

Prévention des risques chimiques et biologiques

Études et recherches

RAPPORT R-886



Procédures et évaluation du potentiel pro-inflammatoire des nanoparticules

*Valérie Lavastre
David Gonçalves
Denis Girard*



Solidement implanté au Québec depuis 1980, l'Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST) est un organisme de recherche scientifique reconnu internationalement pour la qualité de ses travaux.

NOS RECHERCHES

travaillent pour vous !

Mission

Contribuer, par la recherche, à la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles ainsi qu'à la réadaptation des travailleurs qui en sont victimes;

Assurer la diffusion des connaissances et jouer un rôle de référence scientifique et d'expertise;

Offrir les services de laboratoires et l'expertise nécessaires à l'action du réseau public de prévention en santé et en sécurité du travail.

Doté d'un conseil d'administration paritaire où siègent en nombre égal des représentants des employeurs et des travailleurs, l'IRSST est financé par la Commission de la santé et de la sécurité du travail.

Pour en savoir plus

Visitez notre site Web ! Vous y trouverez une information complète et à jour. De plus, toutes les publications éditées par l'IRSST peuvent être téléchargées gratuitement. www.irsst.qc.ca

Pour connaître l'actualité de la recherche menée ou financée par l'IRSST, abonnez-vous gratuitement au magazine *Prévention au travail*, publié conjointement par l'Institut et la CSST. Abonnement : www.csst.qc.ca/AbonnementPAT

Dépôt légal

Bibliothèque et Archives nationales du Québec
2015
ISBN : 978-2-89631-821-6 (PDF)
ISSN : 0820-8395

IRSST - Direction des communications
et de la valorisation de la recherche
505, boul. De Maisonneuve Ouest
Montréal (Québec)
H3A 3C2
Téléphone : 514 288-1551
Télécopieur : 514 288-7636
publications@irsst.qc.ca
www.irsst.qc.ca
© Institut de recherche Robert-Sauvé
en santé et en sécurité du travail,
Juillet 2015



Prévention des risques chimiques et biologiques

Études et recherches

■ RAPPORT R-886

Procédures et évaluation du potentiel pro-inflammatoire des nanoparticules

Avis de non-responsabilité

L'IRSST ne donne aucune garantie relative à l'exactitude, la fiabilité ou le caractère exhaustif de l'information contenue dans ce document. En aucun cas l'IRSST ne saurait être tenu responsable pour tout dommage corporel, moral ou matériel résultant de l'utilisation de cette information.

Notez que les contenus des documents sont protégés par les législations canadiennes applicables en matière de propriété intellectuelle.

Valérie Lavastre, David Gonçalves, Denis Girard
INRS-Institut Armand-Frappier



Cette publication est disponible
en version PDF
sur le site Web de l'IRSST.

ÉVALUATION PAR DES PAIRS

Conformément aux politiques de l'IRSST, les résultats des travaux de recherche publiés dans ce document ont fait l'objet d'une évaluation par des pairs.

REMERCIEMENTS

Nous désirons remercier toutes les personnes qui ont contribué à l'avancement de cette étude, particulièrement les étudiants gradués dont leur projet de recherche en nanotoxicologie portait entièrement ou partiellement sur l'effet des nanoparticules sur la biologie des neutrophiles humains et sur l'inflammation. Nous exprimons donc notre gratitude envers les étudiants au second cycle, Kim Babin, Isabelle Durocher, Michèle Poirier et Claudie Noël, les étudiants au troisième cycle, Jean-Christophe Simard et Francis Vallières, et le post-doctorant Rafael de Liz. De plus, nous tenons à remercier la technicienne Sophie Binette.

Les auteurs veulent également souligner la contribution de nos nombreux volontaires qui ont fait don de leur sang, permettant ainsi la réalisation de notre étude.

Nous tenons à remercier l'Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST) pour sa confiance et son soutien financier dans la réalisation du projet.

SOMMAIRE

Plusieurs pays industrialisés, incluant le Canada, ont opté pour le développement des nanotechnologies étant donné le grand potentiel économique que cela représente. Au Québec, de nombreuses entreprises de production de nanoparticules (NP) sont déjà implantées et il y a fort à parier que d'autres suivront ce mouvement d'ici peu. Ce faisant, le nombre de travailleurs œuvrant dans les domaines des nanotechnologies en général ou dans la fabrication et synthèse des NP augmentera grandement dans les prochaines années. Il est donc capital de prévenir le développement de maladies et d'accidents du travail reliés aux NP dont la cause est souvent d'ordre inflammatoire. Des données scientifiques s'accumulent et démontrent des effets toxiques et indésirables de certaines NP dont nous ne connaissons ni la toxicité ni l'efficacité des moyens pour les contenir. L'inflammation est un des effets toxiques des NP les plus répertoriés dans la littérature scientifique. Des études *in vivo* au cours desquelles des NP sont administrées à des rongeurs par la voie pulmonaire, voie par laquelle les travailleurs seraient le plus susceptibles d'être exposés aux NP, rapportent un nombre élevé de cellules immunitaires de type neutrophile, chef d'orchestre de l'inflammation. En dépit de ce fait, il était curieux de constater que très peu de données étaient disponibles quant aux interactions directes entre les NP et les neutrophiles. Sachant qu'en plus de la voie d'inhalation, les NP peuvent atteindre la circulation sanguine à la suite d'une ingestion et d'un contact dermique, il devient donc plausible d'imaginer que les neutrophiles, les leucocytes les plus abondants dans le sang humain, puissent interagir avec des NP.

Le présent projet visait à combler cette lacune. Ainsi, le premier objectif issu de cette problématique était de démontrer l'influence des NP sur la physiologie et sur les fonctions du neutrophile humain (volet *in vitro*). Le second objectif (volet *in vivo*) consistait à évaluer les effets des NP sur la réponse inflammatoire chez la souris.

Pour le volet *in vitro*, des neutrophiles de donneurs sains consentants ont été fraîchement isolés puis traités avec une NP donnée afin d'évaluer les capacités modulateurs sur plusieurs fonctions, toutes reliées au processus inflammatoire. Pour le volet *in vivo*, le modèle de la formation d'une poche d'air chez la souris a été employé. Brièvement, de l'air stérile était administré de façon sous-cutanée afin de créer une poche dans laquelle une NP donnée a été administrée pour diverses périodes de temps et à diverses concentrations (paramètres choisis à partir des résultats *in vitro*). Les cellules colonisant la poche ont ensuite été dénombrées puis identifiées afin d'évaluer l'infiltration neutrophilique.

En utilisant une approche expérimentale alliant à la fois les aspects *in vitro* et *in vivo*, nous avons été en mesure de déterminer quelles sont les NP qui affectent le plus la physiologie des neutrophiles et lesquelles provoquent une infiltration neutrophilique *in vivo*. Citons par exemple que, *in vitro*, le CeO₂, le TiO₂ et le ZnO provoquent des effets différentiels sur la phagocytose et la dégranulation des neutrophiles et que les NP d'argent (Ag) (dépendamment du diamètre) induisent une mort atypique des neutrophiles. Le ZnO et le TiO₂ activent les neutrophiles et retardent leur entrée en apoptose. *In vivo*, nous avons remarqué que le TiO₂ et les dendrimères provoquent une infiltration neutrophilique tandis que d'autres pas, comme c'est le cas du fullerenol (C₆₀(OH)_n).

La somme des résultats nous démontrent qu'il est difficile de classifier les NP strictement selon leur potentiel pro-inflammatoire et qu'il est préférable de présenter un tableau plus nuancé dans lequel les effets provoqués par une NP donnée sur la physiologie des neutrophiles humains *in vitro* et sur la capacité d'induire une infiltration neutrophilique *in vivo* doivent être pris en considération. Incidemment, les effets des NP sont extrêmement variés. Il est démontré que les NP n'agissent pas toutes de la même façon *in vitro* et *in vivo* et qu'elles peuvent avoir des effets complètement opposés selon leur diamètre initial.

Les retombées de ce projet effectué avec des cellules isolées d'individus sains permettront, par la suite, d'utiliser les cellules de certains travailleurs potentiellement exposés aux NP, afin d'étudier les fonctions des neutrophiles qui pourraient avoir des réponses fonctionnelles exagérées puisque déjà préactivées, un concept bien connu en matière d'inflammation. À l'inverse, si par exemple la fonction de phagocytose exercée par les neutrophiles de ces travailleurs s'avérait être diminuée, ces derniers pourraient être plus susceptibles aux infections, car cette fonction des neutrophiles a pour but d'ingérer les pathogènes et de les détruire. Ces observations, combinées à celles décrites par d'autres équipes étudiant d'autres facettes de la toxicité des NP, permettront d'aider les préventeurs lors de la prise de certaines décisions quant à la gestion des risques liés à une exposition aux NP chez les travailleurs.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	I
SOMMAIRE	III
TABLE DES MATIÈRES	V
LISTE DES TABLEAUX	VII
LISTE DES FIGURES.....	IX
LISTE DES ACRONYMES, SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	XI
1. INTRODUCTION.....	1
1.1 Problématique	1
1.2 État des connaissances.....	2
2. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	5
2.1 Hypothèse.....	5
2.2 Objectifs.....	5
3. MÉTHODOLOGIE.....	7
3.1 Sélection et caractérisation des nanoparticules.....	7
3.2 Volet I - Procédures <i>in vitro</i>	8
3.3 Volet II - Procédures <i>in vivo</i>	10
4. RÉSULTATS.....	13
4.1 Volet I – <i>In vitro</i>	13
4.2 Volet II – <i>In vivo</i>	18
5. DISCUSSION.....	23

6. CONCLUSION.....	27
7. BIBLIOGRAPHIE.....	29

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 - NP étudiées dans ce projet.....	7
Tableau 2 - Influence des conditions expérimentales sur la taille et le potentiel zêta des NP de ZnO ^a	13
Tableau 3 - Synthèse des résultats portant sur les effets différentiels des NP sur la physiologie des neutrophiles humains.....	14
Tableau 4 – Effets des NP sur l'infiltration neutrophilique <i>in vivo</i>	19

LISTE DES FIGURES

Figure 1 – Schéma résumant les deux approches expérimentales ayant servi à évaluer le potentiel pro-inflammatoire des NP.....	11
Figure 2 – Libération de la MPO, la MMP-9 et l'albumine par les neutrophiles humains après une exposition avec les NP de CeO ₂ , ZnO ou TiO ₂	16
Figure 3 – Les NP de CeO ₂ , ZnO et TiO ₂ augmentent l'activité gélatinase des neutrophiles humains mesurée par zymographie.....	16
Figure 4 – Induction de l'apoptose des neutrophiles avec les NP d'Ag ₂₀	17
Figure 5 – Les NP de ZnO retardent l'apoptose des neutrophiles.....	18
Figure 6 – Les AuNP- induisent un recrutement de leucocytes.....	20
Figure 7 - Les dendrimères de plusieurs générations induisent le recrutement de leucocytes.	21

