₂ sur des modèles de macrophages. Les NPs ont induit l'inflammation par l'activation de l'inflammasome Nlrp3 chez les macrophages de souris (BDMC), conduisant à l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires (IL-1α et β) (Yazdi *et al.*, 2010). Un groupe de recherche a évalué l'effet cytotoxique des NPs dépendamment de leurs tailles sur les macrophages provenant du rat (Demou *et al.*, 2009). Les NPs de TiO₂ de petite taille augmentaient la mort cellulaire alors que les NPs de plus grande taille induisaient une augmentation du stress oxydatif. L'auteur suggère que les NPs de plus petites tailles causent une cytotoxicité en pénétrant plus facilement dans la cellule, réduisant ainsi leur interaction avec la membrane cellulaire. Au contraire, celles avec les plus grande taille rentreraient en contact avec des récepteurs membranaires, entraînant une activation des voies de signalisation et causeraient un stress oxydatif. D'autres études évaluant l'effet du TiO₂ chez les macrophages alvéolaires pulmonaires (PAMs) du rat ont démontré que la NP induisait la sécrétion de cytokines pro-inflammatoire (TNF-α), ainsi que la production de ROS (Liu *et al.*, 2010). De plus, ces NPs de TiO₂ ont provoqué des effets inhibiteurs sur les fonctions phagocytaires et chimiotactiques des macrophages.

3.3.2 Études *in vivo* sur les modèles inflammatoires

Une grande majorité des études *in vivo* est réalisée au niveau de l'inflammation pulmonaire chez le rat. Une équipe de recherche a démontré que les NPs de TiO₂ de plus petite taille (10nm) produisaient une plus grande inflammation pulmonaire cytotoxique que les NPs de tailles plus larges (300nm) à concentration massique équivalente, illustré par le développement de lésions suite à l'infiltration de neutrophiles et macrophages (Warheit *et al.*, 2006). Un autre groupe de recherche a confirmé cette étude précédente lorsque les autres ont démontré que les NPs de petite taille (20nm) augmentaient la toxicité pulmonaire, via l'entrée des macrophages alvéolaires (AM) dans l'interstitiel des poumons, un phénomène qui n'a pas été observé par les NPs de plus grande taille (250 nm) (Oberdorster *et al.*, 1992). Selon une autre étude, des rats exposés aux NPs démontraient une réponse inflammatoire pulmonaire traduite par une plus grande infiltration des neutrophiles aux tissus pulmonaires (Wiethoff *et al.*, 2003). Une autre étude a démontré que les NPs induisaient une libération de facteurs chimiotactiques spécifiques, incluant MIP-2, au recrutement du neutrophile dans les poumons, suivant l'exposition aux NPs de TiO₂ (Yuen *et al.*, 1996).

D'autres études *in vivo* utilisant des modèles de souris ont été effectuées en présence de TiO₂. Un groupe de chercheurs a observé une augmentation des cellules inflammatoires (macrophages, neutrophiles et éosinophiles) aux tissus pulmonaires, résultant en des dysfonctions biochimiques et un stress oxydatif sévère, suggérant le grand potentiel inflammatoire des NPs de TiO₂ (B. Li *et al.*, 2013). D'autres études ont rapporté qu'une exposition orale aux NPs de TiO₂ (5 nm) diminuait considérablement les paramètres hématologiques et immunologiques dans le sang chez la souris CD-1. Le compte total de globules rouges et blancs du sang (lymphocytes T-B et cellules NK) ainsi que les niveaux d'IL-12 était considérablement affecté à la baisse (Duan *et al.*, 2010). Cependant, une autre équipe qui a repris la même expérience chez la souris B6C3F1 n'a observé aucune suppression de la réponse immunitaire (Auttachoat *et al.*, 2013).

Tableau 3 : Études *in vitro* et *in vivo* récentes sur les effets immunomodulateurs des NPs de TiO₂.

Méthodologie	Effets observés	Références
<i>Études in vitro</i>		
NPs TiO ₂ (35 nm) testées sur des neutrophiles de poissons rouges, à dose de 10-100-200 µg/ml	TiO ₂ : Diminution de la viabilité cellulaire et augmentation de la synthèse de gènes pro-inflammatoires (IL-β et INF-γ)	Ortega VA et al (2013)
NPs TiO ₂ (20 nm) testées chez les macrophages du rat (BMDC), à dose de 200 µg/ml	Activation de l'inflammasome Nlrp3, conduisant à l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires (IL-1α/β)	Yazdi AS et al (2010)
Deux tailles de NPs TiO ₂ (110 et 180 nm) testées sur les macrophages du rat	NPs de petite taille augmentent la mort cellulaire, alors qu'au contraire les NPs de grande taille augmentent le stress oxydatif	Demou E et al (2009)
NPs TiO ₂ testées sur les macrophages alvéolaires pulmonaires (PAMs) du rat	Augmentation de TNF-α et des ROS, ainsi qu'une inhibition de leur phagocytose et chimiotaxie	Liu R et al (2010)
<i>Études in vivo sur l'inflammation pulmonaire</i>		
Deux tailles de NPs TiO ₂ (10 et 20nm) et (250 et 300 nm) testées chez le rat CD(SD)IGS BR et Fischer, à dose de 5 mg/kg	NPs de petites tailles causent une plus grande lésion pulmonaire par l'infiltration de neutrophiles et macrophages	Warheit DB et al (2006), Oberdorster G et al (1992)
NPs TiO ₂ (320 nm) testées chez le rat, à dose de 1 ou 5 mg/kg	Infiltration neutrophilique augmentée, aucun effet sur l'apoptose des neutrophiles	Wiethoff AJ et al (2003)
NPs testées chez le rat	Augmentation de l'infiltration neutrophilique, ainsi que de la libération de facteurs chimiotactiques (MIP-2)	Yuen IS et al (1996)
NPs TiO ₂ (6 nm) testées chez la souris CD-1, à dose de 2.5, 5, et 10 mg/kg	Infiltration des cellules immunitaires (macrophages, monocytes et neutrophiles) aux tissus pulmonaires, ainsi qu'une augmentation du stress oxydatif	Li B et al (2013)
NPs TiO ₂ (5 nm) testées chez la souris CD-1, à dose de 62.5, 125, 250 mg/kg	Diminution des cellules du sang périphérique (globules rouge et blanc), ainsi qu'une diminution de l'IL-2	Duan Y (2010)
NPs TiO ₂ (25 nm) testées chez la souris B6C3F1 et BALB/c, à dose de 1.25-250mg/kg	Aucun effet sur les fonctions des cellules du sang périphériques	Auttachoat W et al (2013)

3.4 Nanoparticules de dioxyde de zinc

L'oxyde de zinc (ZnO) apparaît naturellement dans la couche terrestre et possède deux formes cristallines, soit la wurtzite et le zinc-blende. La forme wurtzite est la plus stable et la plus couramment utilisée dans les produits commerciaux tels que le plastique, la céramique, le verre, le ciment, le caoutchouc, la peinture, les batteries, les retardateurs de flamme et la nourriture (H. Ma *et al.*, 2013). Tout comme le TiO₂, les NPs de ZnO sont aussi introduites dans des produits de soins personnels tels que les cosmétiques et les crèmes solaires, en raison de leur forte propriété absorbante des UVs et de leur propriété réfléchissante. Puisque le TiO₂ est

plus efficace contre les UVBs, alors que le ZnO contre les UVAs, leur combinaison assure une protection idéale dans le large spectre des UVs.

Le zinc est un élément trace essentiel dans le métabolisme cellulaire et joue un rôle régulateur des fonctions immunitaires chez l'homme (Prasad, 2008). En effet, il est un cofacteur inorganique dans plusieurs processus cellulaires tels que la synthèse, la réplication et la traduction de l'ADN, ainsi que dans le repliement et dans l'activité des protéines (Sekler *et al.*, 2007). Cependant, il a été démontré (Xia *et al.*, 2008) que la NP de ZnO internalisée par la cellule peut être rapidement dissoute, libérant des ions cationiques Zn^{2+} . Cette dissolution augmente le taux intracellulaire d'ion Zn^{2+} et un débalancement des ions de zinc peut avoir des effets délétères sur l'homéostasie de la cellule, sachant que ce métal se lie à 10 % des protéines chez l'humain (Tuomela *et al.*, 2013). En effet, le ZnO ne peut pas directement induire la production des ROS puisque son état d'oxydation (Zn^{2+}) n'a pas la capacité de réduire les électrons dans un système biologique. De plus, les NPs de ZnO peuvent indirectement augmenter la production des ROS en se liant aux composés inhibiteurs de stress oxydatif, soit les métallothionines. Cette liaison exclusive aux NPs de ZnO empêche la liaison des autres ions métalliques tels que le fer et le cuivre. Ainsi, la disponibilité des autres ions métalliques induit les réactions de type Fenton et donc par la suite, le stress oxydatif dans la cellule (Krezel *et al.*, 2007). Cette dissolution particulière ainsi que la forte toxicité des NPs de zinc explique pourquoi il est qualifié comme l'oxyde métallique le plus toxique (Adams *et al.*, 2006).

3.4.1 Études *in vitro* sur les cellules immunitaires

Peu d'études ont évalué la toxicité des NPs de ZnO sur les cellules primaires humaines et encore moins leurs potentiels effets immunomodulateurs. Cependant, quelques tests ont été effectués *in vitro* sur les lignées cellulaires de macrophages et monocytes humains et murins, tel qu'énoncé dans le tableau 4. Pour ce qui est des études sur les macrophages, des chercheurs se sont concentrés sur la route d'internalisation des NPs de CeO_2 , ZnO et TiO_2 chez les macrophages murins (RAW 264.7) (Xia *et al.*, 2008). Les NPs de ZnO ont augmenté la production des ROS ainsi que la mort cellulaire, suivi d'une internalisation dans les lysosomes. Au contraire, les NPs de CeO_2 ont induit la diminution des ROS, alors que le TiO_2 n'a démontré aucun effet. Ces deux dernières NPs ont été localisées dans les compartiments endosomales des calvéolines. Une autre équipe a démontré que l'effet cytotoxique des NPs de ZnO chez les

macrophages dérivant des monocytes humains (HMDM) provenait de leur dissolution intracellulaire dans les vésicules à faible pH ainsi que leur libération d'ions Zn^{2+} dans le cytoplasme (Shen *et al.*, 2013). Des études ont démontré que les NPs de ZnO induisaient l'apoptose intrinsèque des macrophages murins (RAW264.7) par la formation de ROS, l'activation des caspase-9 et -3, ainsi que la condensation nucléaire (Wilhelmi *et al.*, 2013). D'autres études ont démontré l'effet cytotoxique des NPs et des ions de ZnO sur la production intracellulaire des ROS chez les macrophages de souris (Ana-1) (Song *et al.*, 2010). Un autre groupe de chercheurs a évalué l'effet des NPs de TiO_2 et ZnO sur les macrophages dérivés de monocytes humains (HMDM) et a démontré que TiO_2 n'était pas toxique, alors que les NPs de ZnO causaient leur mort cellulaire, suggérant que la réponse cellulaire est grandement dépendante de la dissolution de la particule (Tuomela *et al.*, 2013).

Concernant les études effectuées sur les monocytes, une équipe de recherche a évalué la toxicité et l'effet inflammatoire potentiel des NPs et MPs de ZnO sur les THP-1 (human monocytic cell line derived from acute monocytic leukemia) (Sahu *et al.*, 2014). Ainsi, ils ont constaté que les NPs induisaient des effets nuisibles considérablement plus élevés que les MPs, en raison de la diminution de la viabilité cellulaire, l'altération de la phagocytose ainsi qu'une augmentation de la sécrétion de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, TNF- α et IL-8). Une autre étude a démontré l'effet d'une exposition de NPs de ZnO sur les monocytes, les cellules NK et les cellules T provenant directement du sang périphérique humain (Hanley *et al.*, 2009). Les monocytes et les NKC étaient les plus susceptibles aux effets toxiques de la NP que les cellules T qui elles y résistaient. En effet, le ZnO induisait une production de ROS et de cytokines pro-inflammatoires (INF- γ , TNF- α et IL-12). D'autres études ont démontré l'effet des ions libres de zinc sur des cellules promonocytes humains (HL-CZ) (Tsou *et al.*, 2011). Les résultats ont démontré que les ions libres augmentaient la production de ROS ainsi que la libération considérable de chimiokines (Gro- α et IL-8) et cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et IL-7). Une autre équipe a illustré l'effet des NPs de ZnO, sur les monocytes humains (THP-1), démontrant que la petite taille des NPs était plus cytotoxique que la taille du ZnO à l'échelle micrométrique et que les NPs à charges positives induisaient une toxicité cellulaire plus forte par rapport aux NPs anioniques ou non ioniques (Prach *et al.*, 2013). De plus, l'expression des marqueurs d'adhésion (HLA-DR, CD14 et CD11b) était légèrement augmentée en présence de ZnO.

3.4.2 Études *in vivo* sur les modèles inflammatoires

Des études *in vivo* (tableau 4) chez le rat ont démontré que le CeO₂ et le ZnO exerçaient des propriétés inflammatoires, alors que le TiO₂ ne démontrait aucune inflammation détectable au niveau des poumons (Cho *et al.*, 2010). Le traitement avec le CeO₂ était associé à une inflammation par une infiltration neutrophilique modérée, alors que celui avec le ZnO résultait en une infiltration neutrophilique et éosinophilique sévère au niveau des alvéoles et des régions prébronchiales. De plus, suite à l'injection des NPs de CeO₂, il y avait une grande présence d'IL-1 β et de MIP-2 (médiateurs pro-inflammatoires provenant des neutrophiles) alors qu'en présence des NPs de ZnO, l'IL-1 β , l'éotaxine et l'IL-13 étaient ceux détectés. D'autres tests chez le rat ont également démontré qu'en présence de ZnO, il y avait une augmentation du recrutement de neutrophiles dans les poumons (Cho *et al.*, 2012). En résumé, tous ces résultats requièrent le besoin d'évaluer l'effet des NPs de ZnO en présence de différents modèles cellulaires afin de mieux comprendre la conséquence biologique, en vue de leur éventuel usage dans les applications médicales.

Tableau 4: Études *in vitro* et *in vivo* récentes sur les effets immunomodulateurs des NPs de ZnO.

Méthodologie	Effets observés	Références
<i>Études in vitro</i>		
NPs ZnO (13 nm) testées sur des macrophages murins (RAW264.7) à dose de 12.5-50µg/ml	ZnO : augmentation des ROS et de la mort cellulaire	Xia T et al (2008)
NPs ZnO (10-40 nm) testées sur des macrophages humains (HMDM) à dose de 1-10µg/ml	Augmentation de la mort cellulaire, ainsi que de la production des ROS, en réponse à la dissolution des NPs en ions Zn ²⁺	Shen C et al (2013) Tuomela S et al (2013)
NPs ZnO (20 nm) testées chez les macrophages murins (raw 264.7), à dose de 1, 5, 10, 40 or 80 µg/cm ²	Augmentation de la mort cellulaire par apoptose intrinsèque (activation des caspases 9 et 3), ainsi qu'une production de ROS augmentée	Wilhelmi V et al (2013)
NPs ZnO (100 nm) testées sur les macrophages de souris (Ana-1), à dose de 10µg/ml	Production de ROS en réponse à la dissolution des NPs en ions Zn ²⁺	Song W et al (2010)
Deux tailles de NPs ZnO (100nm et 5µm) testées chez les monocytes humains (THP-1), à dose de 10-100µg/ml	Les deux tailles : Diminution de la viabilité, ainsi que de la phagocytose. Augmentation des cytokines (IL-1β, IL-6 et TNF-α) et chimiokines (IL-8 et MCP-1)	Sahu D et al (2014)
NPs ZnO (4-20 nm) testées chez les monocytes humains, à dose de 0, 0.5, 1, 2.5, 5, and 10 mM	Augmentation de la production de ROS, ainsi que des cytokines pro-inflammatoires (INF-γ, TNF-α et IL-12)	Hanley C et al (2009)
NPs ZnO testées chez les pro-monocytes humains (HL-CZ), à dose de 150 µM	Augmentation de la production de ROS, ainsi que des chimiokines (Gro-α et IL-8) et cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et IL-7)	Tsou TC et al (2011)
Deux tailles et trois charges de NPs ZnO (70 nm et 40µm) et (+, - et neutre) testées chez des monocytes humains (THP-1), à dose de 1 mg/kg	La taille de 70nm était la plus cytotoxique La charge cationique (+) était la plus toxique Augmentation légère des marqueurs d'adhésion (HLA-DR, CD14 et CD11b)	Prach M et al(2013)
<i>Études in vivo sur l'inflammation pulmonaire</i>		
NPs de NPs de ZnO (300 nm) testées aux régions alvéolaires prébronchiales chez le rat Wistar, à dose de 150 cm ² /rat	ZnO : Augmentation de l'infiltration des neutrophiles et éosinophiles sévère, suivis d'une libération d'IL-1β, éotaxine et IL-3	Cho WS et al (2010)

3.5 Nanoparticules de dioxyde de cérium

Le dioxyde de cérium (CeO₂) est un oxyde métallique grandement retrouvé sous forme de cérianite dans l'environnement (B. Park *et al.*, 2008) et incorporé dans des produits tels que le carburant au diesel (Corma *et al.*, 2004), les senseurs d'oxygène et le vernissage de vitres (Hussain *et al.*, 2012a). Récemment, des tests ont démontré que le cérium contribuait à réduire les émissions de particules, mais généraient l'émission de NPs d'oxyde de cérium dans les gaz d'échappements diesel. De hauts niveaux de particules de gaz d'échappement au diesel (DEP) ont contribué au développement de maladies pulmonaires aiguës et chroniques telles que les infections respiratoires et l'asthme (Dong *et al.*, 2005). Ainsi, puisque le CeO₂ est fortement

libéré dans l'environnement, des effets sur la santé humaine peuvent s'ensuivre, et c'est pourquoi l'Organisation de la Coopération et des Développement économiques a inclu les NPs de CeO₂ sur la liste des nanomatériaux requérant une évaluation urgente. Malgré les inquiétudes concernant le CeO₂, plusieurs applications thérapeutiques potentielles l'utilisent. Ainsi, la thérapie antioxydante (Korsvik *et al.*, 2007), la neuroprotection (Das *et al.*, 2007), la radioprotection (Tarnuzzer *et al.*, 2005), ou encore la protection oculaire (Chen *et al.*, 2006) en sont quelques exemples.