LISTE DES ACRONYMES, SIGLES ET ABRÉVIATIONS

Ag: Argent

Al₂O₃: Alumine ou oxyde d'aluminium

ATO: Trioxyde d'arsenic

Au: Or

C₆₀(OH)_n: Fullerenol

CeO₂: Dioxyde de cérium

CM-H₂DCFDA: 5- [et-6]-chlorométhyle-2',7'-dichlorodihydrofluorescéine diacétate

Dendrimère G1: Dendrimère de génération 1

EDTA: acide éthylène diamine tétraacétique

Fe₃O₄: Oxyde de fer (II, III) ou magnétite

fMLP: *Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine* ou f-Met-Leu-Phe

GM-CSF: *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*

HBSS: *Hank's balanced salt solution*

IDV: *Integrated density value*

Ig: Immunoglobuline

IL: Interleukine

INRS: Institut national de recherche scientifique

LB: *Lysogeny broth*

LPS: Lipopolysaccharide

MMP: Matrice métalloprotéinase

MPO: Myéloperoxydase

NP: Nanoparticule

NP_x: Nanoparticule ayant un diamètre x (nm)

NTC: Nanotube de carbone

PBS : *Phosphate buffered saline*

PMA: *Phorbol myristate acetate*

PS: Phosphatidylsérine

ROS: *Reactive oxygen species* pour dérivés réactifs de l'oxygène

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*

SiO₂: Oxyde de silice

TiO₂: Dioxyde de titane

TNF- α : Facteur de nécrose tumorale α

VA: *Viscum album* agglutinine-I

ZnO: Oxyde de zinc

1. INTRODUCTION

1.1 Problématique

Plusieurs pays industrialisés, incluant le Canada, ont opté pour le développement des nanotechnologies étant donné le grand potentiel économique que cela représente. Au Québec, de nombreuses entreprises de production de nanoparticules (NP) sont déjà implantées et il y a fort à parier que d'autres suivront ce mouvement dans les prochaines années. Ce faisant, le nombre de travailleurs œuvrant dans les domaines des nanotechnologies en général ou dans la fabrication et synthèse des NP augmentera grandement dans le futur. De plus, plusieurs autres compagnies achètent des NP afin de les introduire dans leurs procédés de fabrication.

Grossièrement, nous pouvons distinguer trois principaux groupes de personnes/établissements potentiellement exposés aux NP au Québec, tout comme ailleurs:

1. Les chercheurs, les étudiants et le personnel technique qui manipulent une variété extrêmement diversifiée de NP pour lesquelles il est souvent très difficile de prévoir si elles auront une application commerciale;
2. Les producteurs de NP et tous ceux qui en achètent et les modifient;
3. Les entreprises qui achètent des NP de toutes sortes pour les introduire dans leurs procédés de fabrication alors que nous ne connaissons pas exactement les risques potentiels qui y sont associés, ni les mesures de prévention à mettre en place. Il s'agit d'un secteur pour lequel nous ne connaissons pas très bien les produits mis en œuvre (et pour lequel le potentiel de risques pour la santé est probablement le plus important).

Au Québec, on retrouve près de 250 entreprises qui œuvrent dans le domaine des nanotechnologies. Elles sont surtout spécialisées en recherche et développement (R-D) de nanotechnologies pour les industries de l'optique, des télécommunications, du bois, du transport, de l'énergie et des technologies vertes, de la microélectronique et du photonique, du secteur militaire ainsi que pour l'industrie médicale et pharmaceutique.¹ De nombreux travailleurs œuvrent donc à la synthèse, à la transformation ou à l'utilisation des NP et leur nombre devrait augmenter au cours des prochaines années. À titre d'exemple, citons l'usine Kronos, inaugurée à Varennes en 1957, qui produit à même l'ilménite ore (roche-mère) le pigment TiO₂ (rutil et anatase) et qui emploie environ 400 travailleurs dont plus de la moitié seraient exposés directement aux NP.²

De l'autre côté, en R-D, quelques centres de recherche publics et privés emploient 265 chercheurs et 142 technologues et accueillent plus de 1 000 étudiants.¹

¹ Sources : www.nanoquebec.ca et www.metiersquebec.org/portraits/physique1.html [Dernière consultation : 15 septembre 2014].

² Source : <http://kronostio2.com/en/manufacturing-facilities/varennes-canada> [Dernière consultation : 15 septembre 2014].

Il est donc capital de prévenir le développement de maladies et d'accidents du travail reliés aux NP qui ont quasiment tous, à la base, une composante inflammatoire. Des données scientifiques s'accumulent et démontrent les effets toxiques et indésirables de certaines NP dont nous connaissons mal la toxicité et l'efficacité des moyens pour les contenir [1, 2].

1.2 État des connaissances

C'est à cause de l'engouement fulgurant des secteurs industriels et du monde de la recherche pour les nanotechnologies et de l'utilisation croissante de nanomatériaux ou de NP qu'est née la nanotoxicologie [1-4]. Cette discipline a pour principal objectif d'évaluer les effets toxiques potentiels des NP sur la santé des vivants. À l'heure actuelle, la plupart des études publiées dans la littérature scientifique ciblent principalement l'exposition des poumons ou portent sur la relation des NP avec:

- i) une toxicité pulmonaire en utilisant des cellules cancéreuses immortalisées, comme des cellules A549 [5] ou
- ii) une inflammation chronique pulmonaire avec des modèles de rongeurs chez qui, par exemple, les NP sont administrées par inhalation, par voie intratrachéale, ou autres, et dont les cellules qui infiltrent les voies respiratoires sont dénombrées dans les lavages broncho-alvéolaires [6-10].

Dans la plupart des cas, et de façon très logique, les neutrophiles sont parmi les cellules les plus communément observées. En effet, les neutrophiles sont les cellules chefs d'orchestre de l'inflammation. Elles sont les premières à coloniser un site inflammatoire [11, 12], causant une inflammation aiguë. Ces cellules produisent des facteurs solubles, les chimiokines, qui vont attirer d'autres neutrophiles qui, collectivement, favoriseront une production accrue d'autres facteurs qui auront un pouvoir d'attraction sur les monocytes-macrophages et sur les lymphocytes. Cette dernière étape représente l'inflammation chronique où la participation de plusieurs cellules est nécessaire. Il devient alors important d'étudier la réponse inflammatoire en amont de l'inflammation chronique afin de prédire le développement de cette réponse inflammatoire chronique.

À ce stade, il est important de mentionner que les neutrophiles sont des cellules matures, qui vivent environ 24 h, qui ne se divisent plus et qui se dirigent spontanément en apoptose (mort propre et programmée) après plusieurs heures. Présentement, la majorité des études *in vitro* effectuées en laboratoire incubent des cellules de toute origine avec des concentrations croissantes d'une NP donnée et en étudient les effets cytotoxiques incluant principalement leur capacité à diminuer la prolifération cellulaire et/ou à induire la mort par apoptose [13-17]. Curieusement, dans bien des cas, aucune mention n'est faite concernant l'effet de la NP étudiée sur la mort par nécrose, un état où les cellules ne sont absolument plus fonctionnelles. Bien que plusieurs types d'études se penchent sur la caractérisation des NP, très peu d'entre elles se concentrent sur leurs activités biologiques [18-21] et sur l'élucidation du mode d'action des NP. De plus, quoiqu'une NP donnée soit entièrement caractérisée à l'aide de nos technologies modernes, cette NP se retrouve transformée *in vivo* alors qu'elle pourra réagir avec plusieurs types de molécule; c'est le concept de la couronne. En effet, il est connu que plusieurs protéines interagissent avec les NP, modifiant ainsi leurs propriétés physicochimiques et biologiques [22, 23].

Également, la plupart des études *in vitro* publiées dans la littérature scientifique testent les effets cytotoxiques de NP variées sur différentes lignées cellulaires immortalisées d'origine animale, pour la plupart, ou humaine. Cependant, très peu d'études ont eu recours à des cellules humaines primaires. Plus spécifiquement, il est curieux de constater qu'aucune étude approfondie ne traite du rôle des NP chez les neutrophiles humains, sachant leur importance dans l'inflammation, un des effets toxiques des NP les plus documentés dans la littérature scientifique [3, 24-28].

Pour ce qui est du volet *in vivo*, la majeure partie des études, à ce jour, est axée sur le domaine de l'inflammation pulmonaire avec divers modèles. Par exemple, il a été démontré, chez la souris, que des NP de silice activent les macrophages péritonéaux ainsi qu'une production de certaines cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF- α [29]. Lu et coll. (2009) ont récemment démontré que parmi une liste de treize NP, seulement l'alumina-2 et l'oxyde de nickel causaient une inflammation pulmonaire significative à la suite d'une instillation dans les poumons [30]. Fait intéressant, cette inflammation était mesurée par le dénombrement des neutrophiles se retrouvant dans les lavages broncho-alvéolaires. Il appert donc que certaines NP ont des effets pro-inflammatoires. Toutefois, ceux-ci demeurent très largement inconnus.

La présente étude vise donc à remédier à cette situation en étudiant à la fois les interactions directes entre les NP et les neutrophiles humains, *in vitro*, et à déterminer le potentiel pro-inflammatoire des NP, *in vivo*, en étudiant principalement une infiltration neutrophilique.

2. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Pour toutes les raisons mentionnées précédemment et devant le manque de données dans la littérature concernant les effets des NP sur les neutrophiles humains et sur l'établissement, *in vivo*, d'une réponse inflammatoire, l'hypothèse et les objectifs du présent projet sont:

2.1 Hypothèse

Les NP possèdent un potentiel pro-inflammatoire, à divers degrés, résultant de:

- 1) La modulation à la hausse ou à la baisse de plusieurs fonctions des neutrophiles humains (expérimentations *in vitro*);
- 2) L'infiltration neutrophilique lors de l'inflammation aiguë et une production accrue d'agents pro-inflammatoires (expérimentations *in vivo*).

2.2 Objectifs

Le présent projet est divisé en deux grands volets, comportant chacun des objectifs spécifiques visant, dans leur ensemble, à mener vers une classification des NP selon leur degré pro-inflammatoire.

Volet I - Procédures *in vitro*

- Déterminer les effets cytotoxiques des NP chez les neutrophiles humains;
- Évaluer les effets modulateurs des NP sur les fonctions des neutrophiles reliées à l'inflammation et déterminer leurs modes d'action.

Volet II - Procédures *in vivo*

- Évaluer la capacité des NP à induire une infiltration neutrophilique *in vivo*;
- Quantifier et identifier les sous-populations leucocytaires attirées par le foyer inflammatoire.

3. MÉTHODOLOGIE

Comme mentionné précédemment, la méthode générale d'évaluation du potentiel pro-inflammatoire d'une NP donnée fait appel à des volets *in vitro* et *in vivo*. Une description succincte des différentes procédures utilisées est présentée ci-dessous et illustrée à la figure 1.

3.1 Sélection et caractérisation des nanoparticules

Pour le présent projet, une attention particulière a été portée aux NP qui soulèvent un intérêt en matière de santé et de sécurité du travail. Les NP ont été sélectionnées parmi celles dont le potentiel d'utilisation était le plus important, non seulement au Québec, mais également à l'échelle mondiale. En effet, les NP étudiées ici sont parmi celles qui ont fait l'objet du plus grand nombre de publications scientifiques, comme le dioxyde de titane (TiO₂), divers oxydes métalliques, l'argent (Ag), etc. [4, 31, 32, 35-37]. Une liste détaillée de toutes les NP qui ont été étudiées au cours de ce projet se retrouve au tableau 1. Malgré que plusieurs de ces substances ont déjà fait l'objet d'études portant sur leurs différents effets sur la santé, leurs mécanismes d'action sont encore largement inconnus [3, 33, 34].

Tableau 1 - NP étudiées dans ce projet.

	NP	Fournisseur
1	AgNP ₂	US Research Nanomaterials, Inc.
2	AgNP ₁₅	US Research Nanomaterials, Inc.
3	AgNP ₂₀	Ted Pella, Inc.
4	AgNP ₇₀	Ted Pella, Inc.
5	Al ₂ O ₃	Nanostructured & Amorphous Materials, Inc.
6	AuNP ₂₀	Ted Pella, Inc.
7	AuNP ₃₀	Ted Pella, Inc.
8	AuNP ₇₀	Ted Pella, Inc.
9	AuNP ⁺ *	Sciventions, Inc.
10	AuNP ⁻ *	Sciventions, Inc.
11	C ₆₀ (OH) _n	BuckyUSA
12	CeO ₂	Vive Nano, Inc.
13	Dendrimères G0	Sigma-Aldrich®
14	Dendrimères G1	Sigma-Aldrich®
15	Dendrimères G2	Sigma-Aldrich®
16	Dendrimères G3	Sigma-Aldrich®
17	Diamants de synthèse	Nanostructured & Amorphous Materials, Inc.
18	Fe ₃ O ₄	Sciventions, Inc.
19	NTC	Sigma-Aldrich®
20	Palladium	Sciventions, Inc.
21	Points quantiques	Thermo Fisher Scientific, Inc.
22	SiO ₂	Nanostructured & Amorphous Materials, Inc.
23	TiO ₂	Vive Nano, Inc.
24	ZnO	Vive Nano, Inc.

*chargé positivement ou négativement

Avant d'effectuer les expériences permettant de répondre aux objectifs de cette étude, chacune des NP à l'étude a d'abord été caractérisée par diffusion dynamique de la lumière à l'aide d'un appareil de type Nanosizer (Malvern) afin d'obtenir la distribution de la taille ainsi que le potentiel zêta, et ce, en tenant compte du milieu dans lequel les NP étaient incubées. A titre d'exemple, le tableau 2, dans la section des résultats, présente les différentes tailles obtenues pour la NP de ZnO dans trois milieux comportant des compositions différentes. Dans certains cas, les NP ont été caractérisées par microscopie électronique en transmission par le service de microscopie électronique de l'Institut national de recherche scientifique (INRS) - Institut Armand-Frappier. Cette mesure a permis de confirmer la taille déterminée initialement à l'aide du Nanosizer ainsi que d'observer la présence ou l'absence d'agrégats.

De plus, étant donné notre expertise dans le domaine de l'inflammation, les solutions mères des NP ont également été caractérisées en dosant la concentration des endotoxines à l'aide d'un kit commercialement disponible. Possiblement présentes dans les formulations des compagnies, ces endotoxines peuvent contaminer la solution mère et être très pro-inflammatoires, faussant ainsi l'interprétation des résultats. Nous avons également testé une contamination potentielle des NP en culture sur gélose avec le milieu LB (pour *Lysogeny Broth*), un milieu de culture nutritif, servant initialement à la culture bactérienne. Avant le début des expérimentations sur une NP donnée, nous nous sommes assurés que ces deux tests préliminaires (présence d'endotoxines et culture sur gélose) étaient négatifs afin que l'effet observé lors de notre expérimentation ne soit attribuable qu'à la NP testée et non à une forme de contamination externe.

3.2 Volet I - Procédures *in vitro*

Pour ce volet, les effets de chaque NP furent directement testés sur plusieurs fonctions cellulaires des neutrophiles humains. Pour ce faire, des neutrophiles extraits du sang de donneurs sains ont été fraîchement isolés puis traités avec une NP donnée. Les donneurs étaient recrutés par voie électronique par le biais d'un appel à tous envoyé aux employés et étudiants du centre de recherche. Chaque donneur devait fournir son consentement éclairé, en suivant la démarche autorisée par le comité d'éthique de la recherche de l'INRS-Institut Armand-Frappier. Hormis la nécessité d'être majeur, le seul critère de sélection des donneurs était que leur état de santé soit jugé acceptable selon l'évaluation faite par l'infirmière licenciée effectuant la prise de sang. Les donneurs faisaient partie d'un groupe d'hommes et de femmes adultes, âgés entre 20 et 65 ans, fumeurs ou non-fumeurs. Les donneurs de sang agissant sur une base volontaire et identifiés selon un code connu uniquement de l'infirmière, il n'est pas possible d'effectuer de corrélation entre des donneurs spécifiques et les résultats obtenus. Ainsi, un minimum de trois donneurs différents a été utilisé pour chaque type d'expérience *in vitro* et des tests statistiques ont été effectués afin d'évaluer si les résultats étaient significatifs ou non. Il est important de noter qu'aucun des prélèvements sanguins n'a été effectué chez le personnel manipulant des NP (chercheurs, étudiants, personnel technique) car ces personnes représentent un groupe cible important dont nous réservons la participation à un projet ultérieur.

Les neutrophiles humains ont été fraîchement isolés à partir du sang des donneurs. Ces neutrophiles ont été incubés avec une NP donnée et plusieurs fonctions importantes de ces cellules en relation avec l'inflammation ont été étudiées. Au préalable, nous avons vérifié si

chacune des NP testées causait la nécrose cellulaire par cytologie, selon la méthode d'exclusion au bleu de trypan. Les tests fonctionnels suivants ont été effectués avec la plupart des NP:

i) Changements de morphologie cellulaire

Les neutrophiles humains ont été incubés (10×10^6 cellules/mL) dans du RPMI 1640 contenant 10 % de sérum autologue pendant 24 heures en présence du témoin négatif (*Hank's balanced salt solution* [HBSS]), du témoin positif provoquant un retard d'apoptose (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor* [GM-CSF]), de la *Viscum album agglutinine-1* (VA), un puissant inducteur d'apoptose ou en présence des NP. L'apoptose des cellules a été évaluée par cytologie à l'aide de la microscopie optique par l'apparition d'un noyau pycnotique caractéristique par opposition au noyau polylobé en condition non apoptotique.

ii) Évaluation du pourcentage d'apoptose par modulation de l'expression des phosphatidylsérines (PS) et du récepteur CD16

Les neutrophiles humains ont été incubés pendant 24 heures en présence de HBSS, de GM-CSF, de la VA ou des NP. Par la suite, ils ont été incubés avec l'annexine-V ou l'anticorps CD16 pendant 30 minutes à 4 °C. L'apoptose a été évaluée par l'apparition à la surface cellulaire des PS traduite par une augmentation de la liaison de l'annexine-V marquée à un fluorochrome. La diminution en fluorescence du récepteur CD16, couplé également à un fluorochrome, témoigne d'une augmentation d'apoptose. Dans les deux cas, l'intensité de la fluorescence a été mesurée par cytométrie en flux.

iii) Production de produits dérivés de l'oxygène en mesurant l'oxydation de la sonde CM-H₂DCFDA (5- [et-6]-chlorométhyle-2',7'-dichlorodihydrofluorescéine diacétate)

Les neutrophiles humains ont été incubés en présence du HBSS contenant 10 μM de CM-H₂DCFDA pendant 15 minutes à 37 °C. Les cellules ont été lavées puis incubées en présence de HBSS, du témoin positif phorbol myristate acetate (PMA) ou des NP pendant 15, 30 et 60 minutes. L'oxydation de la sonde a été quantifiée par cytométrie en flux.

iv) Dégranulation en mesurant l'expression de molécules de surface (CD63, CD66b et CD35) à l'aide d'anticorps spécifiques pour chacun des marqueurs de granules ainsi que la présence de myéloperoxydase (MPO), de matrice métalloprotéinase (MMP)-9 et d'albumine dans le surnageant

Les neutrophiles humains ont été incubés pendant 30 minutes en présence de HBSS, du témoin positif formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine (fMLP), provoquant la dégranulation, ou des NP. Suivant cette activation et afin de prévenir les liaisons non spécifiques, les cellules ont été incubées dans du PBS-20% sérum autologue pendant 30 minutes sur glace. Par la suite, elles ont été incubées avec les anticorps CD63, CD66b et CD35, puis le fluorochrome. L'analyse de l'expression de ces récepteurs fut évaluée par cytométrie en flux. Parallèlement, après leur stimulation avec les agents pendant 30 minutes, les cellules ont été centrifugées puis le surnageant a été conservé. Les protéines ont été séparées selon leur poids moléculaire dans un

gel de polyacrylamide. L'expression de MPO, de MMP-9 ou d'albumine a été détectée par immunobuvardage de type western avec des anticorps spécifiques.

v) Zymographie (activité enzymatique de la gélatinase)

Les neutrophiles humains ont été incubés pendant 30 minutes en présence de HBSS ou des NP. Les cellules ont été centrifugées et les surnageants ont été conservés. Un aliquot de 30 μ L (surnageant de 50,000 cellules) a été mélangé à 10 μ L de tampon non dénaturant et les protéines ont été séparées par électrophorèse sur un gel d'acrylamide contenant 0,2 % de gélatine. Les gels ont été lavés puis incubés toute la nuit dans un tampon de digestion. Ils ont, par la suite, été colorés au bleu de Coomassie 0,1 %. L'activité gélatinase a été observée par la présence de zones blanches correspondant à la dégradation de la gélatine.

vi) Phagocytose déterminée en mesurant la quantité de globules rouges de mouton opsonisés et ingérés par les neutrophiles

Des globules rouges de moutons ont été opsonisés avec une dilution 1:2000 d'IgG de lapin anti-globules rouges pendant 45 minutes à 37 °C. Les neutrophiles humains ont été incubés avec les agents (HBSS, GM-CSF ou NP) pendant 30 minutes à 37 °C. Les cellules ont été lavées puis incubées avec les globules rouges de moutons opsonisés (ratio 1:5) pendant 15 minutes à 37 °C. Les cellules ont été centrifugées pendant 10 minutes. Un choc osmotique a été appliqué au culot afin de faire éclater les globules rouges n'ayant pas été phagocytés par les cellules. Les cellules ont été lavées puis remises en suspension afin d'être observées au microscope optique.