Pour aider à expliquer les effets contradictoires des NPs de CeO₂, des équipes ont abordé l'influence des paramètres de charge de surface, ainsi que de localisation intracellulaire. En effet, un groupe de recherche (Asati *et al.*, 2009) a prouvé que la NP de CeO₂ affichait des propriétés antioxydantes à pH physiologique (cytosol) alors qu'elle agissait comme oxydant à pH acide (lysosomes ou phagosomes). Suite à ces résultats d'autres études (Asati *et al.*, 2010) se sont concentrés sur l'effet de la charge de surface des NPs sur l'internalisation cellulaire (normal vs cancéreux). Plus spécifiquement, les NPs de CeO₂ cationiques étaient recouvertes d'acide polyacrylique, celles à charges anioniques possédaient un revêtement d'acide polyacrylique aminé alors que les NPs de charges neutres étaient fait de dextran. Les études ont démontré que les NPs cationiques étaient internalisées dans les lignées cellulaires normales, soit H9C2 (Rat cardiomyoblast cell line) et HEK293 (Human Embryonic Kidney 293 cells) alors que celles à charges anioniques étaient plus facilement internalisées dans les cellules cancéreuses A549 (Adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells). Pour ce qui est des NPs recouvertes de dextran, aucune internalisation n'a été observée. Ainsi ce comportement sélectif pourrait expliquer son effet antioxydant ou oxydant, selon la localisation intracellulaire et le type cellulaire, dépendants de sa charge de surface. Même si certaines études démontrent les effets antioxydants du CeO₂ protégeant les cellules du stress oxydatif en supprimant la production de ROS (Tsai *et al.*, 2007) (Xia *et al.*, 2008) ou thérapeutique par son action mimétique de la superoxyde dismutase (Korsvik *et al.*, 2007), d'autres études démontrent des effets délétères dans l'induction de toxicité immunitaire et systémique (Akaike *et al.*, 2000) .

3.5.1 Études *in vitro* sur les cellules immunitaires

Selon la littérature sur les études *in vitro* et *in vivo*, des effets contradictoires sont attribués aux NPs de CeO₂, démontré dans le tableau 5. Pour ce qui est des études *in vitro*, des recherches sur les macrophages alvéolaires de rats démontrent que les NPs de CeO₂ possèdent des

propriétés anti et pro-inflammatoires par leur diminution de la production des NOS, ainsi que l'augmentation de l'apoptose intrinsèque par l'activation des caspases-9 et -3, suivi de la sécrétion d'IL-12, la peroxydation des lipides et l'altération des phénotypes (J. Y. Ma *et al.*, 2011). D'un autre côté, une autre équipe de recherche a observé que le CeO₂ diminuait la production de ROS, ainsi que celle d'anions superoxydes chez les macrophages murins J774A.1 (mouse BALB/c monocyte macrophage) (Hirst *et al.*, 2009). Ensuite, pour ce qui est des études faites sur les monocytes humains, l'exposition des NPs de CeO₂ sur les monocytes humains a résulté en l'augmentation de l'apoptose suite à l'internalisation des NPs dans les vésicules ou leur disponibilité dans le cytoplasme (Hussain *et al.*, 2012b). Des études approfondies effectuées par la même équipe ont permis de déterminer que leur interaction induisait l'activation de Bax, la perte du potentiel membranaire chez les mitochondries dépendantes des caspases ainsi que la fragmentation de l'ADN (Hussain *et al.*, 2012b).

3.5.2 Études *in vivo* sur les modèles inflammatoires

Chez le rat, un groupe de chercheurs a démontré qu'une inhalation de CeO₂, induisait une cytotoxicité pulmonaire via une infiltration cellulaire au niveau du tissu et une augmentation de la phagocytose des NPs par les neutrophiles et macrophages, ainsi qu'une surproduction de ROS et de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF- α et IL-6) suivi d'une diminution d'enzyme détoxifiantes telle que la glutathione (GSH) (Srinivas *et al.*, 2011). Une autre équipe a démontré que les NPs de CeO₂ induisaient une forte réponse inflammatoire au niveau des poumons chez le rat, qui se traduisait par de l'inflammation et des lésions pulmonaires, ainsi que des altérations fonctionnelles chez les macrophages alvéolaires (J. Y. Ma *et al.*, 2011). Au contraire, des études réalisées sur des souris MCP ont démontré que les NPs de CeO₂ inhibaient non seulement l'infiltration des monocytes et macrophages mais aussi la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β et IL-6), ainsi que la production de protéines (MCP-1, HSP25, HSP40 et HSP70) (Niu *et al.*, 2007). Ainsi, les effets des NPs de CeO₂ peuvent supprimer ou augmenter les fonctions des cellules immunitaires, selon le modèle cellulaire exposé.

Tableau 5 : Études *in vitro* et *in vivo* récentes sur les effets immunomodulateurs des NPs de CeO₂.

Méthodologie	Effets observés	Références
<i>Études in vitro</i>		
NPs (20 nm) testées sur des macrophages alvéolaires du rat	Diminution de la production d'oxydes nitriques Augmentation de l'apoptose intrinsèque par l'activation des caspases 9 et 3, ainsi que la sécrétion d'IL-12	Ma JY et al (2011)
NPs (4 nm) testées sur des macrophages murins (J77A4), à dose de 10mM	Diminution de la production des ROS, ainsi que des anions superoxydes	Hirst SM et al (2009)
NPs (20 nm) testées chez les monocytes humains, à dose de 0.5-10 µg/ml	Augmentation de l'apoptose dépendante des caspases	Hussain S et al (2012b)
<i>Études in vivo sur l'inflammation pulmonaire</i>		
NPs (20 nm) testées sur des rats H1a: SD-CVF, à dose de 0.15, 0.5, 1, 3.5 or 7 mg/kg	Augmentation de l'inflammation et des lésions pulmonaires, pouvant conduire à de la fibrose	Ma JY et al (2011)
NPs (55 nm) testées chez le rat Wistar, à dose de 50 mg/kg	Infiltration cellulaire et phagocytose des NPs par les neutrophiles et macrophages alvéolaires Augmentation des ROS et cytokines (IL-1β, IL-6 et TNF-α) Diminution de l'enzyme détoxifiante (GSH)	Srinivas A et al (2011)
NPs (7 nm) testées chez la souris transgénique MCP	Inhibition de l'infiltration des monocytes et macrophages, ainsi que des médiateurs pro-inflammatoires (IL-1β, IL-6 et TNF-α), en plus de des protéines (MCP-1 et HSP25-40-70)	Niu J et al (2007)

SECTION 2 : Article

ARTICLE

TiO₂, CeO₂ and ZnO nanoparticles and modulation of the degranulation process in human neutrophils

Babin K, Antoine F, Goncalves DM, Girard D

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

Revue : Toxicology Letters - Elsevier, publié le 31 Juillet 2013

Keywords: Nanotoxicology; Inflammation; Neutrophils; Degranulation,

Corresponding 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

CONTRIBUTION DES AUTEURS

Kim Babin : Réalisation des manipulations pour les figures et tableaux de l'article.

Contribution dans la rédaction du manuscrit pour les sections : introductions, matériel et méthodes et résultats.

Francis Antoine : Contribution pour la réalisation des manipulations.

David Goncalves : Réalisation des manipulations pour la figure 1

Denis Girard : Rédaction du manuscrit pour les sections introduction, résultats, discussion et conclusion.

RÉSUMÉ DE L'ARTICLE

Les nanoparticules (NPs) sont utilisées dans une multitude d'applications, depuis qu'elles sont reconnues pour améliorer les compositions de plusieurs produits. Cependant, l'inflammation est fréquemment associée à une exposition aux NPs. Ainsi, une exposition des humains aux NPs devient de plus en plus inévitable, il devient donc important de déterminer si les NPs peuvent altérer le système immunitaire. Sachant que les neutrophiles sont les cellules clé de l'inflammation, il est donc pertinent de déterminer la capacité que possèdent les NPs à moduler leurs fonctions. Ceci représente un excellent moyen d'évaluer leur potentiel toxicologique. La dégranulation fait partie des fonctions les plus importantes qu'exercent les neutrophiles pour la défense de l'organisme contre les pathogènes et ainsi pour la régulation de l'inflammation. Elle consiste en la libération (exocytose) du contenu des différents granules incluant des enzymes catalytiques et des récepteurs impliqués dans la reconnaissance et l'ingestion de pathogènes. Nous avons préalablement identifié que les neutrophiles pouvaient être activés par certaines NPs. Par exemple, une inhibition de l'apoptose des neutrophiles en présence du ZnO et TiO₂ a été démontrée dans notre laboratoire. Ainsi, nous avons décidé de tester l'hypothèse que certaines NPs d'oxydes métalliques comme le CeO₂, ZnO et TiO₂ pouvaient agir en tant que modulateurs de la dégranulation. Cette démonstration peut nous éclaircir sur le mode d'action encore inconnu de ces NPs en relation avec l'inflammation. Nos résultats démontrent que la dégranulation est régulée à différents niveaux, dépendamment de la NP choisie. En effet, le marqueur de granules azurophiles (CD35) observé par cytométrie en flux est régulé à la baisse par CeO₂, alors que les marqueurs des granules spécifiques/gélatinases (CD66b) et sécrétoires (CD63) sont régulés à la hausse par les trois NPs. La libération spécifique d'une protéine, comme la myéloperoxydase (MPO), la métalloprotéinase (MMP-9,) ainsi que l'albumine contenue individuellement dans ces trois types de granules est augmentée par les trois NPs. Cette libération des enzymes est détectée à l'aide d'immunobuvardages de type Western. Finalement, l'activité enzymatique de MMP-9, mesurée par une technique de zymographie, se voit augmentée en présence de TiO₂ et CeO₂, alors que ZnO n'induit que faiblement son activité catalytique. De plus, à ces trois niveaux du processus de dégranulation, TiO₂ et CeO₂ étaient plus puissants que le tripeptide bactérien N-formyle-méthionine-leucine-phénylalanine (fMLP), un activateur classique des neutrophiles. Ces résultats démontrent clairement que ces NPs influencent de manière significative la dégranulation des neutrophiles et possèdent une influence sur la régulation de l'inflammation.

ABSTRACT

Inflammation is frequently associated with nanoparticle (NP) exposures. Given that excessive polymorphonuclear neutrophil cell degranulation is a common feature of inflammatory disorders, and since these cells are key players in inflammation, we decided to test the hypothesis that NPs could act as modulators of degranulation in human neutrophils. TiO₂, CeO₂ and ZnO NPs slightly down-regulated cell surface expression of the granule marker CD35, but increased CD66b and CD63 expression, as assessed by flow cytometry. In addition, expression of myeloperoxidase, MMP-9 (CD66b) and albumin stored in azurophil, specific/gelatinase and secretory granules, respectively, was significantly increased in the supernatants of NPs-induced neutrophils when compared to untreated cells. Moreover, NPs were more potent than the classical bacterial tripeptide N-formyl-methionine-leucine-phenylalanine (fMLP) agonist. Finally, TiO₂ and CeO₂ markedly increased the enzymatic activity of MMP-9 released into the supernatant, as assessed by gelatin zymography, while ZnO exerted only a modest effect. We conclude that NPs can differentially affect all steps involved during neutrophil degranulation, namely, cell surface expression of granule markers, liberation of proteins in the supernatants and enzymatic activity. These results are expected to be helpful to understand the toxicity of TiO₂, CeO₂ and ZnO.

INTRODUCTION

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

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

Given the importance of neutrophils in inflammation, investigating the ability of NPs to modulate neutrophil functions is an excellent way to evaluate potential nanotoxicity of a given NP. Degranulation is one of the most important functions exert by neutrophils for the defense of an organism against an infection. It consists of a rapid release of potent degradative enzymes and several receptors involved in the recognition and ingestion of pathogens localized in different kinds of granules: azurophil, specific/gelatinase and secretory granules (Borregaard *et al.*, 2001). Several mediators have been shown to induce degranulation in human neutrophils, including formyl-methionine-leucine-phenylalanine (fMLP), interleukin-8, the anticancer drug arsenic trioxide, myeloid related protein S100A9, etc. (Binet *et al.*, 2008, Mikkel Faurschou *et al.*, 2003a, Hoffstein *et al.*, 1982, J. C. Simard *et al.*, 2010b). To our knowledge, we are the first to examine the ability of NPs to promote human neutrophil degranulation. Herein, using human neutrophils isolated from healthy individuals, we demonstrated that TiO₂, CeO₂ and ZnO NPs can differentially alter all steps involved in the degranulation process in human neutrophils, including cell surface expression of granule markers, liberation of proteins into the external milieu, and preservation of active enzymatic activity.

METHODS

2.1. Nanoparticles

The nanoparticles used in this study were obtained from Vivenano (Toronto, ONT): 1) Titanium Dioxide (TiO₂) anatase crystals, in aqueous suspension stabilised by polyacrylate sodium (<10 nm particle size, 90%); metal content: 97% TiO₂ determined by inductively coupled plasma (ICP); 2) water-dispersible and non-aggregating; water-dispersible and non-aggregating cerium oxide (CeO₂) (crystalline CeO₂) in aqueous suspension; carboxy-functionalized and stabilized by sodium polyacrylate, <10 nm particle size, 90%) with metal content of 90% Ce/10% Pr as determined by (ICP); and 3) water-dispersible and non-aggregating zinc oxide (crystalline ZnO) carboxy-functionalized in aqueous suspension stabilized by sodium polyacrylate (<20 nm particle size, 90%) with metal content of 90% Zn as determined by (ICP).

2.2. Reagents and antibodies.

Mouse monoclonal antibodies (mAb) against CD35 (clone E11) and CD63 (clone H5C6) were purchased from BD PharMingen (San Diego, CA, USA). The mouse anti-human CD66b mAb (clone 80H3) was obtained from AbD Serotec (Raleigh, NC, USA). Rabbit polyclonal antibody against MMP-9 and mouse mAb against MPO (clone 2C7) were obtained from Abcam (Cambridge, MA, USA). Formyl-methionine-leucine-phenylalanine (fMLP) and goat anti human albumin were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). FITC-conjugated goat-anti-mouse secondary antibody were from Cedarlane (Burlington, ONT). If not specified, all other reagents were obtained from Sigma-Aldrich. In this study, the NPs were used at a concentration of 100 µg/ml, based on preliminary experiments and because we have previously demonstrated that, at this concentration, TiO₂ is a good activator of human neutrophils inducing, cell shape changes, MAP kinases, cytokine production and delaying apoptosis (Goncalves *et al.*, 2010).

2.3. Size distribution and zeta potential measurements.

The size distribution and surface charge (zeta potential) of TiO₂, CeO₂ and ZnO NPs were determined by dynamic light scattering using a Malvern Zetasizer Nano-ZS (model ZEN3600 from Malvern Instruments Inc. (Westborough, MA). Measurements were performed with NPs in

suspension in RPMI-1640, the medium in which NPs were suspended and incubated with neutrophils throughout this study.

2.4. Neutrophils isolation and incubation.

Neutrophils were isolated from venous blood of healthy volunteers by dextran sedimentation, followed by centrifugation over Ficoll-Hypaque (Pharmacia Biotech, Inc., Quebec, Canada) as described previously (Ennaciri *et al.*, 2009, Goncalves *et al.*, 2010). To prevent as much as possible cell activation during isolation, all buffers and reagents were used at room temperature limiting stress due to a change in temperature. Blood donations were obtained from informed and consenting individuals according to institutionally approved procedures. Cell viability was monitored by trypan blue exclusion and found to be consistently $\geq 98\%$ and cell purity ($\geq 98\%$) was verified by cytology from cytocentrifuged preparations colored by Hema 3 stain set (Fisher Scientific). Neutrophils were then resuspended at 10×10^6 cells/mL in RPMI-1640 for all experiments.

2.5. Actin polymerisation.

Actin polymerization was used as a marker of neutrophil activation (Carulli, 1996) in response to NPs. Neutrophils were incubated for short periods of time (5, 15 or 30 min.) at 37°C with buffer or with 100 $\mu\text{g/ml}$ TiO_2 , CeO_2 or ZnO in a final volume of 100 μL . Synthetic peptide N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) (a classical neutrophil activator) at the dose of 10^{-8}M was used as positive control (de Liz *et al.*, 2012). After incubation, digitonin and paraformaldehyde were used for permeabilization and cell fixation, respectively. Cells were washed twice by centrifugation and incubated with phalloidin-FITC (binds to filamentous of actin) for 20 min at 4°C (light protected) prior to FACS analysis. Flow cytometric analysis (10,000 events) was performed for measuring actin polymerization using a FACScan (BD Biosciences, Sao Jose, CA, USA).

2.6 Cell surface expression of CD35, CD63 and CD66b

Cell surface expression of CD63, CD66b and CD35 was monitored for assessing degranulation, an actin-dependent process (Eitzen *et al.*, 2011a). These molecules are, in the same order, specific markers of azurophil, specific/gelatinase and secretory granules and their level of expression was monitored by flow cytometry as published previously (J. C. Simard *et al.*, 2010b). Briefly, neutrophils (10×10^6 cells/ml) were pretreated with buffer, fMLP ($1 \mu\text{M}$) or a given NP ($100 \mu\text{g/ml}$) for 30 min or, for different periods of time for subsequent kinetic experiments. Following stimulation, nonspecific binding of the antibodies was prevented by incubating the cells with PBS + 20% heat-inactivated FBS for 30 min on ice. After several washes with PBS, primary antibodies or an IgG₁ isotype control antibody were added at a concentration of $1 \mu\text{g/ml}$ in PBS for 30 min on ice. Cells were then washed twice in PBS and incubated with $1 \mu\text{g/ml}$ FITC-conjugated goat anti-mouse IgG antibody for 30 min on ice. After three washes, cells were resuspended in PBS, and analysis was performed with a FACScan (BD Biosciences). Results are expressed as G mean of fluorescence intensity of the cell population.