3.3 Volet II - Procédures *in vivo*

Pour ce volet, le modèle de la formation d'une poche d'air chez la souris a été employé. Brièvement, de l'air stérile (3 cc) a été administré aux jours 0 et 3 de façon sous-cutanée au niveau dorsal afin de créer une poche dans laquelle une NP donnée, son diluant seul (HBSS) ou le témoin positif (lipopolysaccharides [LPS]) a été administré au jour 6 pendant 2, 3, 6 ou 9h, à des concentrations de 10, 50, 100, 200 ou 500 μ g/mL (choix basés en grande partie sur les résultats *in vitro*). Les exsudats (cellules colonisant la poche d'air) ont été récupérés avec 5 mL de HBSS-EDTA. La quantité de leucocytes totaux a été évaluée par le dénombrement cellulaire effectué à l'hématimètre. Les populations cellulaires présentes dans les exsudats ont été identifiées par microscopie optique en observant plus de 300 cellules par souris. Un pourcentage de neutrophiles colonisant chaque poche d'air a ainsi été estimé puis comparé avec le HBSS. La quantité totale de neutrophiles présents dans la poche d'air a été calculée à partir de ces deux observations.

Il est à noter que le modèle de formation d'une poche d'air murine est un excellent modèle pour étudier une réponse inflammatoire *in vivo*. Contrairement au modèle d'inflammation pulmonaire fréquemment utilisé dans la littérature, qui consiste par exemple en une instillation d'un agent par la trachée, on recourt au modèle de la poche d'air pour comprendre le processus d'inflammation dans son ensemble, et non simplement relié ou associé à une inflammation

pulmonaire qui est particulière. Récemment, le modèle de la poche d'air a été reconnu par un regroupement de plusieurs chercheurs comme étant un excellent modèle pour évaluer la toxicité potentielle des NP [2]. Les auteurs spécifient même que ce modèle devrait faire partie d'une approche standard pour évaluer la toxicité potentielle des NP.

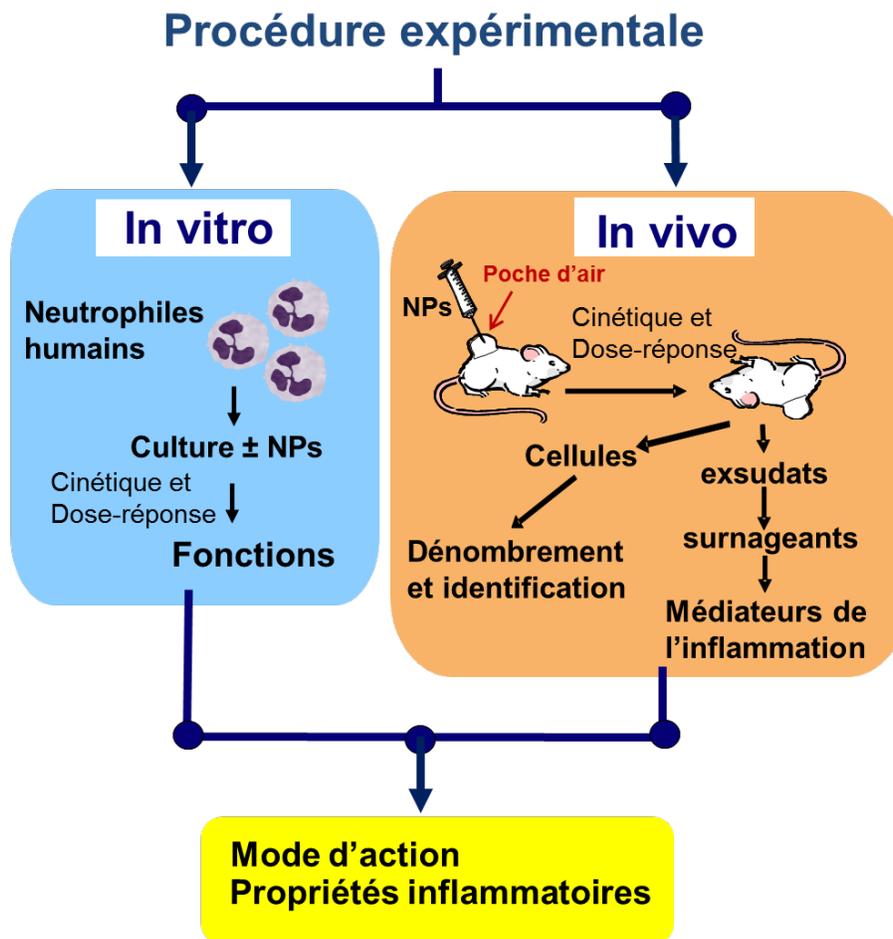


Figure 1 – Schéma résumant les deux approches expérimentales ayant servi à évaluer le potentiel pro-inflammatoire des NP.

4. RÉSULTATS

4.1 Volet I – *In vitro*

Le tableau 2 démontre une caractérisation typique par la méthode de la diffusion dynamique de la lumière effectuée sur une NP sélectionnée. Puisque les effets des NP sur les neutrophiles sont observés dans des milieux différents (en fonction du type d'expérience, *in vitro* ou *in vivo*), il est important d'effectuer cette caractérisation avant l'expérimentation et ce, pour chaque milieu de culture utilisé. Ceci permet de pouvoir dresser un profil des différentes tailles et de la distribution des NP présentes dans le milieu, pouvant ainsi expliquer les résultats divergents.

Tableau 2 - Influence des conditions expérimentales sur la taille et le potentiel zêta des NP de ZnO^a.

Milieu	RPMI-1640		RPMI-1640 + 10 % sérum		HBSS	
T (°C)	22	37	22	37	22	37
Diamètre ^b (nm)	7,2 ± 0,7 (58,0 ± 5,8)	6,7 ± 0,6 (52,7 ± 4,7)	271,3 ± 220 (49,0 ± 2,0)	596 ± 83,6 (48,4 ± 3,7)	57,2 ± 78,2 (59,6 ± 18,9)	6,7 ± 0,7 (54,3 ± 7,0)
	76,0 ± 17,3 (26,1 ± 2,6)	63,4 ± 10,4 (33,1 ± 2,7)	171,8 ± 247 (41,2 ± 5,8)	31,1 ± 3,5 (38,4 ± 7,4)	2,9 ± 1,3 (30,0 ± 3,1)	61,6 ± 14,0 (35,0 ± 4,4)
	0,8 ± 0,5 (13,3 ± 4,3)	1,8 ± 1,2 (14,3 ± 2,1)	858,2 ± 148 (7,3 ± 5,3)	6,6 ± 3,2 (9,5 ± 5,7)	4,8 ± 8,4 (8,6 ± 14,8)	1,2 ± 0,8 (10,8 ± 2,9)
Potentiel zêta (mV)	-8,31 ± 0,8	-6,1 ± 1,4	-9,5 ± 0,4	-9,5 ± 5,7	-8,5 ± 1,2	-6,9 ± 0,8

^a Les nombres en caractères gras représentent la moyenne de la taille ± écart-type (n=3) alors que ceux entre parenthèses représentent la proportion (%) des NP avec le diamètre correspondant.

^b Les NP peuvent se présenter sous plusieurs diamètres différents dans un même milieu.

T = température

Après avoir caractérisé chacune des NP par diffusion dynamique de la lumière et s'être assuré que ces dernières ne sont pas contaminées, des tests de viabilité cellulaire ont été effectués afin de déterminer les concentrations idéales à utiliser pour étudier les fonctions cellulaires des neutrophiles. Les concentrations de NP utilisées étaient normalement comprises entre 0 et 500 µg/mL. En général, moins de 5 à 7 % de nécrose a été observée pour toutes les NP testées, et ce, uniquement aux plus fortes concentrations (> 200 µg/mL) pour une période de traitement de 24 h. Pour des fins de comparaison et de standardisation, nous avons effectué tous nos tests avec des concentrations de 100 µg/mL, parfois en incluant en parallèle des concentrations moindres ou plus élevées.

L'ensemble des résultats obtenus pour le volet I, portant sur les interactions NP-neutrophiles humains *in vitro*, sont synthétisés au tableau 3. Certains types d'expériences cités dans ce tableau n'ont pas été réalisés pour chacune des NP. Seuls les résultats des tests effectués apparaissent au tableau. Bien que les NP suivantes, NTC, diamants de synthèse, SiO₂, Al₂O₃, C₆₀(OH) et AuNP+, furent évaluées au regard de leur morphologie, leur viabilité et l'apoptose des neutrophiles humains, aucune modulation n'a été observée. Ces résultats n'ont donc pas été incorporés dans le tableau afin d'éviter d'alourdir davantage celui-ci.

Tableau 3 - Synthèse des résultats portant sur les effets différentiels des NP sur la physiologie des neutrophiles humains.

NP ^a	Test effectué	Effet	Commentaire
AgNP ₂	Morphologie	Agglutination, taille augmente	Amas de cellules
	Viabilité/cytotoxicité	Aucun	
	Apoptose	Augmente	Effet pro-apoptotique
AgNP ₁₅	Morphologie	Agglutination, taille augmente	Amas de cellules
	Viabilité/cytotoxicité	Aucun	
	Apoptose	Augmente	Très rapide (en quelques heures)
AgNP ₂₀	Morphologie	Moins ronde, taille augmente	Témoigne d'une activation des neutrophiles. NP internalisées rapidement
	Viabilité/cytotoxicité	Nécrose (5-7 %)	
	Apoptose	Augmente	Effet pro-apoptotique
	Dégranulation ^b	Augmente	MMP-9, albumine
	ROS ^c	Augmente	Non significatif
AgNP ₇₀	Morphologie	Taille augmente	Quelques NP internalisées
	Viabilité/cytotoxicité	Aucun	
	Apoptose	Diminue	Effet anti-apoptotique
	Dégranulation	Aucun	Pas de MMP-9 ni albumine
	ROS	Aucun	
AuNP ₂₀	Morphologie	Aucun	
	Viabilité/cytotoxicité	Aucun	
	Apoptose	Augmente	Effet pro-apoptotique
AuNP ₇₀	Morphologie	Aucun	
	Viabilité/cytotoxicité	Aucun	
	Apoptose	Augmente	Effet pro-apoptotique
AuNP-	Morphologie	Aucun	
	Viabilité/cytotoxicité	Aucun	
	Apoptose	Augmente	Effet pro-apoptotique
CeO ₂	Morphologie	Aucun	
	Viabilité/cytotoxicité	Aucun	
	Apoptose	Diminue	Léger effet anti-apoptotique
	Dégranulation	Augmente	Augmente CD66b, CD63 MMP-9, gélatinases
	ROS	Augmente	
	Phagocytose	Augmente	Modérément
Dendrimères G0	Morphologie	Aucun	
	Viabilité/cytotoxicité	Nécrose (30 %)	
	Apoptose	Augmente	Effet pro-apoptotique
Dendrimères G1	Morphologie	Aucun	
	Viabilité/cytotoxicité	Nécrose (40 %)	
	Apoptose	Légère augmentation non significative	

NP ^a	Test effectué	Effet	Commentaire
Dendrimères G2	Morphologie	Aucun	
	Viabilité/cytotoxicité	Nécrose (45 %)	
	Apoptose	Augmente	Effet pro-apoptotique
Dendrimères G3	Morphologie	Aucun	
	Viabilité/cytotoxicité	Nécrose (45 %)	
	Apoptose	Augmente	Effet pro-apoptotique
Fe ₃ O ₄	Morphologie	Aucun	
	Viabilité/cytotoxicité	Aucun	
	Apoptose	Augmente	Effet pro-apoptotique
Palladium	Morphologie	Aucun	
	Viabilité/cytotoxicité	Aucun	
	Apoptose	Augmente	Effet pro-apoptotique
TiO ₂	Morphologie	Forme irrégulière	Témoigne d'une activation des neutrophiles
	Viabilité/cytotoxicité	Aucun	
	Apoptose	Diminue	Effet anti-apoptotique significatif
	Dégranulation	Augmente	Augmente CD66b, CD63, MMP-9, gélatinases
	ROS	Augmente	Effet inflammatoire possible
	Phagocytose	Augmente	
ZnO	Morphologie	Forme irrégulière	Témoigne d'une activation des neutrophiles
	Viabilité/cytotoxicité	Aucun	
	Apoptose	Diminue	Important effet anti-apoptotique
	Dégranulation	Augmente	Augmente CD66b, CD63, MMP-9, gélatinases
	ROS	Aucun	
	Phagocytose	Augmente	Modérément

^a Les NP ont toutes été testées à une concentration de 100 µg/mL.

^b La dégranulation a été évaluée de différentes façons: *i*) par l'expression de certains marqueurs des granules à la surface des neutrophiles (CD35, CD63 et CD66b); *ii*) par l'expression de certaines protéines libérées dans les surnageants (MPO, MMP-9, albumine); et *iii*) en étudiant l'activité enzymatique des gélatinases libérées des granules.

^c Dérivés réactifs de l'oxygène

Propriétés inflammatoires basées sur la libération d'agents pro-inflammatoires et/ou sur la capacité à retarder l'entrée des cellules en apoptose, ce qui favoriserait leur persistance et augmenterait le nombre total de neutrophiles pouvant causer de l'inflammation.

Propriétés anti-inflammatoires basées sur le fait que l'élimination des neutrophiles est souhaitée pour réguler le nombre relativement constant de neutrophiles en conditions normales, limitant des désordres inflammatoires.

Afin de démontrer l'ampleur de certaines données présentées au tableau 3, des résultats d'activation cellulaire par test de dégranulation (libération de protéines contenues dans les trois types de granule et activité enzymatique démontrée par zymographie) obtenus avec des neutrophiles humains traités pendant 30 minutes avec diverses NP sont présentés aux figures 2 et 3 [35].

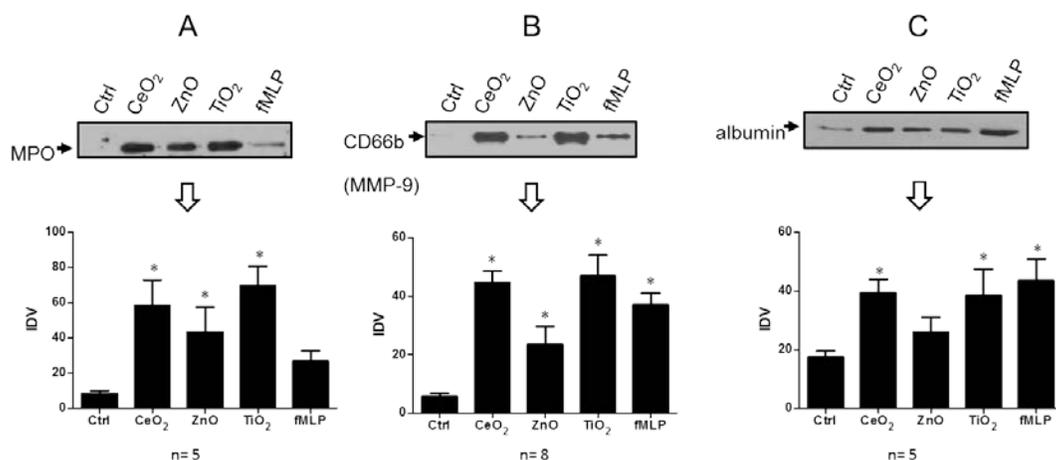


Figure 2 – Libération de la MPO, la MMP-9 et l'albumine par les neutrophiles humains après une exposition avec les NP de CeO₂, ZnO ou TiO₂. L'analyse de densitométrie a été réalisée sur les bandes obtenues et les résultats (moyenne \pm erreur-type, $n \geq 3$) sont exprimés en valeur de densité intégrée (*integrated density value* ou IDV). Ctrl: Témoin négatif (HBSS); fMLP: Témoin positif; * $p < 0,05$ par rapport à Ctrl.

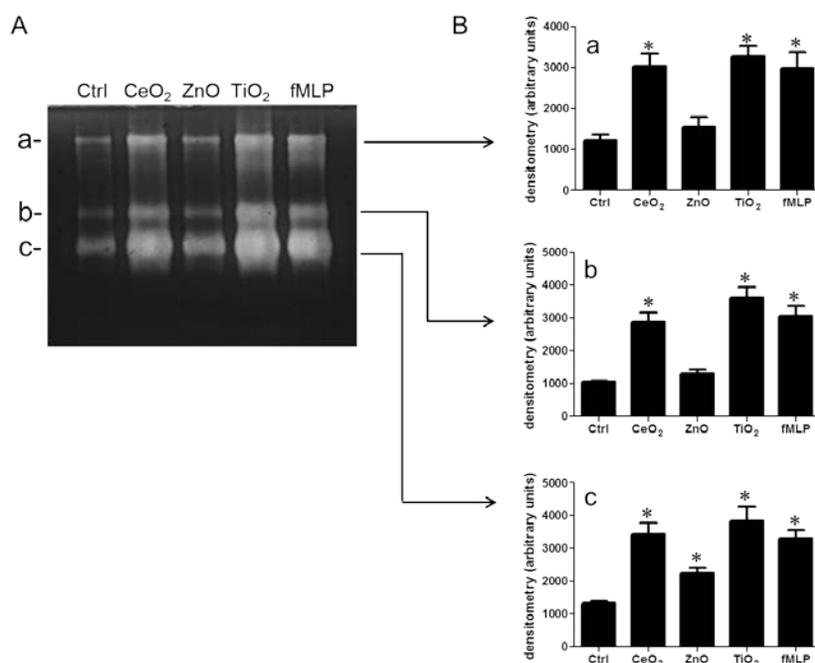


Figure 3 – Les NP de CeO₂, ZnO et TiO₂ augmentent l'activité gélatinase des neutrophiles humains mesurée par zymographie. L'analyse de densitométrie a été réalisée sur les zones blanches obtenues et les résultats (moyenne \pm erreur-type, $n=5$) sont exprimés en densité relative. Ctrl: Témoin négatif (HBSS); fMLP: Témoin positif; * $p < 0,05$ par rapport à Ctrl.

Les figures 4 et 5 présentent des effets inverses sur l'apoptose des neutrophiles en présence de deux NP différentes. Ainsi, l'AgNP₂₀ induit l'apoptose tandis que le ZnO la retarde par rapport au niveau normal de base [36, 37].

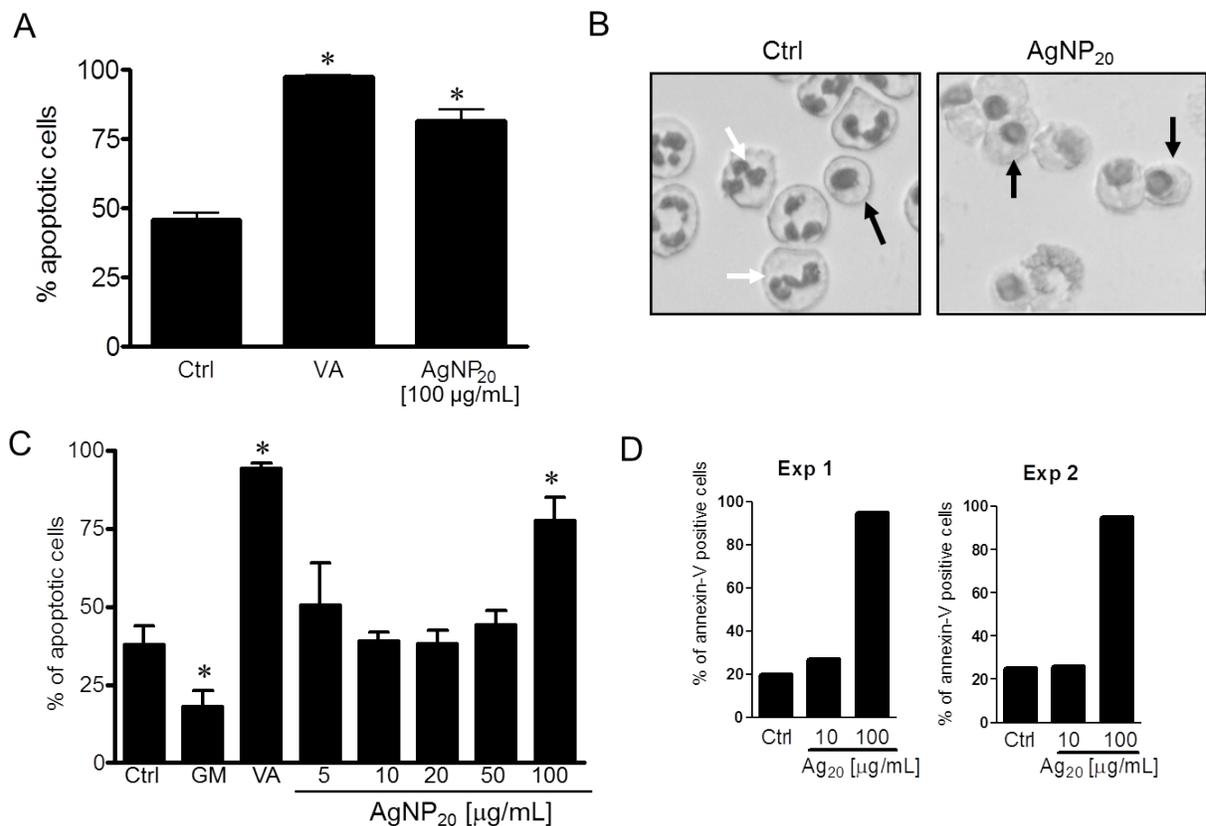


Figure 4 – Induction de l'apoptose des neutrophiles avec les NP d'Ag₂₀. Les neutrophiles humains ont été incubés pendant 24 heures en présence de 100 µg/mL (A et B) ou d'une concentration croissante (C et D) d'AgNP₂₀. L'apoptose des cellules a été évaluée par cytologie à l'aide de la microscopie optique (A, B et C) par l'apparition d'un noyau pycnotique caractéristique (flèches noires) par opposition au noyau polylobé en condition non apoptotique (flèches blanches). En D, l'apoptose a été évaluée par l'annexine-V (moyenne ± erreur-type, n=4). Ctrl: Témoin négatif (HBSS); GM: GM-CSF (65 ng/mL); VA: *Viscum album* agglutinine-1 (1 µg/mL); * p < 0,05 par rapport à Ctrl.