2.7. Western blot analysis

Neutrophils (10×10^6 cells/mL in RPMI-1640) were incubated with buffer, fMLP (10^{-6}M) or $100 \mu\text{g/ml}$ TiO₂, CeO₂ or ZnO, for 0-60 min at 37°C. For detection of MMP-9, MPO, and albumin, cells were stimulated for 30 min with NPs at the concentration mentioned above. Cells were then centrifuged at 13,000 RPM for 10 min at 4°C. Pellets were discarded, and supernatants equivalent to 1×10^6 cells for detection of MMP-9 and albumin protein released from granules, or 20×10^6 cells for MPO, were separated on a 7.5% SDS-PAGE gel before being transferred to nitrocellulose membranes, which were blocked for 1h at room temperature in TBS-Tween containing 5% nonfat dry milk (Carnation, Don Mills, Ontario, Canada). After washing, a dilution of 1:1000 was used for the anti-MMP-9/gelatinase B and anti-albumin antibodies and 1:500 for the anti-MPO antibody in TBS-Tween 0.15%. The membranes were kept overnight at 4°C, then washed with TBS-Tween, and incubated for 1h at room temperature with a goat anti-rabbit IgG HRP secondary antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA), diluted 1:20,000 in TBS-Tween + 5% nonfat dry milk, or a goat anti-mouse IgG HRP secondary

antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories), diluted 1:20,000 in TBS-Tween + 5% nonfat dry milk, followed by several washes. Protein expression was determined using an enhanced chemiluminescence Western blot analysis detection system (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) and quantified using a Fluor-S multi-imager (Bio-Rad) and the MultiAnalyst version 1.1 program (Bio-Rad).

2.8. Zymography assay

Neutrophils were stimulated as described above and then centrifuged at 13,000 rpm for 10 min at 4°C, and the pellets were discarded. The supernatants (30 µl corresponding to 50,000 cells) were mixed with 10 µl of a nonreducing buffer (40% glycerol, Tris-HCl 1 M, pH 6.8, SDS 8%) and separated on 10% acrylamide gels containing 0.2% gelatin. Gels were washed twice for 30 min with 2.5% Triton X-100 and incubated overnight in digestion buffer (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM). The gels were then stained with Coomassie blue 0.1% and destained.

2.9. Statistical analysis.

The data are reported as mean ± SEM and were analyzed by one-way ANOVA (repeated measures ANOVA) and differences of each group vs control group were assessed by the Dunnett post-test using GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Statistical significance was established at p<0.05.

RESULTS

3.1. Characterization of NPs used in this study. Since RPMI-1640 was the medium used for all experiments throughout this study, the size and zeta potential of TiO₂, CeO₂ and ZnO NPs were measured in this medium. As illustrated in **Table 1**, the DLS analysis revealed a bimodal size distribution for TiO₂ and CeO₂ but large aggregates was observed in a proportion of $14.7 \pm 11\%$ in CeO₂ suspension. For ZnO, a tri-modal size distribution was observed without apparent large aggregates. The zeta potential was -12.7 ± 2.1 , -4.9 ± 0.7 and -2.7 ± 0.2 mV for TiO₂, CeO₂ and ZnO, respectively.

3.2. Actin polymerization in NP-induced neutrophils. As illustrated in **Fig. 1**, TiO₂, CeO₂ and ZnO induced actin polymerization, indicating that these NPs act as neutrophil activators. As expected, fMLP, used here as a positive control, also induced actin polymerization.

3.3. Cell surface expression of CD35, CD63 and CD66b in NP-induced human neutrophils. From the above results, and since actin is known to be involved in the degranulation process (Eitzen *et al.*, 2011a), we next decided to investigate the ability of NPs to induce neutrophil degranulation. We routinely determine cell surface expression of CD35, CD63 and CD66b in human neutrophils after 30 min of activation with different agents, including myeloid-related proteins and the anticancer drug arsenic trioxide (Binet *et al.*, 2008, J. C. Simard *et al.*, 2010b). However, the ability of NPs to alter cell surface expression of these three markers has never been studied. As illustrated in **Fig. 2**, CeO₂ significantly decreased the basal cell surface expression of CD35 from 59.3 ± 10.2 (mean \pm SEM, n=7) to 35.5 ± 2.1 (**Fig. 2C**). The other NPs also slightly decreased the basal level expression of CD35, but the level of change was not significant. CeO₂, ZnO and TiO₂ did not significantly alter the cell surface expression of CD63 (**Fig. 2A**). Only TiO₂ was found to significantly increase CD66b cell surface expression (**Fig. 2B**). As expected, fMLP increased both CD35 and CD66b but not CD63 expression (J. C. Simard *et al.*, 2010b).

3.4. NPs induce the release of proteins in the external milieu. The above results suggest that NPs, especially TiO₂, can induce degranulation in neutrophils. Therefore, we next decided to study whether or not proteins of different types of granules could be released into the external milieu in response to NPs. As illustrated **Fig. 3A**, the three different NPs significantly induced the release of MPO, an enzyme known to be localized in azurophil (primary) granules. Of these, ZnO was the least potent, with a value of MPO release of 43.4 ± 14.2 (mean ± SEM, n=5) IDV (integrated density value) vs 58.6 ± 14.3 and 69.4 ± 11.2 for CeO₂ and TiO₂, respectively. Although the effect of ZnO was weaker than that of CeO₂ and TiO₂, it is important to note that the effect of this NP is still important relative to the positive control fMLP (26.8 ± 5.8). In fact, fMLP can be used as a positive control not only for the release of MPO, but also for the release of MMP-9 (CD66b) and albumin (J. C. Simard *et al.*, 2010b). CeO₂ and TiO₂ also increased the release of MMP-9 (44.6 ± 3.9 and 46.9 ± 7.3, respectively, n=8) than ZnO (23.4 ± 6.2) (**Fig. 3B**). The release of albumin was not increased by ZnO (26.0 ± 5, n=8), when compared to the basal level of untreated cells (17.4 ± 2.1) (**Fig. 3C**). However, both CeO₂ and TiO₂ increased the level of albumin expression released into the supernatants (39.2 ± 4.8 and 38.4 ± 9.0, respectively).

3.5. Effect of NPs on the enzymatic activity of MMP-9 released in the milieu. The above results indicated that degranulation of human neutrophils occurs following activation with NPs. The next step was to determine if the supernatants of NP-induced neutrophils possessed any enzymatic activity. To verify that, we decided to perform a zymography assay, to allow the visualization of MMP-9 (CD66b or gelatinase) enzymatic activity. As illustrated in **Fig. 4A**, the supernatants of neutrophils activated with CeO₂ and TiO₂ possess strong gelatinolytic activity, as evidenced by the apparition of clear zones (a, b and c in figure) corresponding to degradation of gelatin incorporated in the gel. **Fig. 4B** illustrates the densitometry analysis performed for each clear regions obtained in the different experiments (n=5).

DISCUSSION

The activity of NPs towards modulation of human neutrophil degranulation have been investigated here and, to the best of our knowledge, this is the first study to address this issue. Herein, rather than characterizing the NPs in pure water or in diverse diluents or vehicles other than that one used during experiments, we characterized the metal oxide NPs (TiO₂, CeO₂ and ZnO) in RPMI-1640 alone, at a concentration of 100 µg/ml, using experimental conditions identical to those used to evaluate cell surface expression of granule markers, liberation of granules proteins into the external milieu, and enzymatic activity of MMP-9. The results of a recent study revealed that the stability of metal oxide TiO₂, ZnO, and SiO₂ NP changed under different aqueous conditions (Tso *et al.*, 2010). Unfortunately, the authors did not investigate CeO₂ in their study (Tso *et al.*, 2010). The average sizes of TiO₂, ZnO, and SiO₂ NPs in pure water were much larger (200-17,000 nm) than the sizes of the dry forms reported by the manufacturers, and thus can no longer be considered as nanoparticles. Aggregates form rapidly in aqueous solutions resulting in the formation of flocs. Interestingly, the authors reported that DLS analyses demonstrate that the particle sizes of these NPs in solution generally increase with their mass concentration within 10 min. At the same concentration of 100 µg/ml used here, the authors reported an average particle size of 11,400 nm for ZnO and 2,030 nm for TiO₂ and similar values for SiO₂. In our hands, although the starting materials were not from a dry powder but rather from a commercially available aqueous stock solution, our NPs were always at the nanoscale size (<100 nm) except for CeO₂ where large aggregates (>1000 nm) were observed for a proportion of about 15 ± 11% of the size distribution.

In humans, neutrophils represent the majority of total leukocytes present in the blood (up to 60-75%), and the lungs are the major sites containing the marginated pool of neutrophils in the body. Knowing that excessive neutrophil degranulation is a common feature of inflammatory disorders, including acute lung injury (Mikkel Faurischou *et al.*, 2003a, Lacy, 2006, Witko-Sarsat *et al.*, 2000), and that the lung is the major organ target used in studies following in vivo NP exposure, the present discovery that three NPs can alter all steps involved in the degranulation process in human neutrophils, attests to the importance of pursuing such studies to evaluate potential toxicity of NPs. This is further supported by the increasing use and incorporation of

NPs into consumer products, including food, and the recognized potential for NPs to reach the bloodstream not only through inhalation, but also via other routes, including the skin or the gastrointestinal tract (Korani *et al.*, 2011, Schleh *et al.*, 2012). It is important to note that, unlike human, the proportion of neutrophils in mouse peripheral blood is only about 15-20% of total leukocytes, indicating that direct translation of data from mouse to human has to be interpreted with caution. Although it is impossible to recreate the complex inflammatory process *in vitro*, the above observations support the use of human neutrophils whenever possible for nanotoxicology studies aimed at evaluating inflammatory activity of NPs. Whether NPs other than the three metal oxide, TiO₂, CeO₂ and ZnO (in large aggregates or not) used in the present study can promote degranulation in human neutrophils remains to be determined.

Here, we have demonstrated that TiO₂, CeO₂ and ZnO NPs induced degranulation and this was demonstrated in parallel with the fMLP, a classical neutrophil agonist used by several authors, including us (Binet *et al.*, 2006, J. C. Simard *et al.*, 2010b), as a positive control and/or to study the neutrophil degranulation process in both rodent and human neutrophils (L. C. Chang *et al.*, 2011, Ham *et al.*, 2012, Sato *et al.*, 2013). These results indicate that NPs possess pro-inflammatory effects. However, preliminary results suggest that other nanoparticles, SiO₂, do not induce enzymatic activity in neutrophil supernatants measured by zymography (*unpublished observation*). Although kinetic, as well as concentration-dependent, experiments need to be performed before reaching any conclusion, this suggests that some NPs may not activate degranulation in human neutrophils.

Overall, our observations suggest that three different, but related metal oxide NPs act differentially on all steps involved in the degranulation process in human neutrophils, including cell surface expression of specific granule markers, release of proteins into the external milieu, and increased enzymatic activity, at least for MMP-9 (CD66b). This represents a new mechanism of action for NPs (summarized in Fig. 5) related to inflammation. Of note, all NPs do not exhibit the same mode of action. For example, while none of the NPs altered the basal level of cell surface expression of CD63, TiO₂ significantly increased CD66b expression and CeO₂ significantly decreased the level of CD35 expression. Although it is difficult presently to understand why, this may be due to the fact that CD35 molecules are simply released more rapidly into the external milieu, resulting in a decrease in cell surface expression in that case. Nevertheless, this indicates that the mode of action of NPs is complex and variable.

Our data indicates the presence of enzymatic activity in the supernatants of neutrophils treated with NPs, as evidenced by the digestion of gelatin visualized by zymography, is a suitable way for analysing the role of NPs on the degranulation process. Effectively, the numerous enzymes present in the granules of neutrophils have to be released from the different granules via exocytosis (fusion of granules with cytoplasmic membrane) and then released into the external milieu. For the three NPs tested here, the ability to increase the gelatin digestion is as follows: $\text{TiO}_2 > \text{CeO}_2 > \text{ZnO} > \text{Ctrl}$.

In conclusion, because the NPs can differentially modulate the degranulation process, we believe that investigating the degranulation process in human neutrophils in response to NPs is an important step in better understanding their mode of action. The results of the present study also highlight the necessity of performing experiments with other NPs on the human neutrophil degranulation process for evaluating potential toxicity to ensure not only consumer safety, but also the security of the handling process during all steps of NP production.

ACKNOWLEDGEMENTS

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.

TABLES

Table 1. Characterisation of nanoparticles used in this study.

Characterization	TiO ₂	CeO ₂	ZnO
Appearance	Transparent colorless	Transparent orange	Transparent colorless
Aqueous suspension	Yes	Yes	Yes
Water-dispersible and non-aggregating	Yes	Yes	Yes
Primary particle size reported by the manufacturer (nm)	1-10 (90%)	1-10 (90%)	1-10 (90%)
Particle size by DLS (nm) ^a	87.3 ± 18.6 (97.3 ± 4.7%) ^b 4.5 ± 7.8 (2.7 ± 4.7%)	61.5 ± 4.4 (87.3 ± 11%) 1749 ± 303 ^c (14.7 ± 11%)	10.3 ± 1.1 (52.1 ± 4.7%) 56.8 ± 19.9 (28.9 ± 4.5%) 1.01 ± 0.14 (17.9 ± 2.5%)
Zeta potential (mV) ^a	-12.7 ± 2.1	-4.9 ± 0.7	-2.7 ± 0.2

^a Results are means ± SD (n = 3) for each NP at 100 µg/ml in RPMI.
^b Number in parentheses are the proportion of NPs with the indicated size.
^c Note the presence of large aggregates in CeO₂ preparation.

FIGURES

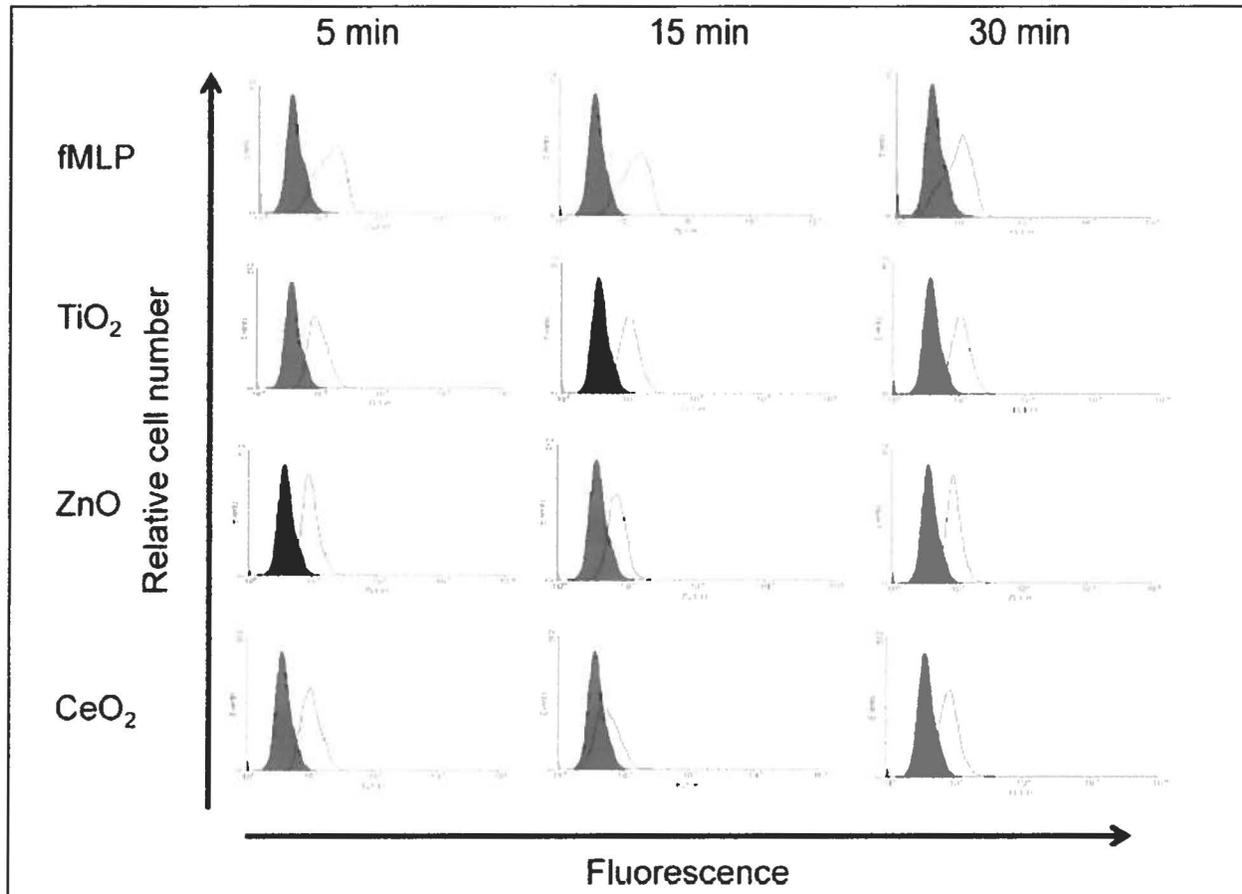


Figure 1. *TiO₂, CeO₂ and ZnO induce actin filament polymerization in human neutrophils.* Freshly isolated human neutrophils were isolated and incubated with the buffer (Ctrl, dark curve), the positive control fMLP (10^{-8} M) or with 100 μ g/ml of TiO₂, CeO₂ or ZnO for 5, 15 and 30 min. Actin polymerization was evaluated by monitoring FITC-phalloidin expression by flow cytometry. Results are from one representative experiment out of at least three.

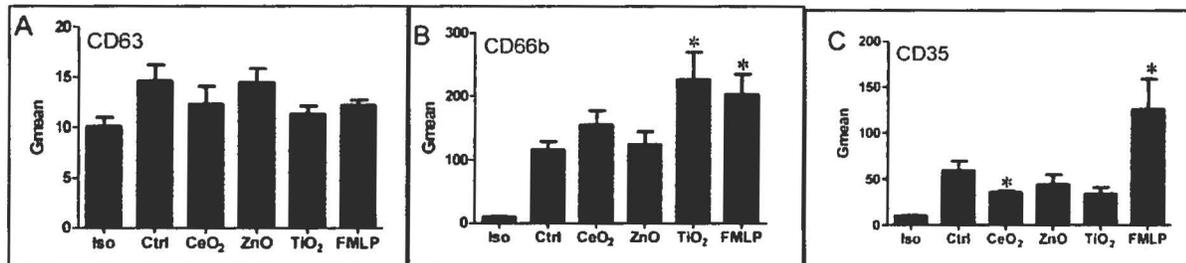


Figure 2. Cell surface expression of CD63, CD66b and CD35 in TiO₂-, CeO₂- or ZnO-induced human neutrophils. Freshly isolated human neutrophils were isolated and incubated with the buffer (Ctrl), fMLP (10⁻⁸M) or with 100 µg/ml of TiO₂, CeO₂ or ZnO for 30 min and cell surface expression of the three granule markers CD63 (A), CD66b (B) and CD35 (C) was assessed by flow cytometry as detailed in Methods. Iso, isotypic antibody used as technical control. Results are expressed as Gmean of fluorescence (Mean ± SEM, n=7). *, p<0.05 vs Ctrl.

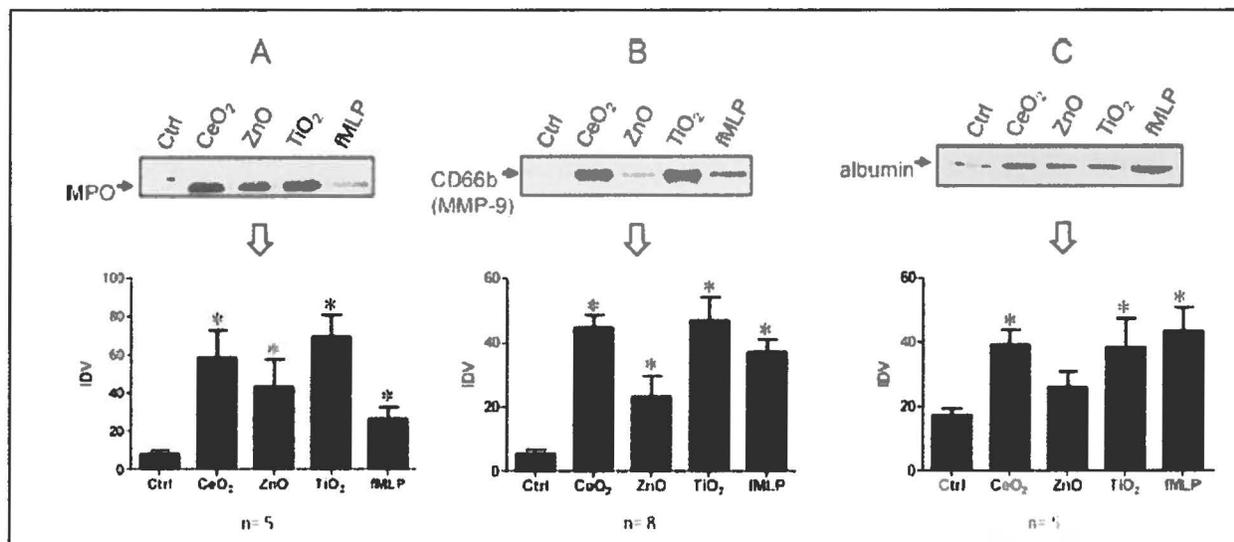


Figure 3. Liberation of myeloperoxidase, CD66b (MMP-9) and albumin in TiO₂, CeO₂- or ZnO-induced human neutrophils. Freshly isolated human neutrophils were isolated and incubated with the buffer (Ctrl), fMLP (10⁻⁸M) or with 100 µg/ml of TiO₂, CeO₂ or ZnO for 30 min and the presence of myeloperoxidase (MPO), CD66b or matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) and albumin (A, B and C, respectively, upper part of the figure) was detected by western blot experiments as described in Methods. Densitometry analysis (bottom part of the figure) was performed and results (Means ± SEM, n≥5) are expressed as integrated density value (IDV). *, p<0.05 vs Ctrl.

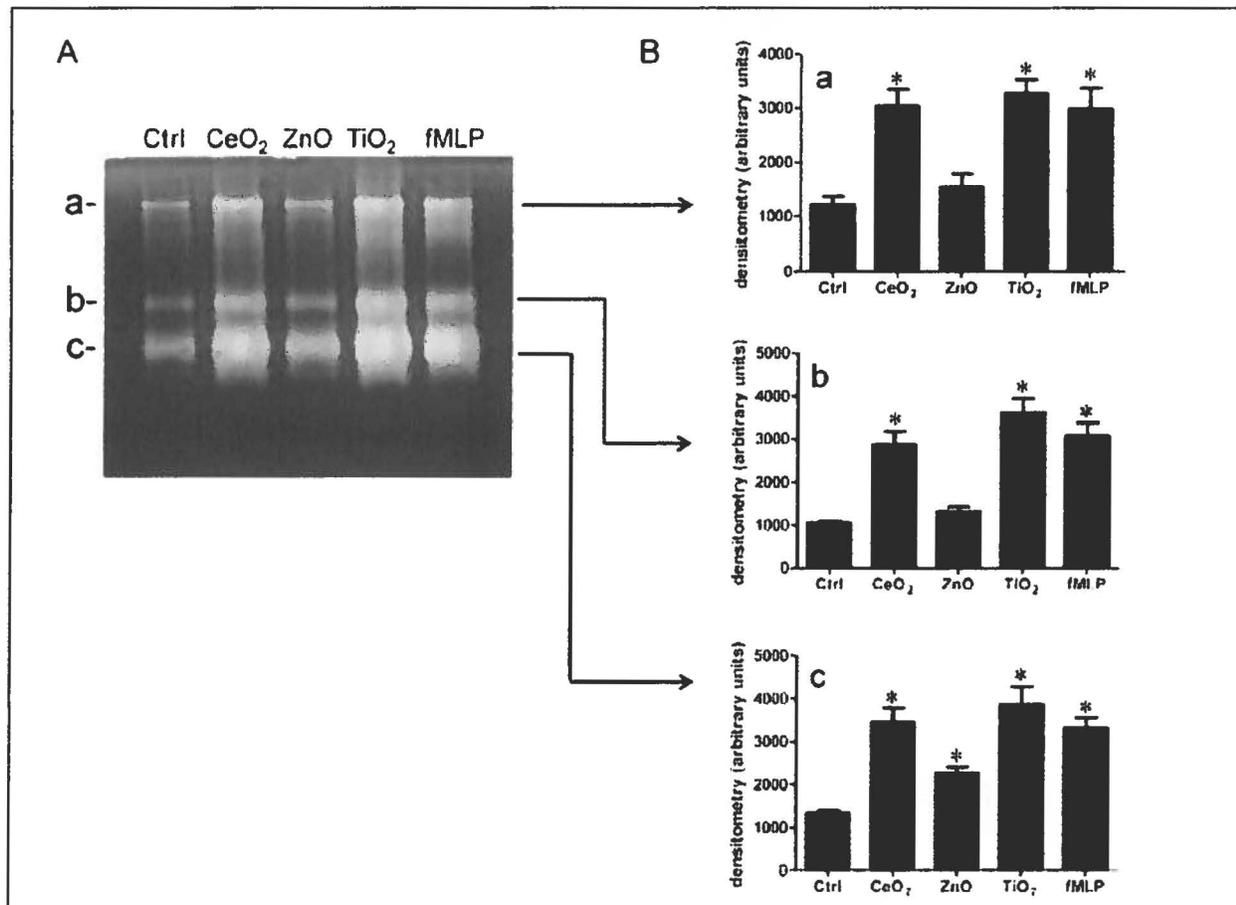


Figure 4. *TiO₂, CeO₂ and ZnO NPs increase the gelatinolytic activity in human neutrophils.* Freshly isolated human neutrophils were isolated and incubated with the buffer (Ctrl), fMLP (10⁻⁸M) or with 100 µg/ml of TiO₂, CeO₂ or ZnO for 30 min and the gelatinolytic activity of MMP-9 was assessed by zymography as described in Methods. A, typical results where the enzymatic activity is observed by the appearance of clear bands (a, b and c). B, densitometry analysis of the corresponding bands expressed as arbitrary units (means ± SEM, n=5). *, p<0.05 vs Ctrl.

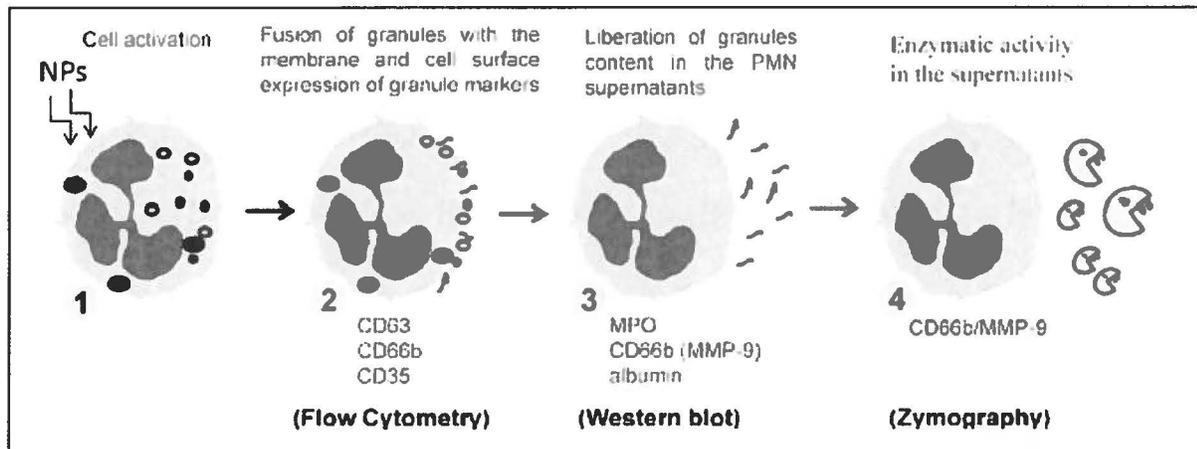


Figure 5. A schematic diagram illustrating how nanoparticles can interfere during the degranulation process in human neutrophils. After cell activation by NPs (1), granules can fuse with the cytoplasmic membrane, leading to an increase or decrease in cell surface expression of diverse granule markers when compared to untreated cells (2). This could also lead to the release of some proteins into the external milieu (3) preserving their enzymatic activity (4).

SECTION 3 : Discussion et conclusion

DISCUSSION ET CONCLUSION

Dans la présente étude, les neutrophiles ont été choisis comme modèle *in vitro* pour évaluer l'effet d'une exposition aux NPs sachant qu'ils sont la première ligne de défense du système immunitaire contre les particules étrangères. Chez l'humain, le neutrophile représente la majorité des leucocytes totaux présents dans le sang avec une abondance de 60 à 75 %. Lors d'une réponse inflammatoire aiguë, le neutrophile est la première cellule du système immunitaire à se rendre au site inflammatoire dans le but d'éliminer les pathogènes microbiens ou de supprimer les débris cellulaires (Phillipson *et al.*, 2011). L'interaction avec les particules infectieuses va induire un programme de défense tel que la phagocytose de ces particules (Nordenfelt *et al.*, 2011), la production d'agents azotés et oxygénés par flambée oxydative (Leto *et al.*, 2006) ainsi que la libération d'enzymes par dégranulation résultant à la mort et la digestion du micro-organisme. Ainsi, leur activation par la présence de signaux inflammatoires peut prolonger leur demi-vie de plusieurs jours. Une demi-vie prolongée permettrait aux neutrophiles d'effectuer un plus grand nombre d'activités complexes dans un tissu, tel que contribuer à la résolution de l'inflammation ou de former une réponse adaptative spécifique. Par contre, leur persistance dans le tissu peut mener à des lésions tissulaires (Bratton *et al.*, 2011). Alors, il devient indispensable que leur survie et leurs fonctions soient hautement régulées.

De nos jours, les NPs ou aussi communément appelé particules ultrafines (UFPs) sont reconnues comme étant les particules les plus polluantes des régions industrielles et urbaines. Lorsque les NPs entrent dans la circulation sanguine, ils rencontrent un réseau complexe de cellules immunitaires et de protéines. La reconnaissance des NPs comme étant des molécules exogènes par les cellules immunitaires peut déclencher une multitude de réponses immunitaires, le but de l'étude étant d'identifier les différents granules activés au contact de la cellule avec les NPs, soit le processus de dégranulation. Il est important de souligner qu'une dégranulation excessive du neutrophile peut aboutir à des maladies inflammatoires comme des lésions pulmonaires aiguës, des épisodes d'asphyxie reliées à l'asthme (M. Faurchou *et al.*, 2003b) (Lacy, 2006) ou peut conduire à des maladies auto-immunes telles que l'arthrite rhumatoïde (Larbre *et al.*, 1994) et l'obésité lié au diabète (Talukdar *et al.*, 2012). La présente étude qui démontre que les trois NPs altèrent les différentes étapes du processus de dégranulation chez le neutrophile humain témoigne de l'importance à poursuivre les études

pour évaluer la toxicité potentielle des NPs sur toutes les fonctions du neutrophile. Cette affirmation est supportée par l'augmentation accrue des NPs dans une grande diversité de produits incluant la nourriture, les médicaments, les produits commerciaux et de soins personnels. En raison de leurs petites tailles ($\leq 100\text{nm}$), elles peuvent se déposer plus loin dans les poumons (Korani *et al.*, 2011) et atteindre la circulation sanguine, résultant à une distribution systémique atteignant plusieurs régions du corps et différents tissus incluant, entre autres, le système immunitaire et créer de l'inflammation. L'inflammation ne peut pas être traduite par un modèle *in vitro* parce qu'elle dépend d'un système vasculaire intact, ainsi que de l'assortiment d'interactions cellulaires. Malgré le fait que plusieurs études (Schleh *et al.*, 2012) aient démontré le recrutement des neutrophiles suite à l'instillation des NPs *in vivo*, peu d'études ont documenté l'activation directe des neutrophiles en présence de NPs *in vitro*. Il est important de noter que la proportion de neutrophiles dans la circulation périphérique des rongeurs est aussi peu que 15 à 20 % et donc il devient difficile d'extrapoler les effets chez l'humain à partir des tests obtenus chez la souris ou le rat. En plus, la plupart des études *in vitro* sur les NPs dérivent d'études faites sur des lignées cellulaires et ne peuvent donc pas être traduites pour des cellules humaines primaires. Les résultats obtenus dans cette étude visent à évaluer l'activité pro-inflammatoire des NPs en présence des neutrophiles humains.

Dans ce présent mémoire, le CeO_2 , ZnO et TiO_2 sont les trois NPs d'oxydes métalliques évalués pour déterminer leurs effets sur la fonction de dégranulation du neutrophile. Nous avons démontré que ces NPs induisaient la dégranulation du neutrophile, et ceci a été établi en parallèle avec le fMLP, un agoniste classique du neutrophile utilisé en tant que témoin positif spécialement pour la dégranulation (Binet *et al.*, 2006) (Jean-Christophe Simard *et al.*, 2010a). Au lieu de caractériser les nanoparticules dans une solution d'eau ou de diluant spécifique, les oxydes métalliques ont été introduits dans une solution de RPMI-1640 à une concentration de $100 \mu\text{g/ml}$. Le DLS (Diffusion dynamique de la lumière) a été utilisée pour analyser la distribution de taille et de stabilité colloïdale (potentiel zêta) des particules dans la solution. Bien que nos NPs ne proviennent pas d'une solution en poudre sèche, mais plutôt d'une solution aqueuse dans laquelle elles étaient dissoutes, leurs tailles demeuraient en dessous de 100nm et illustrent des distributions bimodales (CeO_2 et TiO_2) et trimodales (ZnO), excepté pour la NP de CeO_2 qui a atteint une taille plus grande que $1,000 \text{nm}$ pour une de ses deux distributions ($15 \pm 11 \%$). L'instabilité colloïdale des NPs de TiO_2 (-12.7mV) et CeO_2 (-4.9mV) dans la solution pourrait être la cause de leur agglomération (Cho *et al.*, 2013).

La modulation de la dégranulation chez le neutrophile en présence de NPs a été testée pour la première fois dans cette étude. Ces résultats représentent un nouveau mécanisme d'action des NPs sur une fonction leucocytaire reliée à l'inflammation. Des études antérieures effectuées dans notre laboratoire ont investigué, entre autres, les changements morphologiques chez les neutrophiles en présence des NPs de TiO₂ et ZnO, indiquant que ces deux NPs étaient capables d'interagir avec le neutrophile *in vitro* (Goncalves *et al.*, 2010, Goncalves *et al.*, 2014). De plus, le CeO₂ n'avait pas été testé. Puisque la dégranulation est un processus requérant un réarrangement du cytosquelette pour la mobilisation des granules (Eitzen *et al.*, 2011b), il fut nécessaire d'évaluer l'effet des trois NPs sur la polymérisation de l'actine. Les résultats ont permis de constater une polymérisation de l'actine suite à une stimulation du neutrophile avec les NPs de CeO₂, ZnO et TiO₂. L'effet s'est maintenu dans le temps jusqu'à 30 minutes indiquant que les trois oxydes métalliques agissaient comme activateur du neutrophile. Étant donné que nous étions en mesure de dire que les NPs induisaient la polymérisation de l'actine impliquée dans le processus de la dégranulation, nous avons ensuite décidé d'investiguer la capacité des NPs à induire la fonction de dégranulation chez le neutrophile par l'augmentation de l'expression des récepteurs de surface spécifique aux granules, la libération des protéines dans le milieu externe, ainsi que par l'activité enzymatique de la protéinase MMP-9.