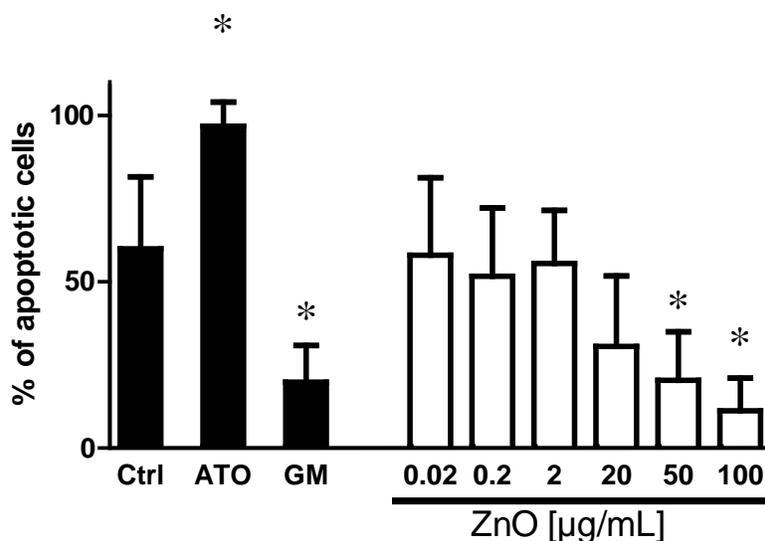


Figure 5 – Les NP de ZnO retardent l'apoptose des neutrophiles. Les neutrophiles humains ont été incubés pendant 24 heures en présence de doses croissantes de NP de ZnO et l'apoptose des cellules a été évaluée (moyenne \pm erreur-type, $n \geq 3$) par cytologie à l'aide de la microscopie optique. Ctrl: Témoin négatif (HBSS); GM: GM-CSF (65 ng/mL); ATO: trioxyde d'arsenic, puissant inducteur d'apoptose (5 μ M); * $p < 0,05$ par rapport à Ctrl.

4.2 Volet II – *In vivo*

Pour le volet *in vivo*, nous avons utilisé le modèle de la poche d'air murine, tel que présenté précédemment dans la méthodologie. Grâce au dénombrement et à l'identification des cellules présentes dans l'exsudat, nous étions en mesure d'évaluer le potentiel inflammatoire de ces dernières. L'inflammation étant un phénomène plutôt complexe, nous avons décidé de tester différents temps (2 h, 3 h, 6 h et 9 h). Les résultats obtenus pour ce volet II sont synthétisés au tableau 4. Les statistiques du tableau ont été produites en utilisant l'analyse de la variance (ANOVA à un facteur) suivie d'un test de comparaisons multiples de Dunnett. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ par rapport au témoin HBSS.

Tableau 4 – Effets des NP sur l'infiltration neutrophilique *in vivo*.

Temps	Agent	Nbre de souris (n)	Conc. de l'agent (µg/mL)	Infiltration leucocytaire par poche d'air		
				Leucocytes totaux (x 10 ⁶)	% de neutrophiles	Neutrophiles (x 10 ⁶)
2h	HBSS	(3)	-	0,87 ± 0,1	44,9 ± 11,0	0,41 ± 0,14
	LPS	(2)	1	2,0 ± 0,2*	75,7 ± 2,6 *	1,51 ± 0,09 ***
	AuNP-	(4)	500	1,2 ± 0,1	37,9 ± 5,0	0,46 ± 0,11
	Fe ₃ O ₄	(4)	500	2,1 ± 0,2 **	49,3 ± 4,7	1,0 ± 0,05 **
3h	HBSS	(10)	-	0,6 ± 0,1	47,1 ± 2,2	0,29 ± 0,07
	LPS	(4)	1	4,9 ± 0,7 ***	87,3 ± 2,2 ***	4,36 ± 0,65 ***
	AgNP ₂₀	(3)	10	1,0 ± 0,19	48,9 ± 2,4	0,49 ± 0,1
		(3)	50	0,88 ± 0,13	49,7 ± 10,4	0,47 ± 0,14
		(3)	100	1,2 ± 0,3	48,7 ± 1,9	0,6 ± 0,17
	C ₆₀ (OH) _n	(6)	100	1,0 ± 0,2	66,0 ± 2,4	0,68 ± 0,15
	Dendrimères G0	(5)	100	0,69 ± 0,1	47,0 ± 2,3	0,38 ± 0,04
		(5)	500	1,6 ± 0,2	57,6 ± 2,8	0,89 ± 0,13
	Dendrimères G1	(5)	100	1,7 ± 0,8	52,8 ± 4,9	1,4 ± 0,78
		(4)	500	2,2 ± 0,9 *	60,7 ± 2,3 *	1,47 ± 0,86
	Dendrimères G2	(6)	100	1,2 ± 0,2	64,0 ± 3,4 ***	0,82 ± 0,17
		(6)	500	1,1 ± 0,18	65,5 ± 1,1 ***	0,73 ± 0,12
	Dendrimères G3	(5)	100	0,88 ± 0,19	62,6 ± 2,5 **	0,61 ± 0,17
		(6)	500	2,01 ± 0,57 **	69,5 ± 1,8 ***	1,45 ± 0,45 *
6h	HBSS	(9)	-	0,74 ± 0,16	43,2 ± 2,7	0,33 ± 0,07
	LPS	(7)	1	9,98 ± 1,9 ***	80,2 ± 3,1 ***	8,06 ± 1,64 ***
	Al ₂ O ₃	(6)	50	0,63 ± 0,28	42,5 ± 5,3	0,3 ± 0,16
		(6)	100	0,88 ± 0,25	42,4 ± 2,8	0,4 ± 0,13
		(6)	200	0,72 ± 0,19	48,4 ± 6,6	0,38 ± 0,15
	AgNP ₂₀	(3)	10	1,14 ± 0,73	76,3 ± 0,7 ***	0,86 ± 0,56
		(4)	100	2,98 ± 0,26 *	72,5 ± 3,5 ***	2,18 ± 0,27 *
	AuNP ₃₀	(6)	100	1,42 ± 0,32	45,0 ± 6,7	0,73 ± 0,24
		(5)	250	2,17 ± 0,70	44,1 ± 6,4	1,05 ± 0,36
	AuNP-	(5)	100	1,65 ± 0,37	56,8 ± 1,1 **	0,93 ± 0,2
		(5)	500	3,47 ± 0,99 **	71,0 ± 2,2 ***	2,52 ± 0,84 **
	C ₆₀ (OH) _n	(5)	100	0,67 ± 0,24	55,2 ± 4,2	0,36 ± 0,14
	NTC-Sigma	(5)	50	0,99 ± 0,26	35,1 ± 5,0	0,39 ± 0,13
		(6)	100	1,05 ± 0,28	45,0 ± 4,1	0,50 ± 0,18
		(6)	200	1,05 ± 0,23	55,7 ± 3,7	0,59 ± 0,13
		(6)	200	1,05 ± 0,23	55,7 ± 3,7	0,59 ± 0,13
	NP de diamant	(5)	50	1,15 ± 0,44	51,2 ± 8,0	0,79 ± 0,34
		(6)	100	1,70 ± 0,75	50,0 ± 7,1	0,93 ± 0,41
		(6)	200	1,48 ± 0,82	58,8 ± 3,3	0,98 ± 0,58
	Dendrimères G0	(10)	100	0,83 ± 0,22	55,5 ± 1,8	0,55 ± 0,17
		(10)	500	0,95 ± 0,19	64,3 ± 3,0	0,58 ± 0,13
Dendrimères G1	(8)	100	1,08 ± 0,14	53,5 ± 2,5	0,57 ± 0,07	
	(8)	500	1,56 ± 0,24	58,9 ± 2,3	0,95 ± 0,17	

Temps	Agent	Nbre de souris (n)	Conc. de l'agent ($\mu\text{g/mL}$)	Infiltration leucocytaire par poche d'air		
				Leucocytes totaux ($\times 10^6$)	% neutrophiles	Neutrophiles ($\times 10^6$)
6h	Dendrimères G2	(7)	100	1,81 \pm 0,71	58,4 \pm 2,3	1,11 \pm 0,46
	Dendrimères G3	(6)	100	1,76 \pm 0,54	64,5 \pm 4,8 ***	1,23 \pm 0,48
	Points quantiques	(3)	50	0,95 \pm 0,76	45,2 \pm 12,0	0,65 \pm 0,52
		(5)	100	0,93 \pm 0,31	64,7 \pm 5,8 *	0,63 \pm 0,22
	SiO ₂	(6)	50	0,65 \pm 0,16	34,6 \pm 4,0	0,26 \pm 0,08
		(5)	100	1,74 \pm 0,31	47,7 \pm 3,6	0,86 \pm 0,22
		(6)	200	1,37 \pm 0,26	52,7 \pm 4,0	0,75 \pm 0,17
	TiO ₂	(4)	50	3,400 \pm 1,04	-	-
		(4)	100	5,30 \pm 0,350	91,0 \pm 6,0 ***	4,80 \pm 0,38 ***
(4)		200	10,40 \pm 1,080	-	-	
9h	HBSS	(4)	-	0,49 \pm 0,21	53,8 \pm 4,7	0,27 \pm 0,12
	C ₆₀ (OH) _n	(3)	100	0,39 \pm 0,08	49,0 \pm 2,5	0,17 \pm 0,03
	TiO ₂	(4)	50	3,350 \pm 1,035 *	88,5 \pm 2,9 ***	3,008 \pm 1,010
		(3)	100	5,333 \pm 0,353 ***	89,7 \pm 1,7 ***	4,78 \pm 0,306 *
		(4)	200	7,315 \pm 1,990 ***	91,0 \pm 0,8 ***	6,654 \pm 1,808 **
		(4)	500	3,900 \pm 1,073 *	93,3 \pm 1,2 ***	3,638 \pm 0,998

Propriétés inflammatoires basées sur une inflammation leucocytaire principalement neutrophilique.

Les figures 6 et 7 présentent des résultats de NP ayant significativement induit une infiltration leucocytaire dans notre modèle *in vivo*.

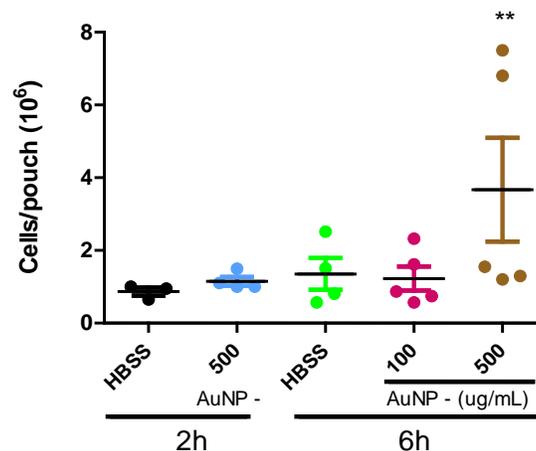


Figure 6 – Les AuNP- induisent un recrutement de leucocytes. La quantité de leucocytes totaux (moyenne \pm erreur-type) retrouvés dans la poche d'air a été évaluée par dénombrement cellulaire. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ par rapport au témoin HBSS.