En premier lieu, nous avons entrepris de vérifier par cytométrie en flux si les NPs induisaient l'expression des marqueurs des différents granules et vésicules (CD35, CD63 et CD66b) à la surface de la cellule, un test déterminant et utilisé pour d'autres études sur la dégranulation avec des agents tels le trioxyde d'arsenic (Binet *et al.*, 2006) ainsi que la protéine S1009 (Jean-Christophe Simard *et al.*, 2010a). Cependant aucune étude n'a été faite avec des agents, tels que des NPs et nous avons découvert que les NPs ne disposaient pas toutes des mêmes mécanismes d'actions. En effet, bien qu'aucune des NPs n'ait augmenté l'expression de CD63, TiO₂ a augmenté de manière significative l'expression de CD66b alors que CeO₂ a diminué significativement l'expression de CD35, tandis que ZnO diminuait l'expression de CD35 et augmentait celle de CD66b, mais sans toutefois être significatif. Il faut noter qu'en raison d'une densité de protéines VAMP-2, les vésicules et granules sont libérés de manière séquentielle lors de l'activation du neutrophile, libérant le vésicule sécrétoire en premier, ensuite le granule spécifique et finalement les granules azurophiles et gélatinasiques. Ceci pourrait expliquer la diminution ou l'augmentation de l'expression des marqueurs. De ce fait, le vésicule sécrétoire serait relargué très rapidement dans le milieu externe suite à la stimulation, résultant en une diminution de l'expression de CD35 à la surface de la cellule à 30min, alors que le granule

gélatinase serait libéré beaucoup plus tardivement, illustré par la forte expression de son récepteur CD66b. Ces résultats indiquent que le mode d'action des NPs est complexe et variable. Avec la vérification d'un test cinétique regroupant des temps très rapprochés, il aurait été possible de déterminer la dégranulation des différents granules en présence des NPs en fonction du temps. De plus, l'expression de CD66b médiée par TiO₂ était plus forte que celui du témoin positif (fMLP), suggérant que cette NP pourrait dorénavant être utilisée comme agent d'activation du granule gélatinase. Comme prévu, l'expression du marqueur granulaire azurophile (CD63) n'a pas été modifiée ni par le fMLP (Jean-Christophe Simard *et al.*, 2010a), ni par les NPs.

Suite à la fusion des granules avec la membrane plasmique, non seulement le neutrophile acquiert de nouveaux récepteurs importants dans la reconnaissance des pathogènes, mais les protéines contenues dans les granules fusionnées vont être libérées à l'extérieur de la cellule et pourront catalyser les particules exogènes environnantes. Évidemment, pour identifier les enzymes présents dans le milieu externe et libérés par les différents granules, ces derniers doivent être activés et doivent fusionner avec la membrane plasmique de la cellule, un processus d'exocytose. Dans cette optique, nous avons décidé d'analyser la présence de protéines spécifiques aux granules par immunobuvardage de type western. La myéloperoxydase (MPO) qui est un puissant oxydant localisé dans les granules azurophiles était fortement libérée chez les neutrophiles exposés aux trois NPs. Malgré le fait que le ZnO, parmi les NPs, avait la plus petite influence sur la libération de MPO, il a quand même eu plus d'effet que le témoin positif. Il faut noter que le fMLP peut être utilisé comme témoin positif pour la dégranulation des différents granules (Jean-Christophe Simard *et al.*, 2010a). La libération des protéases dégradantes de la matrice (MMP-9) localisées dans les granules gélatinases ont été grandement libérées en présence des NPs de CeO₂ et TiO₂, le ZnO ayant eu moins d'effet. Pour ce qui est de l'albumine, seuls TiO₂ et CeO₂ ont induit significativement sa présence dans le milieu externe, un taux qui était inférieur à celui du témoin positif, mais supérieur à celui des NPs de ZnO. Ainsi, en présence des trois NPs, nous avons démontré l'absence d'une modulation de l'expression des marqueurs spécifiques aux granules azurophiles (CD63) et vésicules sécrétoires (CD35). Cependant, sachant que les protéines spécifiques à ces granules et vésicules sont retrouvées à l'extérieur de la cellule, nous faisons face à des résultats contradictoires qui suggèrent que ces marqueurs pourraient avoir une activité extrêmement rapide. En effet, nous croyons qu'ils auraient pu être clivés par d'autres protéases dans le milieu environnant ou avoir subi une internalisation suivant leur fusion avec la membrane plasmique.

De plus, il est possible que la NP se soit liée sur le marqueur, créant donc une compétition pour l'AC fluorescent. Évaluer l'expression d'autres marqueurs spécifiques aux granules azurophiles et aux vésicules sécrétoires aurait permis de déterminer la modulation des NPs sur la dégranulation, ainsi qu'une meilleure analyse relative aux protéines libérées.

Pour vérifier si les MMP-9 conservaient leurs activités catalytiques suite à la dégranulation en présence des NPs, nous avons utilisé la technique de zymographie, qui illustre la dégradation de la gélatine par les gélatinases présentes dans le surnageant (Sapojnikova *et al.*, 2014). Nos données indiquent une forte activité enzymatique en présence des NPs de TiO₂ et CeO₂, soit une activité considérablement plus élevée que celle du ZnO. Dans l'ordre, le ZnO a eu la plus petite influence sur l'activité catalytique, suivie de celle du CeO₂ et du fMLP, le TiO₂ ayant eu le plus d'effet. L'ensemble des effets pro-inflammatoires des NPs de TiO₂ et CeO₂ sur les différentes étapes de la dégranulation obtenue *in vitro*, suggèrent que ces deux NPs sont des agonistes puissants de cette fonction de défense cruciale chez le neutrophile. Plus précisément, nos résultats montrent que les trois NPs, à des niveaux différents, induisent une augmentation de la libération de la MMP-9 active et suggère donc que les NPs pourraient contribuer aux effets de cette protéine sur la transmigration des neutrophiles.

En conclusion, les résultats obtenus dans le cadre de ce projet démontrent que les trois NPs possèdent des propriétés pro-inflammatoires, pouvant différemment moduler les étapes distinctes de la dégranulation. Ainsi, notre étude offre des données préliminaires sur l'altération des fonctions de dégranulation par les trois NPs sur les neutrophiles humains, qui pourraient mener à des déséquilibres du processus inflammatoire dans l'organisme. La variation dans les effets des différentes NPs sur la dégranulation du neutrophile décrite dans cette étude accentue le besoin d'évaluer le profil des mécanismes moléculaires et d'internalisation des différentes NPs sur un éventail de types cellulaires pertinents, suivi de tests *in vivo* pour apporter des prédictions concernant les effets indésirables relatifs aux NPs d'oxydes métalliques. Ce projet s'engage à établir un classement des NPs selon leurs potentiels inflammatoires, par le rassemblement des présents résultats et ceux d'autres études permettant un jour d'établir un classement des propriétés des NPs influençant leur potentiel inflammatoire. Enfin, cet outil permettra de répondre à l'exigence obligatoire d'assurer la sécurité des travailleurs, des patients, et du grand public.

Liste des références

- Abadie V, Badell E, Douillard P, Ensergueix D, Leenen PJ, Tanguy M, Fiette L, Saeland S, Gicquel B & Winter N (2005) Neutrophils rapidly migrate via lymphatics after Mycobacterium bovis BCG intradermal vaccination and shuttle live bacilli to the draining lymph nodes. *Blood* 106(5):1843-1850.
- Abrikossova N, Skoglund C, Ahren M, Bengtsson T & Uvdal K (2012) Effects of gadolinium oxide nanoparticles on the oxidative burst from human neutrophil granulocytes. *Nanotechnology* 23(27):0957-4484.
- Adams LK, Lyon DY & Alvarez PJ (2006) Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions. *Water Res.* 40(19):3527-3532.
- Afonso PV, McCann CP, Kapnick SM & Parent CA (2013) Discoidin domain receptor 2 regulates neutrophil chemotaxis in 3D collagen matrices. *Blood* 121(9):1644-1650.
- Akaike T & Maeda H (2000) Nitric oxide and virus infection. *Immunology* 101(3):300-308.
- Akgul C & Edwards SW (2003) Regulation of neutrophil apoptosis via death receptors. *Cell. Mol. Life Sci.* 60(11):2402-2408.
- Anderson DC, Schmalsteig FC, Finegold MJ, Hughes BJ, Rothlein R, Miller LJ, Kohl S, Tosi MF, Jacobs RL, Waldrop TC & et al. (1985) The severe and moderate phenotypes of heritable Mac-1, LFA-1 deficiency: their quantitative definition and relation to leukocyte dysfunction and clinical features. *J. Infect. Dis.* 152(4):668-689.
- Anderson SI, Hotchin NA & Nash GB (2000) Role of the cytoskeleton in rapid activation of CD11b/CD18 function and its subsequent downregulation in neutrophils. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 15):2737-2745.
- Anonyme (2010) Carbon black, titanium dioxide, and talc. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer* 93:1-413.
- Arora S, Rajwade JM & Paknikar KM (2012) Nanotoxicology and in vitro studies: the need of the hour. *Toxicol Appl Pharmacol* 258(2):151-165.
- Asati A, Santra S, Kaittanis C, Nath S & Perez JM (2009) Oxidase-like activity of polymer-coated cerium oxide nanoparticles. *Angew Chem Int Ed Engl* 48(13):2308-2312.
- Asati A, Santra S, Kaittanis C & Perez JM (2010) Surface-charge-dependent cell localization and cytotoxicity of cerium oxide nanoparticles. *ACS nano* 4(9):5321-5331.
- Ashtekar AR & Saha B (2003) Poly's plea: membership to the club of APCs. *Trends Immunol.* 24(9):485-490.
- Auffray C, Sieweke MH & Geissmann F (2009) Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 27:669-692.

- Auttachoat W, McLoughlin CE, White KL, Jr. & Smith MJ (2013) Route-dependent systemic and local immune effects following exposure to solutions prepared from titanium dioxide nanoparticles. *Journal of immunotoxicology*.
- Ba X, Chen C, Gao Y & Zeng X (2005) Signaling function of PSGL-1 in neutrophil: tyrosine-phosphorylation-dependent and c-Abl-involved alteration in the F-actin-based cytoskeleton. *J. Cell. Biochem.* 94(2):365-373.
- Bainton DF, Miller LJ, Kishimoto TK & Springer TA (1987) Leukocyte adhesion receptors are stored in peroxidase-negative granules of human neutrophils. *J. Exp. Med.* 166(6):1641-1653.
- Balazs M, Martin F, Zhou T & Kearney J (2002) Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses. *Immunity* 17(3):341-352.
- Barlow PG, Li Y, Wilkinson TS, Bowdish DM, Lau YE, Cosseau C, Haslett C, Simpson AJ, Hancock RE & Davidson DJ (2006) The human cationic host defense peptide LL-37 mediates contrasting effects on apoptotic pathways in different primary cells of the innate immune system. *J. Leukoc. Biol.* 80(3):509-520.
- Barrowman MM, Cockcroft S & Gomperts BD (1987) Differential control of azurophilic and specific granule exocytosis in Sendai-virus-permeabilized rabbit neutrophils. *J. Physiol.* 383:115-124.
- Bazzoni F, Cassatella MA, Laudanna C & Rossi F (1991) Phagocytosis of opsonized yeast induces tumor necrosis factor-alpha mRNA accumulation and protein release by human polymorphonuclear leukocytes. *J. Leukoc. Biol.* 50(3):223-228.
- Belaouaj A, Kim KS & Shapiro SD (2000) Degradation of outer membrane protein A in Escherichia coli killing by neutrophil elastase. *Science* 289(5482):1185-1188.
- Bian SW, Mudunkotuwa IA, Rupasinghe T & Grassian VH (2011) Aggregation and dissolution of 4 nm ZnO nanoparticles in aqueous environments: influence of pH, ionic strength, size, and adsorption of humic acid. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 27(10):6059-6068.
- 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 & Girard D (2008) Novel human neutrophil agonistic properties of arsenic trioxide: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase and/or c-jun NH2-terminal MAPK but not extracellular signal-regulated kinases-1/2. *J Leukoc Biol.*
- Blume KE, Soeroes S, Keppeler H, Stevanovic S, Kretschmer D, Rautenberg M, Wesselborg S & Lauber K (2012) Cleavage of annexin A1 by ADAM10 during secondary necrosis generates a monocytic "find-me" signal. *J. Immunol.* 188(1):135-145.
- Bokoch GM (1995) Regulation of the phagocyte respiratory burst by small GTP-binding proteins. *Trends Cell Biol.* 5(3):109-113.
- Bolen JB (1991) Signal transduction by the SRC family of tyrosine protein kinases in hemopoietic cells. *Cell Growth Differ.* 2(8):409-414.
- Borm PJ & Kreyling W (2004) Toxicological hazards of inhaled nanoparticles--potential implications for drug delivery. *Journal of nanoscience and nanotechnology* 4(5):521-531.
- Borm PJ, Robbins D, Haubold S, Kuhlbusch T, Fissan H, Donaldson K, Schins R, Stone V, Kreyling W, Lademann J, Krutmann J, Warheit D & Oberdorster E (2006) The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. *Particle and fibre toxicology* 3:11.
- Borregaard N (2010) Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 33(5):657-670.
- Borregaard N, Sorensen OE & Theilgaard-Monch K (2007) Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol.* 28(8):340-345.
- Borregaard N, Theilgaard-Monch K, Sorensen OE & Cowland JB (2001) Regulation of human neutrophil granule protein expression. *Curr Opin Hematol* 8(1):23-27.

- Boudaly S (2009) Activation of dendritic cells by polymorphonuclear neutrophils. *Front Biosci (Landmark Ed)* 14:1589-1595.
- Bratton DL & Henson PM (2011) Neutrophil clearance: when the party is over, clean-up begins. *Trends in immunology* 32(8):350-357.
- Brill A, Fuchs TA, Savchenko AS, Thomas GM, Martinod K, De Meyer SF, Bhandari AA & Wagner DD (2012) Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 10(1):136-144.
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y & Zychlinsky A (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303(5663):1532-1535.
- Brinkmann V & Zychlinsky A (2012) Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J. Cell Biol.* 198(5):773-783.
- Brogden KA (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* 3(3):238-250.
- Brown SB & Savill J (1999) Phagocytosis triggers macrophage release of Fas ligand and induces apoptosis of bystander leukocytes. *J. Immunol.* 162(1):480-485.
- Brunner TJ, Wick P, Manser P, Spohn P, Grass RN, Limbach LK, Bruinink A & Stark WJ (2006) In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility. *Environ. Sci. Technol.* 40(14):4374-4381.
- Burgoyne RD & Morgan A (2003) Secretory granule exocytosis. *Physiological reviews* 83(2):581-632.
- Cantley LC (2002) The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296(5573):1655-1657.
- Capoccia BJ, Gregory AD & Link DC (2008) Recruitment of the inflammatory subset of monocytes to sites of ischemia induces angiogenesis in a monocyte chemoattractant protein-1-dependent fashion. *J. Leukoc. Biol.* 84(3):760-768.
- Carman CV & Springer TA (2008) Trans-cellular migration: cell-cell contacts get intimate. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20(5):533-540.
- Caron E & Hall A (1998) Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science* 282(5394):1717-1721.
- Carulli G (1996) Applications of flow cytometry in the study of human neutrophil biology and pathology. *Hematopathol Mol Hematol* 10(1-2):39-61.
- Cassatella MA (1999) Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. *Adv. Immunol.* 73:369-509.
- Cauwe B, Martens E, Proost P & Opdenakker G (2009) Multidimensional degradomics identifies systemic autoantigens and intracellular matrix proteins as novel gelatinase B/MMP-9 substrates. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro* 1(5-6):404-426.
- Cederqvist K, Sorsa T, Tervahartiala T, Maisi P, Reunanen K, Lassus P & Andersson S (2001) Matrix metalloproteinases-2, -8, and -9 and TIMP-2 in tracheal aspirates from preterm infants with respiratory distress. *Pediatrics* 108(3):686-692.
- Chang LC, Huang TH, Chang CS, Tsai YR, Lin RH, Lee PW, Hsu MF, Huang LJ & Wang JP (2011) Signaling mechanisms of inhibition of phospholipase D activation by CHS-111 in formyl peptide-stimulated neutrophils. *Biochem Pharmacol* 81(2):269-278.
- Chang X, Fu Y, Zhang Y, Tang M & Wang B (2014) Effects of Th1 and Th2 cells balance in pulmonary injury induced by nano titanium dioxide. *Environmental toxicology and pharmacology* 37(1):275-283.
- Chen J, Patil S, Seal S & McGinnis JF (2006) Rare earth nanoparticles prevent retinal degeneration induced by intracellular peroxides. *Nature nanotechnology* 1(2):142-150.
- Cho WS, Duffin R, Bradley M, Megson IL, MacNee W, Lee JK, Jeong J & Donaldson K (2013) Predictive value of in vitro assays depends on the mechanism of toxicity of metal oxide nanoparticles. *Particle and fibre toxicology* 10(1):55.