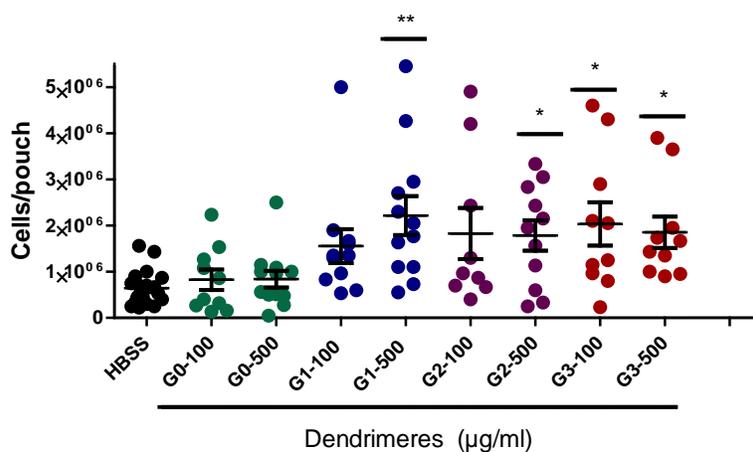


Figure 7 - Les dendrimères de plusieurs générations induisent le recrutement de leucocytes. La quantité de leucocytes totaux (moyenne ± erreur-type) a été évaluée par dénombrement cellulaire. * p < 0,05; ** p < 0,01 par rapport au témoin HBSS.

5. DISCUSSION

S'il existe un secteur de recherche très dynamique, c'est bien celui de la caractérisation des NP. En effet, à titre d'exemple, plus de 6500 publications scientifiques portant sur le sujet ont été repérées en utilisant l'outil de recherche PubMed avec les termes "*characterization, nanoparticle*". Bien que plusieurs approches et techniques scientifiques existent afin de caractériser les NP, il est curieux de constater que bien souvent celles-ci sont caractérisées dans de l'eau ultra-pure pour ensuite être utilisées en laboratoire dans toutes sortes de conditions expérimentales ayant recours à des milieux de culture de compositions très diversifiées et complexes. Cette constatation nous a permis de redéfinir notre caractérisation des NP au cours du projet. À titre d'exemple et afin d'appuyer notre observation, le tableau 2 nous apporte effectivement un élément de discussion majeur concernant l'importance de caractériser les NP sous différentes conditions. En effet, la caractérisation d'une NP par diffusion dynamique de la lumière nous permet de constater que les données varient par le simple fait de caractériser la NP dans des milieux de culture de compositions différentes, par exemple HBSS (milieu pauvre en nutriments) par opposition à RPMI-1640 (milieu riche). La même observation est également valable lorsqu'on ajoute du sérum humain dans les cultures, pratique courante en laboratoire afin de maintenir les cellules en vie. Étant donné l'existence du phénomène de couronne c.-à-d. l'interaction protéines-NP lorsque les NP se retrouvent par exemple en milieux de culture ou dans les fluides biologiques humains, nous proposons de les caractériser dans les conditions les plus similaires possibles à celles utilisées pour effectuer un test donné. Ceci inclus également la température puisque, par exemple, la distribution de la taille des NP de ZnO diffère lorsque les mesures sont prises à 22 °C, température de la pièce, par rapport à 37 °C, température à laquelle les NP sont incubées avec les neutrophiles (tableau 2). Cependant, alors que la distribution de la taille change en fonction de ces facteurs, les valeurs pour le potentiel zêta sont beaucoup moins affectées.

Il est intéressant de constater que pour le volet *in vitro*, certaines NP provoquent un changement de morphologie cellulaire chez les neutrophiles humains. En effet, il s'agit d'une façon rapide d'évaluer si une NP est un activateur des neutrophiles humains [38, 39]. Toutefois, l'inverse n'indique pas nécessairement qu'un agent n'est pas un activateur comme tel s'il n'induit pas de changements morphologiques apparents des neutrophiles. Il faut donc effectuer d'autres types d'expérience. Par exemple, les essais visant à mesurer les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) sont d'un grand intérêt, particulièrement dans la physiologie des neutrophiles qui sont connus pour être de grands producteurs de ROS. Bien qu'une augmentation des ROS est souvent associée avec une accélération du taux d'apoptose des neutrophiles [40, 41], il est curieux de constater que certaines NP comme le TiO₂ et CeO₂ augmentent la production de ROS, mais retardent l'entrée des cellules en apoptose à la même concentration de 100 µg/mL. Dans le même ordre d'idée, alors que le ZnO retarde l'apoptose, la production de ROS n'a pas été induite. Par contre, les AgNP₂₀ suivent la logique des autres agents connus alors qu'on constate une augmentation de la production de ROS et une accélération de l'apoptose. Finalement, il est intéressant de constater que les AgNP₇₀, tout comme le ZnO, n'augmentent pas la production de ROS et retarde l'entrée des neutrophiles en apoptose (tableau 3). Bien que les autres NP, nanotubes de carbone mono et multifeuillets, diamants, SiO₂, Al₂O₃, C₆₀(OH)_n et AuNP⁺, ne modulent pas l'apoptose, leur production de ROS n'a pas été étudiée. Ceci est également applicable aux NP qui augmentent le taux d'apoptose des neutrophiles (AgNP₂, AgNP₁₅, AuNP⁻, AuNP₂₀, AuNP₇₀, palladium et Fe₂O₃). Toutefois, même sans l'obtention des résultats en ce qui

concerne la production de ROS, nous pouvons d'ores et déjà conclure qu'il n'y a pas d'association entre la production de ROS et la modulation de l'apoptose chez les neutrophiles humains. Le portrait final est beaucoup plus compliqué révélant simultanément les modes d'action complexes et (probablement) différents d'une NP à l'autre.

Une autre fonction importante des neutrophiles est la dégranulation [39, 42]. Cette dernière doit être extrêmement bien contrôlée, car, en conditions normales, le but ultime est de favoriser la libération de médiateurs puissants à fort pouvoir dégradant pour, par exemple, combattre une infection bactérienne. Cependant, lors d'une dégranulation, principalement à la hausse, la libération des produits toxiques normalement séquestrés dans les granules des neutrophiles participe alors à l'amplification de la réponse inflammatoire plutôt qu'à sa résolution normale puisque ces produits se retrouvent dans le milieu extracellulaire et peuvent endommager les cellules avoisinantes. Dans la présente étude, bien que nous n'ayons pas étudié les effets de toutes les NP sur la dégranulation, nous avons démontré que certaines NP comme le TiO_2 , CeO_2 , ZnO et AgNP_{20} induisent cette fonction des neutrophiles humains alors que les AgNP_{70} ne modulent pas la réponse.

Tel que présenté au tableau 3, qui illustre la synthèse des résultats portant sur le volet *in vitro*, il est clair que les NP agissent différemment sur la physiologie cellulaire des neutrophiles humains. Par exemple, certaines NP comme celles à base d'argent (AgNP_{15} , AgNP_{20}) accélèrent le taux basal d'apoptose des neutrophiles, alors que d'autres comme le ZnO et le CeO_2 ont plutôt la capacité de retarder ce phénomène. De plus, il est important de noter que des NP dont seulement le diamètre initial diffère peuvent produire des effets complètement à l'opposé; c'est le cas des AgNP_{20} qui accélèrent l'entrée des cellules en apoptose alors que les AgNP_{70} la retardent.

Alors que nos travaux sont toujours en cours, nous pouvons nous avancer sur le fait que les NP de TiO_2 se sont avérées être en mesure d'activer la phagocytose des neutrophiles ainsi que celles de CeO_2 et de ZnO , mais à un moindre degré. Il est clair que les NP de TiO_2 possèdent un fort pouvoir activateur des neutrophiles.

Pour le volet *in vivo* du projet, le tableau 4 illustre l'ensemble des données obtenues à ce jour et dans lequel on y constate que le potentiel inflammatoire de plusieurs NP a été évalué. En général, nous testons toujours des agents potentiellement inflammatoires après une période de six heures suivant l'administration du produit à tester, car il s'agit du temps normalement optimal pour évaluer une infiltration leucocytaire dans le modèle de la poche d'air [4, 31, 43-47]. Par la suite, le nombre de cellules recrutées dans la poche retourne à la normale, car il y a résolution de l'inflammation. Toutefois, nous avons effectué certaines expériences pendant des périodes de temps plus courtes et avons remarqué que des NP peuvent induire rapidement, après 2 h, une infiltration neutrophilique. C'est le cas des NP de type Fe_3O_4 , mais pas des AuNP -. Après 3 h, nous avons également démontré que certaines NP, comme les dendrimères de génération 3 (G3), induisent aussi une infiltration neutrophilique. Toutefois, ceci ne semble pas être un phénomène généralisé puisque les NP de type dendrimère G0, G1 et G2, les NP $\text{C}_{60}(\text{OH})_n$ et AgNP_{20} n'agissent pas de la sorte, à tout le moins aux concentrations étudiées. Après 6 h, alors que nous nous attendions à voir une infiltration neutrophilique pour un maximum de NP différentes, nous n'avons observé un tel effet qu'avec les AuNP - et les AgNP_{20} (tableau 4) et les NP de TiO_2 préalablement observés [31]. Toutefois, nous avons récemment documenté que le $\text{C}_{60}(\text{OH})_n$ peut amplifier la réponse d'un autre agent pro-inflammatoire comme les LPS [4]. Ceci indique donc que même si une NP donnée ne semble pas affecter la réponse inflammatoire par elle-même, elle

peut participer au processus inflammatoire en amplifiant la réponse d'un autre agent. Ceci représente une nouvelle façon de voir le rôle potentiel que pourrait exercer une NP donnée et ouvre les portes à d'autres études similaires, un domaine de recherche qui sera quasi inépuisable.

6. CONCLUSION

Ce projet a permis de mieux comprendre le mode d'action de certaines NP en relation avec la physiologie des neutrophiles humains et la réponse inflammatoire qui est à la base d'un grand nombre de pathologies et de désordres (infections, fibrose kystique, maladie pulmonaire obstructive chronique, maladies auto-immunes, polyarthrite rhumatoïde, cancer). Sachant que certaines NP possèdent, à divers degrés, la capacité d'activer des neutrophiles d'individus sains, il est maintenant important d'étudier le comportement des neutrophiles des travailleurs potentiellement exposés aux NP. Bien que nous ayons initialement proposé de classifier les NP selon leur degré d'effet pro-inflammatoire, les résultats colligés ici nous permettent plutôt d'initier un tableau nuancé des effets variés des NP sur la physiologie des neutrophiles et sur leur capacité à induire une infiltration neutrophilique *in vivo*. Il est clair que les NP agissent de façons différentes. De plus, ce projet démontre que des NP dont seulement le diamètre diffère possèdent des effets biologiques très distincts et même opposés. Également, les résultats de la présente étude permettent de conclure que des NP d'une même catégorie possèdent des effets divers. Le mode d'action des NP est extrêmement complexe et diversifié, et peut varier selon la concentration étudiée. Des expériences additionnelles permettront de contribuer à l'avancement des connaissances en regard des effets des NP sur l'inflammation.