- Cho WS, Duffin R, Poland CA, Duschl A, Oostingh GJ, Macnee W, Bradley M, Megson IL & Donaldson K (2012) Differential pro-inflammatory effects of metal oxide nanoparticles and their soluble ions in vitro and in vivo; zinc and copper nanoparticles, but not their ions, recruit eosinophils to the lungs. *Nanotoxicology* 6(1):22-35.
- Cho WS, Duffin R, Poland CA, Howie SE, MacNee W, Bradley M, Megson IL & Donaldson K (2010) Metal oxide nanoparticles induce unique inflammatory footprints in the lung: important implications for nanoparticle testing. *Environmental health perspectives* 118(12):1699-1706.
- Corma A, Atienzar P, Garcia H & Chane-Ching JY (2004) Hierarchically mesostructured doped CeO₂ with potential for solar-cell use. *Nature materials* 3(6):394-397.
- Cross A, Bakstad D, Allen JC, Thomas L, Moots RJ & Edwards SW (2005) Neutrophil gene expression in rheumatoid arthritis. *Pathophysiology* 12(3):191-202.
- Crowley MT, Costello PS, Fitzner-Attas CJ, Turner M, Meng F, Lowell C, Tybulewicz VL & DeFranco AL (1997) A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fcγ receptors on macrophages. *J Exp Med* 186(7):1027-1039.
- Cui YD, Inanami O, Yamamori T, Niwa K, Nagahata H & Kuwabara M (2000) FMLP-induced formation of F-actin in HL60 cells is dependent on PI3-K but not on intracellular Ca²⁺, PKC, ERK or p38 MAPK. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* 49(12):684-691.
- Cyrys J, Stolzel M, Heinrich J, Kreyling WG, Menzel N, Wittmaack K, Tuch T & Wichmann HE (2003) Elemental composition and sources of fine and ultrafine ambient particles in Erfurt, Germany. *Sci. Total Environ.* 305(1-3):143-156.
- Dancey JT, Deubelbeiss KA, Harker LA & Finch CA (1976) Neutrophil kinetics in man. *J. Clin. Invest.* 58(3):705-715.
- Darbousset R, Thomas GM, Mezouar S, Frere C, Bonier R, Mackman N, Renne T, Dignat-George F, Dubois C & Panicot-Dubois L (2012) Tissue factor-positive neutrophils bind to injured endothelial wall and initiate thrombus formation. *Blood* 120(10):2133-2143.
- Das M, Patil S, Bhargava N, Kang JF, Riedel LM, Seal S & Hickman JJ (2007) Auto-catalytic ceria nanoparticles offer neuroprotection to adult rat spinal cord neurons. *Biomaterials* 28(10):1918-1925.
- De Jong WH, Hagens WI, Krystek P, Burger MC, Sips AJ & Geertsma RE (2008) Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials* 29(12):1912-1919.
- de la Rosa G, Yang D, Tewary P, Varadhachary A & Oppenheim JJ (2008) Lactoferrin acts as an alarmin to promote the recruitment and activation of APCs and antigen-specific immune responses. *J. Immunol.* 180(10):6868-6876.
- de Liz R, Horst H, Pizzolatti MG, Frode TS & Girard D (2012) Activation of human neutrophils by the anti-inflammatory mediator *Esenbeckia leiocarpa* leads to atypical apoptosis. *Mediators Inflamm* 198382(10):8.
- Dekker LV, Leitges M, Altschuler G, Mistry N, McDermott A, Roes J & Segal AW (2000) Protein kinase C-beta contributes to NADPH oxidase activation in neutrophils. *Biochem. J.* 347 Pt 1:285-289.
- Demou E, Stark WJ & Hellweg S (2009) Particle emission and exposure during nanoparticle synthesis in research laboratories. *The Annals of occupational hygiene* 53(8):829-838.
- Deng ZJ, Mortimer G, Schiller T, Musumeci A, Martin D & Minchin RF (2009) Differential plasma protein binding to metal oxide nanoparticles. *Nanotechnology* 20(45):455101.
- Derouet M, Thomas L, Cross A, Moots RJ & Edwards SW (2004) Granulocyte macrophage colony-stimulating factor signaling and proteasome inhibition delay neutrophil apoptosis by increasing the stability of Mcl-1. *J. Biol. Chem.* 279(26):26915-26921.

- Detmers PA, Wright SD, Olsen E, Kimball B & Cohn ZA (1987) Aggregation of complement receptors on human neutrophils in the absence of ligand. *J. Cell Biol.* 105(3):1137-1145.
- Dobrovolskaia MA, Aggarwal P, Hall JB & McNeil SE (2008) Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution. *Molecular pharmaceutics* 5(4):487-495.
- Dobrovolskaia MA, Patri AK, Zheng J, Clogston JD, Ayub N, Aggarwal P, Neun BW, Hall JB & McNeil SE (2009) Interaction of colloidal gold nanoparticles with human blood: effects on particle size and analysis of plasma protein binding profiles. *Nanomedicine* 5(2):106-117.
- Dong CC, Yin XJ, Ma JY, Millecchia L, Barger MW, Roberts JR, Zhang XD, Antonini JM & Ma JK (2005) Exposure of brown Norway rats to diesel exhaust particles prior to ovalbumin (OVA) sensitization elicits IgE adjuvant activity but attenuates OVA-induced airway inflammation. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 88(1):150-160.
- Duan Y, Liu J, Ma L, Li N, Liu H, Wang J, Zheng L, Liu C, Wang X, Zhao X, Yan J, Wang S, Wang H, Zhang X & Hong F (2010) Toxicological characteristics of nanoparticulate anatase titanium dioxide in mice. *Biomaterials* 31(5):894-899.
- Duffin R, Tran L, Brown D, Stone V & Donaldson K (2007) Proinflammatory effects of low-toxicity and metal nanoparticles in vivo and in vitro: highlighting the role of particle surface area and surface reactivity. *Inhal. Toxicol.* 19(10):849-856.
- Dwivedi PD, Tripathi A, Ansari KM, Shanker R & Das M (2011) Impact of nanoparticles on the immune system. *Journal of biomedical nanotechnology* 7(1):193-194.
- Edwards SW & Hallett MB (1997) Seeing the wood for the trees: the forgotten role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Immunology today* 18(7):320-324.
- Ehrenberg MS, Friedman AE, Finkelstein JN, Oberdorster G & McGrath JL (2009) The influence of protein adsorption on nanoparticle association with cultured endothelial cells. *Biomaterials* 30(4):603-610.
- Eitzen G, Lo AN, Mitchell T, Kim JD, Chao DV & Lacy P (2011a) Proteomic analysis of secretagogue-stimulated neutrophils implicates a role for actin and actin-interacting proteins in Rac2-mediated granule exocytosis. *Proteome Sci* 9(70):1477-5956.
- Eitzen G, Lo AN, Mitchell T, Kim JD, Chao DV & Lacy P (2011b) Proteomic analysis of secretagogue-stimulated neutrophils implicates a role for actin and actin-interacting proteins in Rac2-mediated granule exocytosis. *Proteome science* 9:70.
- Elgazar-Carmon V, Rudich A, Hadad N & Levy R (2008) Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding. *J. Lipid Res.* 49(9):1894-1903.
- Ennaciri J & Girard D (2009) IL-4R(alpha), a new member that associates with Syk kinase: implication in IL-4-induced human neutrophil functions. *J Immunol* 183(8):5261-5269.
- Eriksson C & Nygren H (2001) Adhesion receptors of polymorphonuclear granulocytes on titanium in contact with whole blood. *J. Lab. Clin. Med.* 137(1):56-63.
- Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY & Henson PM (1998) Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J. Clin. Invest.* 101(4):890-898.
- Fallman M, Lew DP, Stendahl O & Andersson T (1989) Receptor-mediated phagocytosis in human neutrophils is associated with increased formation of inositol phosphates and diacylglycerol. Elevation in cytosolic free calcium and formation of inositol phosphates can be dissociated from accumulation of diacylglycerol. *J. Clin. Invest.* 84(3):886-891.
- Fauschou M & Borregaard N (2003a) Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and Infection* 5(14):1317-1327.

- Faurschou M & Borregaard N (2003b) Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 5(14):1317-1327.
- Faurschou M, Sorensen OE, Johnsen AH, Askaa J & Borregaard N (2002) Defensin-rich granules of human neutrophils: characterization of secretory properties. *Biochimica et biophysica acta* 1591(1-3):29-35.
- Feldmann M, Brennan FM, Chantry D, Haworth C, Turner M, Abney E, Buchan G, Barrett K, Barkley D, Chu A & et al. (1990) Cytokine production in the rheumatoid joint: implications for treatment. *Ann. Rheum. Dis.* 49 Suppl 1:480-486.
- Fialkow L, Wang Y & Downey GP (2007) Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic. Biol. Med.* 42(2):153-164.
- Filep JG, Zouki C, Petasis NA, Hachicha M & Serhan CN (1999) Anti-inflammatory actions of lipoxin A(4) stable analogs are demonstrable in human whole blood: modulation of leukocyte adhesion molecules and inhibition of neutrophil-endothelial interactions. *Blood* 94(12):4132-4142.
- Fligiel SE, Standiford T, Fligiel HM, Tashkin D, Strieter RM, Warner RL, Johnson KJ & Varani J (2006) Matrix metalloproteinases and matrix metalloproteinase inhibitors in acute lung injury. *Hum. Pathol.* 37(4):422-430.
- 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.
- Frey RS & Malik AB (2004) Oxidant signaling in lung cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 286(1):L1-3.
- Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L, Worthen GS & Albelda SM (2009) Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer cell* 16(3):183-194.
- Frommhold D, Mannigel I, Schymeinsky J, Mocsai A, Poeschl J, Walzog B & Sperandio M (2007) Spleen tyrosine kinase Syk is critical for sustained leukocyte adhesion during inflammation in vivo. *BMC Immunol.* 8:31.
- Fubini B, Ghiazza M & Fenoglio I (2010) Physico-chemical features of engineered nanoparticles relevant to their toxicity. *Nanotoxicology* 4:347-363.
- Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V & Zychlinsky A (2007) Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* 176(2):231-241.
- Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD, Jr., Wroblewski SK, Wakefield TW, Hartwig JH & Wagner DD (2010) Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(36):15880-15885.
- Fujishima S, Hoffman AR, Vu T, Kim KJ, Zheng H, Daniel D, Kim Y, Wallace EF, Larrick JW & Raffin TA (1993) Regulation of neutrophil interleukin 8 gene expression and protein secretion by LPS, TNF-alpha, and IL-1 beta. *J. Cell. Physiol.* 154(3):478-485.
- Funamoto S, Meili R, Lee S, Parry L & Firtel RA (2002) Spatial and temporal regulation of 3-phosphoinositides by PI 3-kinase and PTEN mediates chemotaxis. *Cell* 109(5):611-623.
- Ginsburg I (2002) The role of bacteriolysis in the pathophysiology of inflammation, infection and post-infectious sequelae. *APMIS* 110(11):753-770.
- Ginzberg HH, Cherapanov V, Dong Q, Cantin A, McCulloch CA, Shannon PT & Downey GP (2001) Neutrophil-mediated epithelial injury during transmigration: role of elastase. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 281(3):G705-717.
- Gipson TS, Bless NM, Shanley TP, Crouch LD, Bleavins MR, Younkin EM, Sarma V, Gibbs DF, Tefera W, McConnell PC, Mueller WT, Johnson KJ & Ward PA (1999) Regulatory effects of endogenous protease inhibitors in acute lung inflammatory injury. *J. Immunol.* 162(6):3653-3662.

- Goncalves DM, Chiasson S & Girard D (2010) Activation of human neutrophils by titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 24(3):1002-1008.
- Goncalves DM & Girard D (2014) Zinc oxide nanoparticles delay human neutrophil apoptosis by a de novo protein synthesis-dependent and reactive oxygen species-independent mechanism. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 28(5):926-931.
- Gosselin EJ, Wardwell K, Rigby WF & Guyre PM (1993) Induction of MHC class II on human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, IFN-gamma, and IL-3. *J. Immunol.* 151(3):1482-1490.
- Hagens WI, Oomen AG, de Jong WH, Cassee FR & Sips AJ (2007) What do we (need to) know about the kinetic properties of nanoparticles in the body? *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP* 49(3):217-229.
- Hager M, Cowland JB & Borregaard N (2010) Neutrophil granules in health and disease. *J. Intern. Med.* 268(1):25-34.
- Halamoda Kenzaoui B, Chapuis Bernasconi C, Guney-Ayra S & Juillerat-Jeanneret L (2012) Induction of oxidative stress, lysosome activation and autophagy by nanoparticles in human brain-derived endothelial cells. *The Biochemical journal* 441(3):813-821.
- Hallett MB & Lloyds D (1995) Neutrophil priming: the cellular signals that say 'amber' but not 'green'. *Immunol. Today* 16(6):264-268.
- Ham HY, Hong CW, Lee SN, Kwon MS, Kim YJ & Song DK (2012) Sulfur mustard primes human neutrophils for increased degranulation and stimulates cytokine release via TRPM2/p38 MAPK signaling. *Toxicol Appl Pharmacol* 258(1):82-88.
- Hanley C, Thurber A, Hanna C, Punnoose A, Zhang J & Wingett DG (2009) The Influences of Cell Type and ZnO Nanoparticle Size on Immune Cell Cytotoxicity and Cytokine Induction. *Nanoscale research letters* 4(12):1409-1420.
- Harris HE, Andersson U & Pisetsky DS (2012) HMGB1: a multifunctional alarmin driving autoimmune and inflammatory disease. *Nature reviews. Rheumatology* 8(4):195-202.
- Hartl D, Krauss-Etschmann S, Koller B, Hordijk PL, Kuijpers TW, Hoffmann F, Hector A, Eber E, Marcos V, Bittmann I, Eickelberg O, Griese M & Roos D (2008) Infiltrated neutrophils acquire novel chemokine receptor expression and chemokine responsiveness in chronic inflammatory lung diseases. *J. Immunol.* 181(11):8053-8067.
- Heit B, Robbins SM, Downey CM, Guan Z, Colarusso P, Miller BJ, Jirik FR & Kubes P (2008) PTEN functions to 'prioritize' chemotactic cues and prevent 'distraction' in migrating neutrophils. *Nat. Immunol.* 9(7):743-752.
- Heit B, Tavener S, Raharjo E & Kubes P (2002) An intracellular signaling hierarchy determines direction of migration in opposing chemotactic gradients. *J. Cell Biol.* 159(1):91-102.
- Hext PM, Tomenson JA & Thompson P (2005) Titanium dioxide: inhalation toxicology and epidemiology. *Ann Occup Hyg* 49(6):461-472.
- Hidari KI, Weyrich AS, Zimmerman GA & McEver RP (1997) Engagement of P-selectin glycoprotein ligand-1 enhances tyrosine phosphorylation and activates mitogen-activated protein kinases in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 272(45):28750-28756.
- Hirst SM, Karakoti AS, Tyler RD, Sriranganathan N, Seal S & Reilly CM (2009) Anti-inflammatory properties of cerium oxide nanoparticles. *Small* 5(24):2848-2856.
- Hoffstein ST, Friedman RS & Weissmann G (1982) Degranulation, membrane addition, and shape change during chemotactic factor-induced aggregation of human neutrophils. *J Cell Biol* 95(1):234-241.
- Hoover RL, Briggs RT & Karnovsky MJ (1978) The adhesive interaction between polymorphonuclear leukocytes and endothelial cells in vitro. *Cell* 14(2):423-428.

- Horie M, Fujita K, Kato H, Endoh S, Nishio K, Komaba LK, Nakamura A, Miyauchi A, Kinugasa S, Hagihara Y, Niki E, Yoshida Y & Iwahashi H (2012) Association of the physical and chemical properties and the cytotoxicity of metal oxide nanoparticles: metal ion release, adsorption ability and specific surface area. *Metallomics : integrated biometal science* 4(4):350-360.
- Hu X, Cook S, Wang P & Hwang HM (2009) In vitro evaluation of cytotoxicity of engineered metal oxide nanoparticles. *The Science of the total environment* 407(8):3070-3072.
- Hussain S, Al-Nsour F, Rice AB, Marshburn J, Ji Z, Zink JI, Yingling B, Walker NJ & Garantziotis S (2012a) Cerium dioxide nanoparticles do not modulate the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in human monocytes. *International journal of nanomedicine* 7:1387-1397.
- Hussain S, Al-Nsour F, Rice AB, Marshburn J, Yingling B, Ji Z, Zink JI, Walker NJ & Garantziotis S (2012b) Cerium dioxide nanoparticles induce apoptosis and autophagy in human peripheral blood monocytes. *ACS nano* 6(7):5820-5829.
- Hussain S, Vanoirbeek JA, Luyts K, De Vooght V, Verbeken E, Thomassen LC, Martens JA, Dinsdale D, Boland S, Marano F, Nemery B & Hoet PH (2011) Lung exposure to nanoparticles modulates an asthmatic response in a mouse model. *Eur Respir J* 37(2):299-309.
- Iwasaki A & Medzhitov R (2010) Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 327(5963):291-295.
- Jacobsen NR, Moller P, Jensen KA, Vogel U, Ladefoged O, Loft S & Wallin H (2009) Lung inflammation and genotoxicity following pulmonary exposure to nanoparticles in ApoE^{-/-} mice. *Part Fibre Toxicol* 6:2.
- Janeway CA, Jr. & Medzhitov R (2002) Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20:197-216.
- Janssen YM, Barchowsky A, Treadwell M, Driscoll KE & Mossman BT (1995) Asbestos induces nuclear factor kappa B (NF-kappa B) DNA-binding activity and NF-kappa B-dependent gene expression in tracheal epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(18):8458-8462.
- Johnston HJ, Hutchison GR, Christensen FM, Peters S, Hankin S & Stone V (2009) Identification of the mechanisms that drive the toxicity of TiO₂ particulates: the contribution of physicochemical characteristics. *Part. Fibre Toxicol.* 6:33.
- Jonsson F, Mancardi DA, Albanesi M & Bruhns P (2013) Neutrophils in local and systemic antibody-dependent inflammatory and anaphylactic reactions. *J. Leukoc. Biol.* 94(4):643-656.
- Kai-Larsen Y & Agerberth B (2008) The role of the multifunctional peptide LL-37 in host defense. *Front. Biosci.* 13:3760-3767.
- Kaushansky K (2006) Lineage-specific hematopoietic growth factors. *N. Engl. J. Med.* 354(19):2034-2045.
- Kennedy AD & DeLeo FR (2009) Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. *Immunologic research* 43(1-3):25-61.
- Kim S & Choi IH (2012) Phagocytosis and endocytosis of silver nanoparticles induce interleukin-8 production in human macrophages. *Yonsei medical journal* 53(3):654-657.
- Kirchner C, Liedl T, Kudera S, Pellegrino T, Munoz Javier A, Gaub HE, Stolzle S, Fertig N & Parak WJ (2005) Cytotoxicity of colloidal CdSe and CdSe/ZnS nanoparticles. *Nano letters* 5(2):331-338.
- Kobayashi Y (2008) The role of chemokines in neutrophil biology. *Front. Biosci.* 13:2400-2407.
- Kolaczowska E & Kuberski P (2013) Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 13(3):159-175.
- Korani M, Rezayat SM, Gilani K, Arbabi Bidgoli S & Adeli S (2011) Acute and subchronic dermal toxicity of nanosilver in guinea pig. *International journal of nanomedicine* 6:855-862.
- Korsvik C, Patil S, Seal S & Self WT (2007) Superoxide dismutase mimetic properties exhibited by vacancy engineered ceria nanoparticles. *Chem Commun (Camb)* (10):1056-1058.

- Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, Matsuzaki K, Itoh K, Ishiyama S, Saito S, Inoue K, Kamatani N, Gillespie MT, Martin TJ & Suda T (1999) IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J. Clin. Invest.* 103(9):1345-1352.
- Krezel A, Hao Q & Maret W (2007) The zinc/thiolate redox biochemistry of metallothionein and the control of zinc ion fluctuations in cell signaling. *Archives of biochemistry and biophysics* 463(2):188-200.
- Kwiatkowska K & Sobota A (1999a) Signaling pathways in phagocytosis. *Bioessays* 21(5):422-431.
- Kwiatkowska K & Sobota A (1999b) Tyrosine phosphorylation/dephosphorylation controls capping of Fcγ receptor II in U937 cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* 42(4):298-314.
- Lacy P (2006) Mechanisms of degranulation in neutrophils. *Allergy, asthma, and clinical immunology : official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology* 2(3):98-108.
- Lacy P & Eitzen G (2008) Control of granule exocytosis in neutrophils. *Front. Biosci.* 13:5559-5570.
- Larbre JP, Moore AR, Da Silva JA, Iwamura H, Ioannou Y & Willoughby DA (1994) Direct degradation of articular cartilage by rheumatoid synovial fluid: contribution of proteolytic enzymes. *J. Rheumatol.* 21(10):1796-1801.
- Larsen ST, Roursgaard M, Jensen KA & Nielsen GD (2010) Nano titanium dioxide particles promote allergic sensitization and lung inflammation in mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 106(2):114-117.
- Lee KP, Trochimowicz HJ & Reinhardt CF (1985) Pulmonary response of rats exposed to titanium dioxide (TiO₂) by inhalation for two years. *Toxicology and applied pharmacology* 79(2):179-192.
- Lekstrom-Himes JA & Gallin JI (2000) Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes. *N. Engl. J. Med.* 343(23):1703-1714.
- Leto TL & Geiszt M (2006) Role of Nox family NADPH oxidases in host defense. *Antioxid. Redox Signal.* 8(9-10):1549-1561.
- Leuenroth SJ, Grutkoski PS, Ayala A & Simms HH (2000) Suppression of PMN apoptosis by hypoxia is dependent on Mcl-1 and MAPK activity. *Surgery* 128(2):171-177.
- Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI & Nourshargh S (2007) Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature reviews. Immunology* 7(9):678-689.
- Li B, Ze Y, Sun Q, Zhang T, Sang X, Cui Y, Wang X, Gui S, Tan D, Zhu M, Zhao X, Sheng L, Wang L, Hong F & Tang M (2013) Molecular mechanisms of nanosized titanium dioxide-induced pulmonary injury in mice. *PloS one* 8(2):e55563.
- Li J, Johnson D, Calkins M, Wright L, Svendsen C & Johnson J (2005) Stabilization of Nrf2 by tBHQ confers protection against oxidative stress-induced cell death in human neural stem cells. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 83(2):313-328.
- Li JL & Ng LG (2012) Peeking into the secret life of neutrophils. *Immunol. Res.* 53(1-3):168-181.
- Lima CS, Paula EV, Takahashi T, Saad ST, Lorand-Metze I & Costa FF (2006) Causes of incidental neutropenia in adulthood. *Ann. Hematol.* 85(10):705-709.
- Lin J, Zhang H, Chen Z & Zheng Y (2010) Penetration of lipid membranes by gold nanoparticles: insights into cellular uptake, cytotoxicity, and their relationship. *ACS nano* 4(9):5421-5429.
- Liu R, Yin LH, Pu YP, Li YH, Zhang XQ, Liang GY, Li XB, Zhang J, Li YF & Zhang XY (2010) The immune toxicity of titanium dioxide on primary pulmonary alveolar macrophages relies on their surface area and crystal structure. *Journal of nanoscience and nanotechnology* 10(12):8491-8499.
- Lominadze G, Powell DW, Luerman GC, Link AJ, Ward RA & McLeish KR (2005) Proteomic analysis of human neutrophil granules. *Mol. Cell. Proteomics* 4(10):1503-1521.
- Lozano-Fernandez T, Ballester-Antxordoki L, Perez-Temprano N, Rojas E, Sanz D, Iglesias-Gaspar M, Moya S, Gonzalez-Fernandez A & Rey M (2014) Potential impact of metal oxide nanoparticles on the immune system: The role of integrins, L-selectin and the chemokine receptor CXCR4. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine.*

- Lundqvist M, Stigler J, Elia G, Lynch I, Cedervall T & Dawson KA (2008) Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105(38):14265-14270.
- Luo BH, Carman CV & Springer TA (2007) Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu. Rev. Immunol.* 25:619-647.
- Ma H, Williams PL & Diamond SA (2013) Ecotoxicity of manufactured ZnO nanoparticles--a review. *Environ. Pollut.* 172:76-85.
- Ma JY, Zhao H, Mercer RR, Barger M, Rao M, Meighan T, Schwegler-Berry D, Castranova V & Ma JK (2011) Cerium oxide nanoparticle-induced pulmonary inflammation and alveolar macrophage functional change in rats. *Nanotoxicology* 5(3):312-325.
- Maiorano G, Sabella S, Sorce B, Brunetti V, Malvindi MA, Cingolani R & Pompa PP (2010) Effects of cell culture media on the dynamic formation of protein-nanoparticle complexes and influence on the cellular response. *ACS nano* 4(12):7481-7491.
- Massberg S, Grahl L, von Bruehl ML, Manukyan D, Pfeiler S, Goosmann C, Brinkmann V, Lorenz M, Bidzhikov K, Khandagale AB, Konrad I, Kennerknecht E, Reges K, Holdenrieder S, Braun S, Reinhardt C, Spannagl M, Preissner KT & Engelmann B (2010) Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat. Med.* 16(8):887-896.
- Massol P, Montcourrier P, Guillemot JC & Chavrier P (1998) Fc receptor-mediated phagocytosis requires CDC42 and Rac1. *EMBO J.* 17(21):6219-6229.
- Matzinger P (2002) The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296(5566):301-305.
- Maugeri N, de Gaetano G, Carbone A, Donati MB & Cerletti C (2005) More on: tissue factor in neutrophils. *J. Thromb. Haemost.* 3(5):1114.
- Maynard AD, Aitken RJ, Butz T, Colvin V, Donaldson K, Oberdorster G, Philbert MA, Ryan J, Seaton A, Stone V, Tinkle SS, Tran L, Walker NJ & Warheit DB (2006) Safe handling of nanotechnology. *Nature* 444(7117):267-269.
- McEver RP (1994) Selectins. *Curr. Opin. Immunol.* 6(1):75-84.
- McKenzie SE & Schreiber AD (1998) Fc gamma receptors in phagocytes. *Curr. Opin. Hematol.* 5(1):16-21.
- Megiovanni AM, Sanchez F, Robledo-Sarmiento M, Morel C, Gluckman JC & Boudaly S (2006) Polymorphonuclear neutrophils deliver activation signals and antigenic molecules to dendritic cells: a new link between leukocytes upstream of T lymphocytes. *Journal of leukocyte biology* 79(5):977-988.
- Melley DD, Evans TW & Quinlan GJ (2005) Redox regulation of neutrophil apoptosis and the systemic inflammatory response syndrome. *Clin. Sci. (Lond.)* 108(5):413-424.
- Menard A, Drobne D & Jemec A (2011) Ecotoxicity of nanosized TiO₂. Review of in vivo data. *Environ Pollut* 159(3):677-684.
- Miao AJ, Zhang XY, Luo Z, Chen CS, Chin WC, Santschi PH & Quigg A (2010) Zinc oxide-engineered nanoparticles: dissolution and toxicity to marine phytoplankton. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC* 29(12):2814-2822.
- Mitroulis I, Kourtzelis I, Kambas K, Rafail S, Chrysanthopoulou A, Speletas M & Ritis K (2010) Regulation of the autophagic machinery in human neutrophils. *Eur. J. Immunol.* 40(5):1461-1472.
- Moeller S, Kegler R, Sternberg K & Mundkowski RG (2012) Influence of sirolimus-loaded nanoparticles on physiological functions of native human polymorphonuclear neutrophils. *Nanomedicine* 8(8):1293-1300.
- Montazer M & Seifollahzadeh S (2011) Enhanced self-cleaning, antibacterial and UV protection properties of nano TiO₂ treated textile through enzymatic pretreatment. *Photochem. Photobiol.* 87(4):877-883.
- Mortensen ES, Fenton KA & Rekvig OP (2008) Lupus nephritis: the central role of nucleosomes revealed. *Am. J. Pathol.* 172(2):275-283.

- Moyano DF, Goldsmith M, Solfiell DJ, Landesman-Milo D, Miranda OR, Peer D & Rotello VM (2012) Nanoparticle hydrophobicity dictates immune response. *Journal of the American Chemical Society* 134(9):3965-3967.
- Mulligan MS, Warner RL, Foreback JL, Shanley TP & Ward PA (1997) Protective effects of IL-4, IL-10, IL-12, and IL-13 in IgG immune complex-induced lung injury: role of endogenous IL-12. *J. Immunol.* 159(7):3483-3489.
- Nagase H, Miyamasu M, Yamaguchi M, Imanishi M, Tsuno NH, Matsushima K, Yamamoto K, Morita Y & Hirai K (2002) Cytokine-mediated regulation of CXCR4 expression in human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 71(4):711-717.
- Nathan C (1991) Mechanisms and modulation of macrophage activation. *Behring Institute Mitteilungen* (88):200-207.
- Nel A, Xia T, Madler L & Li N (2006) Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311(5761):622-627.
- Nel AE, Madler L, Velegol D, Xia T, Hoek EM, Somasundaran P, Klaessig F, Castranova V & Thompson M (2009) Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nature materials* 8(7):543-557.
- Nick JA, Avdi NJ, Young SK, Lehman LA, McDonald PP, Frasch SC, Billstrom MA, Henson PM, Johnson GL & Worthen GS (1999) Selective activation and functional significance of p38alpha mitogen-activated protein kinase in lipopolysaccharide-stimulated neutrophils. *J. Clin. Invest.* 103(6):851-858.
- Niu J, Azfer A, Rogers LM, Wang X & Kolattukudy PE (2007) Cardioprotective effects of cerium oxide nanoparticles in a transgenic murine model of cardiomyopathy. *Cardiovascular research* 73(3):549-559.
- Nobes CD & Hall A (1995) Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81(1):53-62.
- Noel A, Maghni K, Cloutier Y, Dion C, Wilkinson KJ, Halle S, Tardif R & Truchon G (2012) Effects of inhaled nano-TiO₂ aerosols showing two distinct agglomeration states on rat lungs. *Toxicology letters* 214(2):109-119.
- Nohynek GJ, Dufour EK & Roberts MS (2008) Nanotechnology, cosmetics and the skin: is there a health risk? *Skin pharmacology and physiology* 21(3):136-149.
- Nordenfelt P & Tapper H (2011) Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 90(2):271-284.
- Nourshargh S, Hordijk PL & Sixt M (2010) Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11(5):366-378.
- Nourshargh S & Marelli-Berg FM (2005) Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function. *Trends Immunol.* 26(3):157-165.
- Nygaard SD, Ganz T & Peterson MW (1993) Defensins reduce the barrier integrity of a cultured epithelial monolayer without cytotoxicity. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 8(2):193-200.
- Nygren H, Eriksson C & Lausmaa J (1997) Adhesion and activation of platelets and polymorphonuclear granulocyte cells at TiO₂ surfaces. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 129(1):35-46.
- Oberdorster G, Ferin J, Gelein R, Soderholm SC & Finkelstein J (1992) Role of the alveolar macrophage in lung injury: studies with ultrafine particles. *Environmental health perspectives* 97:193-199.
- Oberdorster G, Oberdorster E & Oberdorster J (2005) Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental health perspectives* 113(7):823-839.
- Ortega VA, Katzenback BA, Stafford JL, Belosevic M & Goss GG (2013) Effects of polymer-coated metal oxide nanoparticles on goldfish (*Carassius auratus* L.) neutrophil viability and function. *Nanotoxicology*.

- Park B, Donaldson K, Duffin R, Tran L, Kelly F, Mudway I, Morin JP, Guest R, Jenkinson P, Samaras Z, Giannouli M, Kouridis H & Martin P (2008) Hazard and risk assessment of a nanoparticulate cerium oxide-based diesel fuel additive - a case study. *Inhalation toxicology* 20(6):547-566.
- Park JB (2003) Phagocytosis induces superoxide formation and apoptosis in macrophages. *Experimental & molecular medicine* 35(5):325-335.
- Patel KD, Moore KL, Nollert MU & McEver RP (1995) Neutrophils use both shared and distinct mechanisms to adhere to selectins under static and flow conditions. *J. Clin. Invest.* 96(4):1887-1896.
- 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.
- Phillipson M, Kaur J, Colarusso P, Ballantyne CM & Kubes P (2008) Endothelial domes encapsulate adherent neutrophils and minimize increases in vascular permeability in paracellular and transcellular emigration. *PLoS One* 3(2):e1649.
- Phillipson M & Kubes P (2011) The neutrophil in vascular inflammation. *Nat. Med.* 17(11):1381-1390.
- Pillay J, den Braber I, Vriskoop 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.
- Pillay J, Kamp VM, van Hoffen E, Visser T, Tak T, Lammers JW, Ulfman LH, Leenen LP, Pickkers P & Koenderman L (2012) A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J. Clin. Invest.* 122(1):327-336.
- Prach M, Stone V & Proudfoot L (2013) Zinc oxide nanoparticles and monocytes: impact of size, charge and solubility on activation status. *Toxicology and applied pharmacology* 266(1):19-26.
- Prahalad AK, Soukup JM, Inmon J, Willis R, Ghio AJ, Becker S & Gallagher JE (1999) Ambient air particles: effects on cellular oxidant radical generation in relation to particulate elemental chemistry. *Toxicology and applied pharmacology* 158(2):81-91.
- Prasad AS (2008) Zinc in human health: effect of zinc on immune cells. *Mol Med* 14(5-6):353-357.
- Puzyn T, Rasulev B, Gajewicz A, Hu X, Dasari TP, Michalkova A, Hwang HM, Toropov A, Leszczynska D & Leszczynski J (2011) Using nano-QSAR to predict the cytotoxicity of metal oxide nanoparticles. *Nature nanotechnology* 6(3):175-178.
- Rankin SM (2010) The bone marrow: a site of neutrophil clearance. *J. Leukoc. Biol.* 88(2):241-251.
- Ravetch JV (1994) Fc receptors: rubor redux. *Cell* 78(4):553-560.
- Reed RB, Ladner DA, Higgins CP, Westerhoff P & Ranville JF (2012) Solubility of nano-zinc oxide in environmentally and biologically important matrices. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC* 31(1):93-99.
- Rensen SS, Slaats Y, Nijhuis J, Jans A, Bieghs V, Driessen A, Malle E, Greve JW & Buurman WA (2009) Increased hepatic myeloperoxidase activity in obese subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *Am. J. Pathol.* 175(4):1473-1482.
- Rochat T, Casale J, Hunninghake GW & Peterson MW (1988) Neutrophil cathepsin G increases permeability of cultured type II pneumocytes. *Am. J. Physiol.* 255(5 Pt 1):C603-611.
- 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. *Particle and fibre toxicology* 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 (2013) Interactive threats of nanoparticles to the biological system. *Immunol. Lett.* 158(1-2):79-87.