7. BIBLIOGRAPHIE

1. Dyugovskaya L, Berger S, Polyakov A, Lavie L. The development of giant phagocytes in long-term neutrophil cultures. *J Leukoc Biol.* 2014;27:27.
2. Vandooren J, Berghmans N, Dillen C, Van Aelst I, Ronsse I, Israel LL, et al. Intradermal air pouch leukocytosis as an in vivo test for nanoparticles. *Int J Nanomedicine.* 2013;8:4745-56.
3. Arora S, Rajwade JM, Paknikar KM. Nanotoxicology and in vitro studies: the need of the hour. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2012;258(2):151-65.
4. Goncalves DM, Girard D. Evidence that polyhydroxylated C60 fullerenes (fullerenols) amplify the effect of lipopolysaccharides to induce rapid leukocyte infiltration in vivo. *Chem Res Toxicol.* 2013;26(12):1884-92.
5. Araki H, Katayama N, Yamashita Y, Mano H, Fujieda A, Usui E, et al. Reprogramming of human postmitotic neutrophils into macrophages by growth factors. *Blood.* 2004;103(8):2973-80.
6. Cho WS, Duffin R, Poland CA, Howie SE, MacNee W, Bradley M, et al. Metal oxide nanoparticles induce unique inflammatory footprints in the lung: important implications for nanoparticle testing. *Environ Health Perspect.* 2010;118(12):1699-706.
7. Rossi EM, Pylkkänen L, Koivisto AJ, Vippola M, Jensen KA, Miettinen M, et al. Airway exposure to silica-coated TiO₂ nanoparticles induces pulmonary neutrophilia in mice. *Toxicol Sci.* 2010;113(2):422-33.
8. Rossi EM, Pylkkänen L, Koivisto AJ, Nykasenoja H, Wolff H, Savolainen K, et al. Inhalation exposure to nanosized and fine TiO₂ particles inhibits features of allergic asthma in a murine model. *Part Fibre Toxicol.* 2010;7:35.
9. Galli SJ, Borregaard N, Wynn TA. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat Immunol.* 2011;12(11):1035-44.
10. Vallières F, Girard D. IL-21 enhances phagocytosis in mononuclear phagocyte cells: identification of spleen tyrosine kinase as a novel molecular target of IL-21. *J Immunol.* 2013;190(6):2904-12.
11. Fox S, Leitch AE, Duffin R, Haslett C, Rossi AG. Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. *J Innate Immun.* 2010;2(3):216-27.
12. Tintinger GR, Steel HC, Theron AJ, Anderson R. Pharmacological control of neutrophil-mediated inflammation: strategies targeting calcium handling by activated polymorphonuclear leukocytes. *Drug Des Devel Ther.* 2009;2:95-104.
13. Chen D, Tang Q, Li X, Zhou X, Zang J, Xue WQ, et al. Biocompatibility of magnetic Fe₃O₄ nanoparticles and their cytotoxic effect on MCF-7 cells. *Int J Nanomedicine.* 2012;7:4973-82.
14. Hou Y, Lai M, Chen X, Li J, Hu Y, Luo Z, et al. Effects of mesoporous SiO₂, Fe₃O₄, and TiO₂ nanoparticles on the biological functions of endothelial cells in vitro. *J Biomed Mater Res A.* 2013;15(10):34839.

15. Gaiser BK, Hirn S, Kermanizadeh A, Kanase N, Fytianos K, Wenk A, et al. Effects of Silver Nanoparticles on the Liver and Hepatocytes in vitro. *Toxicol Sci.* 2012.
16. Sahu D, Kannan GM, Vijayaraghavan R, Anand T, Khanum F. Nanosized zinc oxide induces toxicity in human lung cells. *ISRN Toxicol.* 2013; Article ID 316075 (<http://dx.doi.org/10.1155/2013/316075>).
17. Wilhelmi V, Fischer U, Weighardt H, Schulze-Osthoff K, Nickel C, Stahlmecke B, et al. Zinc oxide nanoparticles induce necrosis and apoptosis in macrophages in a p47phox- and Nrf2-independent manner. *PLoS One.* 2013;8(6).
18. Advani P, Moreno-Aspitia A. Current strategies for the prevention of breast cancer: *Breast Cancer* (Dove Med Press). 2014 May 2;6:59-71. eCollection 2014.
19. Blanco E, Ferrari M. Emerging nanotherapeutic strategies in breast cancer. *Breast.* 2014;23(1):10-8.
20. Khan KH, Blanco-Codesido M, Molife LR. Cancer therapeutics: Targeting the apoptotic pathway: *Crit Rev Oncol Hematol.* 2014 Jun;90(3):200-219. doi: 10.1016/j.critrevonc.2013.12.012. Epub 2013 Dec 18.
21. Sano R, Reed JC. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim Biophys Acta.* 2013;12(70):10.
22. Yoshida H. ER stress and diseases. *Febs J.* 2007;274(3):630-58.
23. Saadeh Y, Leung T, Vyas A, Chaturvedi LS, Perumal O, Vyas D. Applications of nanomedicine in breast cancer detection, imaging, and therapy. *J Nanosci Nanotechnol.* 2014;14(1):913-23.
24. Hussain S, Vanoirbeek JA, Luyts K, De Vooght V, Verbeken E, Thomassen LC, et al. Lung exposure to nanoparticles modulates an asthmatic response in a mouse model. *Eur Respir J.* 2011;37(2):299-309.
25. Larsen ST, Roursgaard M, Jensen KA, Nielsen GD. Nano titanium dioxide particles promote allergic sensitization and lung inflammation in mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2010;106(2):114-7.
26. Roursgaard M, Poulsen SS, Poulsen LK, Hammer M, Jensen KA, Utsunomiya S, et al. Time-response relationship of nano and micro particle induced lung inflammation. Quartz as reference compound. *Hum Exp Toxicol.* 2010;29(11):915-33.
27. Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. *Nature.* 2003;422(6927):37-44.
28. Dobrovolskaia MA, McNeil SE. Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nat Nanotechnol.* 2007;2(8):469-78.
29. Kar R, Singha PK, Venkatachalam MA, Saikumar P. A novel role for MAP1 LC3 in nonautophagic cytoplasmic vacuolation death of cancer cells. *Oncogene.* 2009;28(28):2556-68.
30. Lu S, Duffin R, Poland C, Daly P, Murphy F, Drost E, et al. Efficacy of simple short-term in vitro assays for predicting the potential of metal oxide nanoparticles to cause pulmonary inflammation. *Environ Health Perspect.* 2009;117(2):241-7.

31. Goncalves DM, Girard D. Titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles induce neutrophil influx and local production of several pro-inflammatory mediators in vivo. *Int Immunopharmacol*. 2011;21:21.
32. Goncalves DM, Chiasson S, Girard D. Activation of human neutrophils by titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles. *Toxicol In Vitro*. 2010;24(3):1002-8.
33. Gwinn MR, Vallyathan V. Nanoparticles: health effects--pros and cons. *Environ Health Perspect*. 2006;114(12):1818-25.
34. Sayes CM, Reed KL, Warheit DB. Nanoparticle toxicology: measurements of pulmonary hazard effects following exposures to nanoparticles. *Methods Mol Biol*. 2011;726:313-24.
35. Babin K, Antoine F, Goncalves DM, Girard D. TiO₂, CeO₂ and ZnO nanoparticles and modulation of the degranulation process in human neutrophils. *Toxicol Lett*. 2013;221(1):57-63.
36. Poirier M, Simard JC, Antoine F, Girard D. Interaction between silver nanoparticles of 20 nm (AgNP20) and human neutrophils: induction of apoptosis and inhibition of de novo protein synthesis by AgNP20 aggregates. *J Appl Toxicol*. 2014;34(4):404-12.
37. Goncalves DM, Girard D. Zinc oxide nanoparticles delay human neutrophil apoptosis by a de novo protein synthesis-dependent and reactive oxygen species-independent mechanism. *Toxicol In Vitro*. 2014;28(5):926-31.
38. Girard D, Paquin R, Beaulieu AD. Responsiveness of human neutrophils to interleukin-4: induction of cytoskeletal rearrangements, de novo protein synthesis and delay of apoptosis. *Biochem J*. 1997;325 (Pt 1):147-53.
39. Hoffstein ST, Friedman RS, Weissmann G. Degranulation, membrane addition, and shape change during chemotactic factor-induced aggregation of human neutrophils. *J Cell Biol*. 1982;95(1):234-41.
40. Fossati G, Moulding DA, Spiller DG, Moots RJ, White MR, Edwards SW. The mitochondrial network of human neutrophils: role in chemotaxis, phagocytosis, respiratory burst activation, and commitment to apoptosis. *J Immunol*. 2003;170(4):1964-72.
41. Ward C, Dransfield I, Chilvers ER, Haslett C, Rossi AG. Pharmacological manipulation of granulocyte apoptosis: potential therapeutic targets. *Trends Pharmacol Sci*. 1999;20(12):503-9.
42. Ren Y, Tang J, Mok MY, Chan AW, Wu A, Lau CS. Increased apoptotic neutrophils and macrophages and impaired macrophage phagocytic clearance of apoptotic neutrophils in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2003;48(10):2888-97.
43. Antoine F, Simard JC, Girard D. Curcumin inhibits agent-induced human neutrophil functions in vitro and lipopolysaccharide-induced neutrophilic infiltration in vivo. *Int Immunopharmacol*. 2013;17(4):1101-7.
44. Lavastre V, Cavalli H, Rathe C, Girard D. Anti-inflammatory effect of *Viscum album* agglutinin-I (VAA-I): induction of apoptosis in activated neutrophils and inhibition of lipopolysaccharide-induced neutrophilic inflammation in vivo. *Clin Exp Immunol*. 2004;137(2):272-8.

45. Moisan E, Chiasson S, Girard D. The intriguing normal acute inflammatory response in mice lacking vimentin. *Clin Exp Immunol.* 2007;150(1):158-68.
46. Pelletier M, Bouchard A, Girard D. In vivo and in vitro roles of IL-21 in inflammation. *J Immunol.* 2004;173(12):7521-30.
47. Pelletier M, Roberge CJ, Gauthier M, Vandal K, Tessier PA, Girard D. Activation of human neutrophils in vitro and dieldrin-induced neutrophilic inflammation in vivo. *J Leukoc Biol.* 2001;70(3):367-73.