- Ryan SO, Johnson JL & Cobb BA (2013) Neutrophils confer T cell resistance to myeloid-derived suppressor cell-mediated suppression to promote chronic inflammation. *J. Immunol.* 190(10):5037-5047.
- Ryter SW, Kim HP, Hoetzel A, Park JW, Nakahira K, Wang X & Choi AM (2007) Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling* 9(1):49-89.
- Rzagalinski BA, Meehan K, Davis RM, Xu Y, Miles WC & Cohen CA (2006) Radical nanomedicine. *Nanomedicine (Lond)* 1(4):399-412.
- Sahu D, Kannan GM & Vijayaraghavan R (2014) Size-dependent effect of zinc oxide on toxicity and inflammatory potential of human monocytes. *Journal of toxicology and environmental health. Part A* 77(4):177-191.
- Sapojnikova N, Kartvelishvili T, Asatiani N, Zinkevich V, Kalandadze I, Gugutsidze D, Shakarishvili R & Tsiskaridze A (2014) Correlation between MMP-9 and extracellular cytokine HMGB1 in prediction of human ischemic stroke outcome. *Biochimica et biophysica acta.*
- Sato T, Hongu T, Sakamoto M, Funakoshi Y & Kanaho Y (2013) Molecular mechanisms of N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced superoxide generation and degranulation in mouse neutrophils: phospholipase D is dispensable. *Mol Cell Biol* 33(1):136-145.
- Savill J, Dransfield I, Gregory C & Haslett C (2002) A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 2(12):965-975.
- Savill J & Haslett C (1995) Granulocyte clearance by apoptosis in the resolution of inflammation. *Seminars in cell biology* 6(6):385-393.
- Sayes CM, Reed KL & Warheit DB (2011) Nanoparticle toxicology: measurements of pulmonary hazard effects following exposures to nanoparticles. *Methods Mol Biol* 726:313-324.
- Scapini P, Nardelli B, Nadali G, Calzetti F, Pizzolo G, Montecucco C & Cassatella MA (2003) G-CSF-stimulated neutrophils are a prominent source of functional BLyS. *J. Exp. Med.* 197(3):297-302.
- Schleh C, Semmler-Behnke M, Lipka J, Wenk A, Hirn S, Schaffler M, Schmid G, Simon U & Kreyling WG (2012) Size and surface charge of gold nanoparticles determine absorption across intestinal barriers and accumulation in secondary target organs after oral administration. *Nanotoxicology* 6(1):36-46.
- Schrand AM, Schlager JJ, Dai L & Hussain SM (2010) Preparation of cells for assessing ultrastructural localization of nanoparticles with transmission electron microscopy. *Nature protocols* 5(4):744-757.
- Scott MG, Davidson DJ, Gold MR, Bowdish D & Hancock RE (2002) The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses. *J. Immunol.* 169(7):3883-3891.
- Sekler I, Sensi SL, Hershinkel M & Silverman WF (2007) Mechanism and regulation of cellular zinc transport. *Mol Med* 13(7-8):337-343.
- Selsted ME & Ouellette AJ (2005) Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat. Immunol.* 6(6):551-557.
- Sengelov H, Kjeldsen L & Borregaard N (1993a) Control of exocytosis in early neutrophil activation. *J Immunol* 150(4):1535-1543.
- Sengelov H, Kjeldsen L, Diamond MS, Springer TA & Borregaard N (1993b) Subcellular localization and dynamics of Mac-1 (alpha m beta 2) in human neutrophils. *The Journal of clinical investigation* 92(3):1467-1476.
- Seo SM, McIntire LV & Smith CW (2001) Effects of IL-8, Gro-alpha, and LTB(4) on the adhesive kinetics of LFA-1 and Mac-1 on human neutrophils. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 281(5):C1568-1578.
- Serhan CN (2010) Novel lipid mediators and resolution mechanisms in acute inflammation: to resolve or not? *Am. J. Pathol.* 177(4):1576-1591.

- Serhan CN, Brain SD, Buckley CD, Gilroy DW, Haslett C, O'Neill LA, Perretti M, Rossi AG & Wallace JL (2007) Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB J.* 21(2):325-332.
- Shafer WM, Hubalek F, Huang M & Pohl J (1996) Bactericidal activity of a synthetic peptide (CG 117-136) of human lysosomal cathepsin G is dependent on arginine content. *Infect. Immun.* 64(11):4842-4845.
- Shen C, James SA, de Jonge MD, Turney TW, Wright PF & Feltis BN (2013) Relating cytotoxicity, zinc ions, and reactive oxygen in ZnO nanoparticle-exposed human immune cells. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 136(1):120-130.
- Shi H, Magaye R, Castranova V & Zhao J (2013) Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Particle and fibre toxicology* 10:15.
- Sievers EL & Dale DC (1996) Non-malignant neutropenia. *Blood Rev.* 10(2):95-100.
- Simard J-C, Girard D & Tessier PA (2010a) Induction of neutrophil degranulation by S100A9 via a MAPK-dependent mechanism. *Journal of leukocyte biology* 87(5):905-914.
- Simard JC, Girard D & Tessier PA (2010b) Induction of neutrophil degranulation by S100A9 via a MAPK-dependent mechanism. *J Leukoc Biol* 87(5):905-914.
- Simon SI, Hu Y, Vestweber D & Smith CW (2000) Neutrophil tethering on E-selectin activates beta 2 integrin binding to ICAM-1 through a mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J. Immunol.* 164(8):4348-4358.
- Simon SI & Schmid-Schonbein GW (1988) Biophysical aspects of microsphere engulfment by human neutrophils. *Biophys. J.* 53(2):163-173.
- Singer AJ & Clark RA (1999) Cutaneous wound healing. *N. Engl. J. Med.* 341(10):738-746.
- Skokowa J & Welte K (2007) LEF-1 is a decisive transcription factor in neutrophil granulopoiesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1106:143-151.
- Smijs TG & Pavel S (2011) Titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens: focus on their safety and effectiveness. *Nanotechnology, science and applications* 4:95-112.
- Smith CW, Rothlein R, Hughes BJ, Mariscalco MM, Rudloff HE, Schmalstieg FC & Anderson DC (1988) Recognition of an endothelial determinant for CD 18-dependent human neutrophil adherence and transendothelial migration. *J. Clin. Invest.* 82(5):1746-1756.
- Soehnlein O (2009) Direct and alternative antimicrobial mechanisms of neutrophil-derived granule proteins. *J Mol Med (Berl)* 87(12):1157-1164.
- Soehnlein O, Kai-Larsen Y, Frithiof R, Sorensen OE, Kenne E, Scharffetter-Kochanek K, Eriksson EE, Herwald H, Agerberth B & Lindbom L (2008) Neutrophil primary granule proteins HBP and HNP1-3 boost bacterial phagocytosis by human and murine macrophages. *J. Clin. Invest.* 118(10):3491-3502.
- Soehnlein O, Lindbom L & Weber C (2009a) Mechanisms underlying neutrophil-mediated monocyte recruitment. *Blood* 114(21):4613-4623.
- Soehnlein O, Weber C & Lindbom L (2009b) Neutrophil granule proteins tune monocytic cell function. *Trends Immunol.* 30(11):538-546.
- Soehnlein O, Zerneck A & Weber C (2009c) Neutrophils launch monocyte extravasation by release of granule proteins. *Thromb. Haemost.* 102(2):198-205.
- Song W, Zhang J, Guo J, Zhang J, Ding F, Li L & Sun Z (2010) Role of the dissolved zinc ion and reactive oxygen species in cytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Toxicology letters* 199(3):389-397.
- Springer TA (1990) Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346(6283):425-434.
- Srinivas A, Rao PJ, Selvam G, Murthy PB & Reddy PN (2011) Acute inhalation toxicity of cerium oxide nanoparticles in rats. *Toxicology letters* 205(2):105-115.
- Stark WJ (2011) Nanoparticles in biological systems. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 50(6):1242-1258.

- Steinberg BE & Grinstein S (2007) Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2007(379):pe11.
- Su Z, Zhou W & Zhang Y (2011) New insight into the soot nanoparticles in a candle flame. *Chem. Commun. (Camb.)* 47(16):4700-4702.
- Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM & Chilvers ER (2010) Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol.* 31(8):318-324.
- Suratt BT, Young SK, Lieber J, Nick JA, Henson PM & Worthen GS (2001) Neutrophil maturation and activation determine anatomic site of clearance from circulation. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 281(4):L913-921.
- Takeuchi O & Akira S (2010) Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140(6):805-820.
- Talukdar S, Oh da Y, Bandyopadhyay G, Li D, Xu J, McNelis J, Lu M, Li P, Yan Q, Zhu Y, Ofrecio J, Lin M, Brenner MB & Olefsky JM (2012) Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase. *Nat. Med.* 18(9):1407-1412.
- Tantra R & Knight A (2011) Cellular uptake and intracellular fate of engineered nanoparticles: a review on the application of imaging techniques. *Nanotoxicology* 5(3):381-392.
- Tarnuzzer RW, Colon J, Patil S & Seal S (2005) Vacancy engineered ceria nanostructures for protection from radiation-induced cellular damage. *Nano Lett.* 5(12):2573-2577.
- Tavares de Lima W, Steil AA, Russo M, Starobinas N, Teixeira CF & Jancar S (1998) Lipid mediators, tumor necrosis factor and nitric oxide and their interactions in immune-complex-induced lung injury. *Eur. J. Pharmacol.* 358(1):69-75.
- Tedja R, Lim M, Amal R & Marquis C (2012) Effects of serum adsorption on cellular uptake profile and consequent impact of titanium dioxide nanoparticles on human lung cell lines. *ACS nano* 6(5):4083-4093.
- Terzano C, Di Stefano F, Conti V, Graziani E & Petroianni A (2010) Air pollution ultrafine particles: toxicity beyond the lung. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 14(10):809-821.
- Toonen RF & Verhage M (2003) Vesicle trafficking: pleasure and pain from SM genes. *Trends in cell biology* 13(4):177-186.
- Tosello Boari J, Amezcua Vesely MC, Bermejo DA, Ramello MC, Montes CL, Cejas H, Gruppi A & Acosta Rodriguez EV (2012) IL-17RA signaling reduces inflammation and mortality during Trypanosoma cruzi infection by recruiting suppressive IL-10-producing neutrophils. *PLoS Pathog.* 8(4):e1002658.
- Touyz RM (2005) Reactive oxygen species as mediators of calcium signaling by angiotensin II: implications in vascular physiology and pathophysiology. *Antioxid. Redox Signal.* 7(9-10):1302-1314.
- Trevani AS, Andonegui G, Giordano M, Nociari M, Fontan P, Dran G & Geffner JR (1996) Neutrophil apoptosis induced by proteolytic enzymes. *Lab. Invest.* 74(3):711-721.
- Tsai YY, Oca-Cossio J, Agering K, Simpson NE, Atkinson MA, Wasserfall CH, Constantinidis I & Sigmund W (2007) Novel synthesis of cerium oxide nanoparticles for free radical scavenging. *Nanomedicine (Lond)* 2(3):325-332.
- Tso CP, Zhong CM, Shih YH, Tseng YM, Wu SC & Doong RA (2010) Stability of metal oxide nanoparticles in aqueous solutions. *Water Sci Technol* 61(1):127-133.
- Tsou TC, Chao HR, Yeh SC, Tsai FY & Lin HJ (2011) Zinc induces chemokine and inflammatory cytokine release from human promonocytes. *Journal of hazardous materials* 196:335-341.
- Tsuda Y, Takahashi H, Kobayashi M, Hanafusa T, Herndon DN & Suzuki F (2004) Three different neutrophil subsets exhibited in mice with different susceptibilities to infection by methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Immunity* 21(2):215-226.

- Tuomela S, Autio R, Buerki-Thurnherr T, Arslan O, Kunzmann A, Andersson-Willman B, Wick P, Mathur S, Scheynius A, Krug HF, Fadeel B & Lahesmaa R (2013) Gene expression profiling of immune-competent human cells exposed to engineered zinc oxide or titanium dioxide nanoparticles. *PLoS one* 8(7):e68415.
- Urzainqui A, Serrador JM, Viedma F, Yanez-Mo M, Rodriguez A, Corbi AL, Alonso-Lebrero JL, Luque A, Deckert M, Vazquez J & Sanchez-Madrid F (2002) ITAM-based interaction of ERM proteins with Syk mediates signaling by the leukocyte adhesion receptor PSGL-1. *Immunity* 17(4):401-412.
- van Gisbergen KP, Sanchez-Hernandez M, Geijtenbeek TB & van Kooyk Y (2005) Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. *J. Exp. Med.* 201(8):1281-1292.
- Verma A & Stellacci F (2010) Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. *Small* 6(1):12-21.
- von Bruhl ML, Stark K, Steinhart A, Chandraratne S, Konrad I, Lorenz M, Khandoga A, Tirniceriu A, Coletti R, Kollnberger M, Byrne RA, Laitinen I, Walch A, Brill A, Pfeiler S, Manukyan D, Braun S, Lange P, Riegger J, Ware J, Eckart A, Haidari S, Rudelius M, Schulz C, Echtler K, Brinkmann V, Schwaiger M, Preissner KT, Wagner DD, Mackman N, Engelmann B & Massberg S (2012) Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J. Exp. Med.* 209(4):819-835.
- Vroman L (1984) Problems in the development of materials that are compatible with blood. *Biomaterials, medical devices, and artificial organs* 12(3-4):307-323.
- Walkey CD, Olsen JB, Guo H, Emili A & Chan WC (2012) Nanoparticle size and surface chemistry determine serum protein adsorption and macrophage uptake. *Journal of the American Chemical Society* 134(4):2139-2147.
- Wang Q & Doerschuk CM (2002) The signaling pathways induced by neutrophil-endothelial cell adhesion. *Antioxid. Redox Signal.* 4(1):39-47.
- Warheit DB, Webb TR, Sayes CM, Colvin VL & Reed KL (2006) Pulmonary instillation studies with nanoscale TiO₂ rods and dots in rats: toxicity is not dependent upon particle size and surface area. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 91(1):227-236.
- Wartha F, Beiter K, Normark S & Henriques-Normark B (2007) Neutrophil extracellular traps: casting the NET over pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* 10(1):52-56.
- Watari F, Takashi N, Yokoyama A, Uo M, Akasaka T, Sato Y, Abe S, Totsuka Y & Tohji K (2009) Material nanosizing effect on living organisms: non-specific, biointeractive, physical size effects. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society* 6 Suppl 3:S371-388.
- Weinmann P, Moura RA, Caetano-Lopes JR, Pereira PA, Canhao H, Queiroz MV & Fonseca JE (2007) Delayed neutrophil apoptosis in very early rheumatoid arthritis patients is abrogated by methotrexate therapy. *Clin. Exp. Rheumatol.* 25(6):885-887.
- Weiss SJ (1989) Tissue destruction by neutrophils. *N. Engl. J. Med.* 320(6):365-376.
- Wiethoff AJ, Reed KL, Webb TR & Warheit DB (2003) Assessing the role of neutrophil apoptosis in the resolution of particle-induced pulmonary inflammation. *Inhalation toxicology* 15(12):1231-1246.
- Wilhelmi V, Fischer U, Weighardt H, Schulze-Osthoff K, Nickel C, Stahlmecke B, Kuhlbusch TA, Scherbart AM, Esser C, Schins RP & Albrecht C (2013) Zinc oxide nanoparticles induce necrosis and apoptosis in macrophages in a p47phox- and Nrf2-independent manner. *PLoS one* 8(6):e65704.
- Williams MR, Azcutia V, Newton G, Alcaide P & Luscinskas FW (2011) Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium. *Trends in immunology* 32(10):461-469.
- Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P & Halbwachs-Mecarelli L (2000) Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* 80(5):617-653.
- Woodfin A, Voisin MB, Beyrau M, Colom B, Caille D, Diapouli FM, Nash GB, Chavakis T, Albelda SM, Rainger GE, Meda P, Imhof BA & Nourshargh S (2011) The junctional adhesion molecule JAM-C

- regulates polarized transendothelial migration of neutrophils in vivo. *Nature immunology* 12(8):761-769.
- Woodfin A, Voisin MB, Imhof BA, Dejana E, Engelhardt B & Nourshargh S (2009) Endothelial cell activation leads to neutrophil transmigration as supported by the sequential roles of ICAM-2, JAM-A, and PECAM-1. *Blood* 113(24):6246-6257.
- Wright DG, Kenney RF, Oette DH, LaRussa VF, Boxer LA & Malech HL (1994) Contrasting effects of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and granulocyte CSF treatment on the cycling of blood elements in childhood-onset cyclic neutropenia. *Blood* 84(4):1257-1267.
- Xia T, Kovochich M, Liong M, Madler L, Gilbert B, Shi H, Yeh JI, Zink JI & Nel AE (2008) Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. *ACS nano* 2(10):2121-2134.
- Xu JY, Han K, Li SX, Cheng JS, Xu GT, Li WX & Li QN (2009) Pulmonary responses to polyhydroxylated fullereneols, C(60)(OH)(x). *J Appl Toxicol* 29(7):578-584.
- Xu M, Li J, Iwai H, Mei Q, Fujita D, Su H, Chen H & Hanagata N (2012) Formation of nano-bio-complex as nanomaterials dispersed in a biological solution for understanding nanobiological interactions. *Sci. Rep.* 2:406.
- Yamamoto K & Johnston RB, Jr. (1984) Dissociation of phagocytosis from stimulation of the oxidative metabolic burst in macrophages. *J. Exp. Med.* 159(2):405-416.
- Yang D, de la Rosa G, Tewary P & Oppenheim JJ (2009) Alarmins link neutrophils and dendritic cells. *Trends Immunol.* 30(11):531-537.
- Yazdi AS, Guarda G, Riteau N, Drexler SK, Tardivel A, Couillin I & Tschopp J (2010) Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1alpha and IL-1beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(45):19449-19454.
- Yin H, Casey PS & McCall MJ (2010) Surface modifications of ZnO nanoparticles and their cytotoxicity. *Journal of nanoscience and nanotechnology* 10(11):7565-7570.
- Yokel RA & Macphail RC (2011) Engineered nanomaterials: exposures, hazards, and risk prevention. *J. Occup. Med. Toxicol.* 6:7.
- Yuan Y, Ding J, Xu J, Deng J & Guo J (2010) TiO₂ nanoparticles co-doped with silver and nitrogen for antibacterial application. *Journal of nanoscience and nanotechnology* 10(8):4868-4874.
- Yuen IS, Hartsky MA, Snajdr SI & Warheit DB (1996) Time course of chemotactic factor generation and neutrophil recruitment in the lungs of dust-exposed rats. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 15(2):268-274.
- Zahr AS, Davis CA & Pishko MV (2006) Macrophage uptake of core-shell nanoparticles surface modified with poly(ethylene glycol). *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 22(19):8178-8185.
- Zarbock A & Ley K (2008) Mechanisms and consequences of neutrophil interaction with the endothelium. *Am. J. Pathol.* 172(1):1-7.
- Zhang L, Bai R, Li B, Ge C, Du J, Liu Y, Le Guyader L, Zhao Y, Wu Y, He S, Ma Y & Chen C (2011) Rutile TiO₂ particles exert size and surface coating dependent retention and lesions on the murine brain. *Toxicology letters* 207(1):73-81.
- Zolnik BS, Gonzalez-Fernandez A, Sadrieh N & Dobrovolskaia MA (2010) Nanoparticles and the immune system. *Endocrinology* 151(2):458-465.